Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Escuela Profesional de Ciencia de los Alimentos

Aislamiento e identificación de levaduras de la fermentación espontánea del café del Valle de Chanchamayo por procesamiento húmedo

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR

Heleen Mishell HINOSTROZA PÉREZ

ASESORES

Amparo Iris ZAVALETA PESANTES
Carol Nathali FLORES FERNÁNDEZ (Coasesora)

Lima, Perú

2024



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Hinostroza H. Aislamiento e identificación de levaduras de la fermentación espontánea del café del Valle de Chanchamayo por procesamiento húmedo [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Ciencia de los Alimentos; 2024.

Metadatos complementarios

Datos de autor 1	
Nombres y apellidos	Heleen Mishell Hinostroza Pérez
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	70295674
URL de ORCID	No aplica
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Amparo Iris Zavaleta Pesantes
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	17880045
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-3844-7185
Datos de coasesor	
Nombres y apellidos	Carol Nathali Flores Fernández
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	46430930
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-6250-201X
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	María Elena Salazar Salvatierra
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08675623
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Carmen Gladys Peña Suasnabar
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	20904674
Miembro del jurado 2	

Nombres y apellidos	Gloria Marina Marín Vallejos
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09690135
Datos de investigación	
Línea de investigación	A.4.0.6 Microorganismos de interés sanitario, industrial, ambiental y bioprocesos. Enzimas y fermentaciones
Grupo de investigación	Biotecnología Microbiana y Salud (BIOMIAS)
Agencia de financiamiento	Convenio de Financiamiento N° 007 - FONDECYT - 2014
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Laboratorio de Biología Molecular País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Calle: Jr. Puno N°1002 Latitud: -12.05572 Longitud: -77.02324
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2018 - 2023
URL de disciplinas OCDE	Biotecnología agrícola, Biotecnología alimentaria https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.04.01

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

"Aislamiento e identificación de levaduras de la fermentación espontánea del café del Valle de Chanchamayo por procesamiento húmedo"

Que presenta la Bachiller en Ciencia y Tecnología de los Alimentos:

HELEEN MISHELL HINOSTROZA PÉREZ

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado Evaluador, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

DIECINUEVE (19) - APROBADO CON MÁXIMOS HONORES

en conformidad con el Art. 34.° del Reglamento para la obtención Título Profesional de Licenciado (a) en Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 23 de mayo de 2024.

Dra. María Elena Salazar Salvatierra
Presidente

Dra. Carmen Gladys Peña Suasnabar
Miembro

Mg. Gloria Marina Marín Vallejos
Miembro

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Vicerrectorado de Investigación y Posgrado
Dirección General de Biblioteca y Publicaciones

Dirección del Sistema de Bibliotecas y Biblioteca Central

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo Dra. Amparo Iris, Zavaleta Pesantes en mi condición de asesor acreditado con la Resolución Decanal N° 00561-FFB-D-2018 de la tesis de investigación, cuyo título es Aislamiento e identificación de levaduras de la fermentación espontánea del café del Valle de Chanchamayo por procesamiento húmedo, presentado por el bachiller Heleen Mishell Hinostroza Pérez para optar el título de Licenciada en Ciencia y Tecnología de Alimentos.
CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de 11 % de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado/ título/ especialidad correspondiente.



Firma del Asesor _____

DNI: 17880045

Nombres y Apellidos del Asesor: Amparo Iris Zavaleta Pesantes

21 / 06 / 2024
Fecha

DEDICATORIA

En memoria a Alipio Villa, mi tío cuya disposición, tiempo y orientación invaluable fueron esenciales para iniciar este emocionante capítulo. Su conexión con el café, especialmente de Chanchamayo, ha despertado mi interés y curiosidad, hoy en su ausencia, se convierte en un legado que aprecio profundamente.

A mi amada madre, Adelfa, agradezco profundamente su apoyo incondicional, motivación y enseñanzas que han sido la luz que ha guiado cada paso de este viaje académico. Su inmenso amor ha sido el motor que impulsa mis logros.

A Martín, mi fuente constante de compañía, amor y apoyo, agradezco profundamente su presencia perenne en cada paso que doy. Su influencia ha enriquecido mi experiencia de maneras que trascienden las palabras.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Amparo Iris Zavaleta Pensantes, por ser mi guía, por su confianza inquebrantable, su paciencia que nunca se agotaba. Su motivación constante y sus conocimientos invaluable han sido faro y brújula, iluminando cada paso de esta investigación.

A la Dra. Carol Nathali Flores Fernández, asesora dedicada, por su apoyo incondicional, su tiempo y comprensión. Cada consejo y palabra me alentaron en esta travesía, su presencia ha sido mi mejor viento.

Quiero expresar mi sincero agradecimiento al Fundo San Vicente por permitirme acceder a sus instalaciones y ser el epicentro de esta investigación en el campo del café. Su generosidad y colaboración han sido fundamentales para el desarrollo de este estudio. Agradezco profundamente su hospitalidad y apoyo en este proyecto.

A mi distinguido jurado evaluador, expresar mi profundo agradecimiento por su dedicación y contribución en la evaluación de mi tesis. Sus comentarios y sugerencias han enriquecido significativamente mi trabajo. Agradezco sinceramente su tiempo y compromiso con mi desarrollo académico.

Al equipo de investigación del laboratorio de biología molecular, agradezco la colaboración y la ayuda inagotable en el desarrollo de esta investigación.

INDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN 1
II. OBJETIVOS 3
2.1. Objetivo general 3
2.2. Objetivos específicos 3
III. GENERALIDADES 4
3.1. Café 4
3.1.1. Importancia del café 4
3.1.2. Características generales 6
3.1.3. Proceso de producción del café 8
3.1.4. Factores que afectan la producción y la calidad del café 12
3.2. Fermentación del café 14
3.2.1. Rol de la fermentación en el procesamiento del café 14
3.2.2. Factores que afectan la fermentación 14
3.2.3. Control del proceso de fermentación 15
3.3. Levaduras 16
3.3.1. Definición 16
3.3.2. Características generales 16
3.3.3. Identificación de levaduras 17
3.4. Antecedentes de la investigación 19
3.4.1. Revisión de estudios sobre levaduras en la fermentación del café 19
3.4.2. Contribuciones de investigaciones previas 21
IV. METODOLOGÍA 24
4.1. Área de estudio 24
4.2. Materia prima 24
4.3. Diseño de la investigación 26
4.3.1. Diseño muestral 26
4.4. Metodología experimental 26
4.5. Métodos de análisis 27
4.5.1. Análisis fisicoquímicos 27
4.5.2. Recuento celular 27
4.5.3. Aislamiento de levaduras del café 28
4.5.4. Caracterización morfológica de levaduras 28
4.5.5. Caracterización fisiológica de levaduras 29

4.5.6. Caracterización molecular de levaduras....30
4.5.7. Análisis estadístico....31
V. RESULTADOS....32
5.1. Fermentación espontánea del café del distrito de Perené....32
5.1.1. Características fisicoquímicas....32
5.1.2. Recuento celular....33
5.2. Caracterización fenotípica de las levaduras aisladas de la fermentación espontánea del café....33
5.2.1. Caracterización morfológica de las levaduras....33
5.2.2. Caracterización fisiológica de levaduras....38
5.3. Caracterización molecular....40
5.3.1. Extracción de ADN....40
5.3.2. Análisis RFLP-PCR....41
5.3.3. Secuenciación de la región 5,8S-ITS....43
VI. DISCUSIÓN....46
VII. CONCLUSIONES....52
VIII. REFERENCIAS....53
IX. ANEXOS....71

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BCRP	Banco Central de Reserva del Perú
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
DNS	Ácido 3,5 – dinitrosalicílico
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatado
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FOB	Free on board
g/L	Gramos por litro
h	Hora
HCl	Cloruro de hidrógeno
ITS	Espacios transcritos internos
Km/h	Kilómetro por hora
L	Litro
Log	Logaritmo
M	Molar
m	Metro
mL.	Mililitros
mg/L	Miligramos por litro
$MgCl_2$	Cloruro de magnesio
NaCl.	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio

Nm	Nanómetro
p/v	Peso sobre volumen
$UFC.mL^{-1}$	Unidades formadoras de colonia por mililitro
µL	Microlitros
µM	Micromolar
YPD	Yeast Peptone Dextrose
pb	Pares de bases
PBS	Phosphate-Buffered Saline
pH	Potencial de hidrógeno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
RPM	Revoluciones por minuto
SDS	Sulfato dodecilo de sodio
TBE	Buffer Tris-Borato-EDTA
TE	Buffer Tris-EDTA
Tris-HCl	Tris hidrocloruro

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de la producción de café en Perú.....**6**
Figura 2. Partes del fruto del café **7**
Figura 3. Flujograma del proceso productivo de café tostado y molido.....**9**
Figura 4. Plantaciones de cafeto del "Fundo San Vicente" en Perené-Chanchamayo **13**
Figura 5. Distribución geográfica de la producción de café a nivel mundial. **14**
Figura 6. Gen de ADNr y región de amplificación mediante PCR utilizando los cebadores ITS1 (5′-TCCGTAGGTAACCTGCGG-3′) e ITS4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATA TGC-3′). **18**
Figura 7. Fundo San Vicente en distrito de Perené - Chanchamayo.....**24**
Figura 8. Plantaciones de café del Fundo San Vicente.....**25**
Figura 9. Cosecha de los frutos de café.....**25**
Figura 10. Poza de fermentación espontánea del café, Fundo San Vicente en distrito de Perené, Chanchamayo **27**
Figura 11. Variación de la concentración de azúcares reductores y el pH durante la fermentación espontanea del café por vía húmeda **32**
Figura 12. Evolución de la población de levaduras durante la fermentación espontánea del café por recuento en placa (YPD).....**33**
Figura 13. Microscopia óptica (100X) de cepas.....**34**
Figura 14. Crecimiento en caldo YPD de levaduras aisladas de frutos de café (*Coffea arábica L.*). **34**
Figura 15. Levaduras en colonia aisladas de café sobre medio YPD.....**35**
Figura 16. Características macroscópicas de las levaduras aisladas de la fermentación espontánea del café del distrito de Perené-Chanchamayo **37**
Figura 17. Halo de hidrólisis de la levadura MH 10 en medio con pectina **40**
Figura 18. Gel de agarosa 1 % mostrando el ADN genómico de las levaduras extraídas. **41**
Figura 19. Gel de agarosa 1,5 % mostrando la región 5,8S-ITS amplificada por PCR de levaduras aisladas de la fermentación espontánea de café de Perené-Chanchamayo.....**42**
Figura 20. Gel de agarosa 3 % mostrando el patrón de digestión por *Hae-III* de la región 5,8S-ITS amplificada de las levaduras aisladas. **43**
Figura 21. Procesamiento del café por vía húmeda en el “Fundo San Vicente”. **82**
Figura 22. Porcentaje de levaduras cultivadas en diferentes condiciones fisicoquímicas.....**84**
Figura 23. Tolerancia al etanol al 4, 6, 8 y 10%.....**84**

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de Coffea arábica L. "Café" **.....7**

Tabla 2. Composición química del mucílago de café **.....8**

Tabla 3. Condiciones ambientales para una mayor producción de café **……..12**

Tabla 4. Características de la fermentación húmeda del café en un sistema abierto según CENICAFÉ **……15**

Tabla 5. Condiciones de crecimiento de las levaduras **……..….17**

Tabla 6. Población inicial y máxima de levaduras en fermentaciones húmedas de café **……20**

Tabla 7. Especies de levaduras aisladas de la fermentación húmeda del café en diferentes países **……..……22**

Tabla 8. Características de las levaduras aisladas de la fermentación espontánea del café del distrito de Perené-Chanchamayo **…….…36**

Tabla 9. Tolerancia a condiciones de estrés en levaduras aisladas de la fermentación húmeda del café de Perené – Chanchamayo **……..……39**

Tabla 10. Perfiles de restricción de la región 5,8S-ITS de las levaduras aisladas de la fermentación húmeda del café de Perené -Chanchamayo **……44**

Tabla 11. Análisis de las secuencias nucleotídicas de la región 5,8S-ITS de levaduras aisladas de la fermentación húmeda del café de Perené-Chanchamayo **……..45**

Tabla 12: Características fisicoquímicas del líquido de fermentación **…….…….83**

Tabla 13: Recuento de levaduras presentes en la fermentación espontánea de café por vía húmeda **……..83**

RESUMEN

En la fermentación espontánea del café participan diversas levaduras y bacterias que influyen en las características organolépticas y en la calidad del café. El objetivo de la investigación fue identificar levaduras aisladas del procesamiento húmedo del café del fundo San Vicente del distrito Perené (Chanchamayo). Para ello, se recolectaron muestras de la fermentación espontánea desde el tiempo cero hasta las 18 h. Después, se cultivaron en caldo extracto de levadura 1 %, glucosa 2 %, peptona 2 %, agar 2 % (p/v), pH 5,6 (YPD) y en medio YPD suplementado con cloranfenicol 100 mg/L a 30 °C durante 48 h. Se aislaron 24 levaduras de acuerdo con la forma, color, tamaño, borde y consistencia de la colonia. Después, a cada cepa se determinó la capacidad de crecer a diferentes concentraciones de ácidos láctico y acético, etanol y glucosa; y niveles de pH y temperatura. También se evaluó la capacidad pectinolítica. Además, las levaduras se identificaron mediante PCR-RFLP y secuenciación de la región 5,8S - ITS. Del análisis de la secuenciación se determinaron trece cepas pertenecientes al género *Pichia,* cuatro de *Candida*, cuatro de *Hanseniaspora,* dos de *Torulaspora* y una *Starmerella*. Estos resultados concuerdan con cada uno de los cinco perfiles genéticos obtenidos, sin embargo, las cepas presentaron diferencias en los perfiles fisiológicos y metabólicos, por lo cual se pueden utilizar como inoculantes para la fermentación controlada del café.

Palabras clave: café, fermentación espontánea, levaduras, región 5,8S – ITS, *Pichia, Candida, Hanseniaspora*

SUMMARY

Various yeasts and bacteria participate in the spontaneous fermentation of coffee and influence the organoleptic characteristics and quality of the coffee. The objective of the research was to identify yeasts isolated from the wet processing of coffee from the San Vicente farm in the Perene district (Chanchamayo). To do this, samples of spontaneous fermentation were collected from the beginning until 6 p.m. Then, they were cultured in 1 % yeast extract, 2 % glucose, 2 % peptone, 2 % (w/v) agar, pH 5,6 (YPD) broth and on YPD medium supplemented with 100 mg/L chloramphenicol at 30°. C for 48 hours. 24 yeasts were isolated according to the shape, color, size, border and consistency of the colony. Afterwards, each strain's ability to grow at different concentrations of lactic and acetic acids, ethanol and glucose was determined; and pH and temperature levels. The pectinolytic capacity was also evaluated. Additionally, yeasts were identified by PCR-RFLP and sequencing of the 5,8S - ITS region. From the sequencing analysis, thirteen strains belonging to the *Pichia* genus were determined, four from *Candida*, four from *Hanseniaspora*, two from *Torulaspora* and one *Starmerella*. These results agree with each of the five genetic profiles obtained, however, the strains presented differences in the profiles. physiological and metabolic, which is why they can be used as inoculants for the controlled fermentation of coffee.

Keywords: coffee, spontaneous fermentation, yeasts, region 5,8S – ITS, *Pichia*, *Candida, Hanseniaspora.*

I. INTRODUCCIÓN

En Perú, el café es el principal producto de agroexportación, tiene importancia económica y social debido a que involucra alrededor de 223 mil familias de pequeños productores según el Censo Nacional Agropecuario final (CENAGRO)[1]. En ese sentido, se ha planteado el mejoramiento de cultivos y la tecnificación de los procesos de los cuales algunos son tercerizados a empresas privadas; con un mínimo incremento de la calidad que dificulta la subsistencia del agricultor[2].

El café peruano cuenta con reconocimiento a nivel internacional, y es cultivado en diferentes zonas. Por ejemplo, en Chanchamayo reconocida como capital cafetalera, e incluye diversos distritos como Perené donde se desarrolla la producción tradicional[3–5]. Esta forma se expande a nivel nacional[6].

El beneficio del café permite transformar los frutos de café o cerezas a producto final previo despulpado y fermentación que se realiza por los métodos: húmedo, seco o semiseco, donde participan microorganismos. En el método húmedo, los frutos despulpados son sumergidos en agua para iniciar la fermentación espontánea realizada por levaduras y bacterias[3]. Este proceso facilita el desprendimiento del mucílago de las semillas y mejora sus características organolépticas[7]. Así, los aromas y otras sustancias son obtenidos del metabolismo de la pulpa del café en la fermentación espontánea del café. Este bioproceso es usado para mejorar la calidad del café al ser un sistema homogéneo[8].

Las levaduras aisladas de la fermentación del café, presentan una amplia diversidad. En efecto, la distribución de sus taxones depende de los métodos de procesamiento, de los ecosistemas, regiones geográficas, entre otros. Así, los principales factores que influyen en la fermentación son: la microbiota inicial, calidad e integridad de las semillas del café, temperatura, tiempo, etc. Además, algunas levaduras presentan características únicas que dependen de su hábitat[9,10]. Por ejemplo; Melo et al. 2014[11] reportaron la predominancia de *Pichia fermentans, P. guillermonidii, P. caribbica, Candida glabrata, C. quercitrusa, Saccharomyces sp., y Hanseniaspora opuntiae* en la fermentación de café por el método húmedo.

En efecto, las levaduras presentes en la fermentación influyen en la calidad del producto y al ser nativas son de gran importancia para su uso como cultivos

iniciadores en la fermentación controlada del café, cacao, vino, etc.[12]. El conocimiento de la microbiota nativa y su caracterización permitirá desarrollar fermentaciones controladas para la producción de café de calidad y a la vez mejoran los ingresos de los productores[13]. Por consiguiente, en esta investigación a partir de la fermentación espontánea del café se aislaron e identificaron levaduras según sus características fenotípicas y técnicas moleculares.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Caracterizar levaduras aisladas de la fermentación espontánea del café por procesamiento húmedo del distrito de Perené - Chanchamayo.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar los parámetros fisicoquímicos de la fermentación espontánea de los frutos del café por procesamiento húmedo.
- Caracterizar fenotípicamente las levaduras aisladas de la fermentación espontánea de los frutos de café del distrito de Perené - Chanchamayo.
- Identificar las levaduras aisladas a partir del proceso de fermentación espontánea del café por vía húmeda mediante métodos moleculares.

III. GENERALIDADES

3.1. Café

El café es una bebida obtenida por extracción con agua a ebullición de la semilla del cafeto tostada y molida. El árbol del cafeto tiene hojas simples opuestas y con estípulas, posee flores pequeñas blancas agrupadas en glomérulos axilares[14,15].

3.1.1. Importancia del café

El café es uno de los productos más comercializados y cultivado en más de 70 países, entre los que destacan Brasil, Vietnam, Indonesia, Colombia e India[16]. Además, la Unión Europea y los Estados Unidos de América son los mercados de mayor consumo e importación a nivel mundial. El mercado del café se expande debido al aumento del consumo y a una creciente tendencia por cafés especiales. No obstante, las variaciones en el precio y la desigual distribución de las ganancias entre los involucrados en la cadena productiva es un desafío, sobre todo para productores primarios[17]. Además, países productores de café cuyos ingresos son relativamente bajos sufren inseguridad en su sostenibilidad económica.

Así, Silva et al., 2016[18] afirman:

> "el café se ha considerado como un tejido social, cultural, institucional y político"

Por otro lado, los efectos del cambio climático requieren tecnología e innovación para mayor competitividad en la industria de bebidas, que permita obtener una mayor productividad e incluso el valor agregado.

a) Producción de café en Perú

En Perú, el 2022 se produjo 247 mil toneladas de café por un valor FOB de 1236 millones de dólares que es ligeramente mayor al año anterior, después que las exportaciones presentaron en los últimos años una tendencia descendente según el BCRP[19,20]. De hecho, son más de 400 mil hectáreas utilizadas para sembrar el café y la producción involucra a 223 mil familias que en su mayoría (95 %) son pequeños agricultores[21]. Además, la producción cafetalera se realiza mayormente de forma artesanal; ya que según la Junta Nacional del Café, el 80 % de los productores no emplea tecnología[3,22,23]. Debido a esto, la sostenibilidad del café

requiere de innovación para una mayor competitividad y para ello es necesario la participación de empresas e instituciones especializadas[24].

Las zonas cafetaleras con más productores y áreas de cultivo son Cajamarca, San Martín, Junín, Amazonas, Cusco, Pasco, y Huánuco (Figura 1)[3,22]. En Junín está el valle de Chanchamayo, conocida como capital cafetalera y que cuenta con reconocimiento a la calidad de su café a nivel internacional. De hecho, es el departamento con mayor área cultivada a pesar que el rendimiento está por debajo de otros[25,26].

No obstante, en los últimos años el sector cafetalero de la provincia de Chanchamayo - Junín, entre otras, presentan problemas en la cadena de valor del café que abarca los bajos niveles de productividad, inconsistencia en la calidad, logística y una débil gobernanza llegando a afectar la calidad de vida de los productores[27,28]. Así, la selva central con su producción tradicional liderando por más de cien años a nivel nacional es desplazada por Cajamarca debido a calidad, productividad y asociación[19,25,27,29].

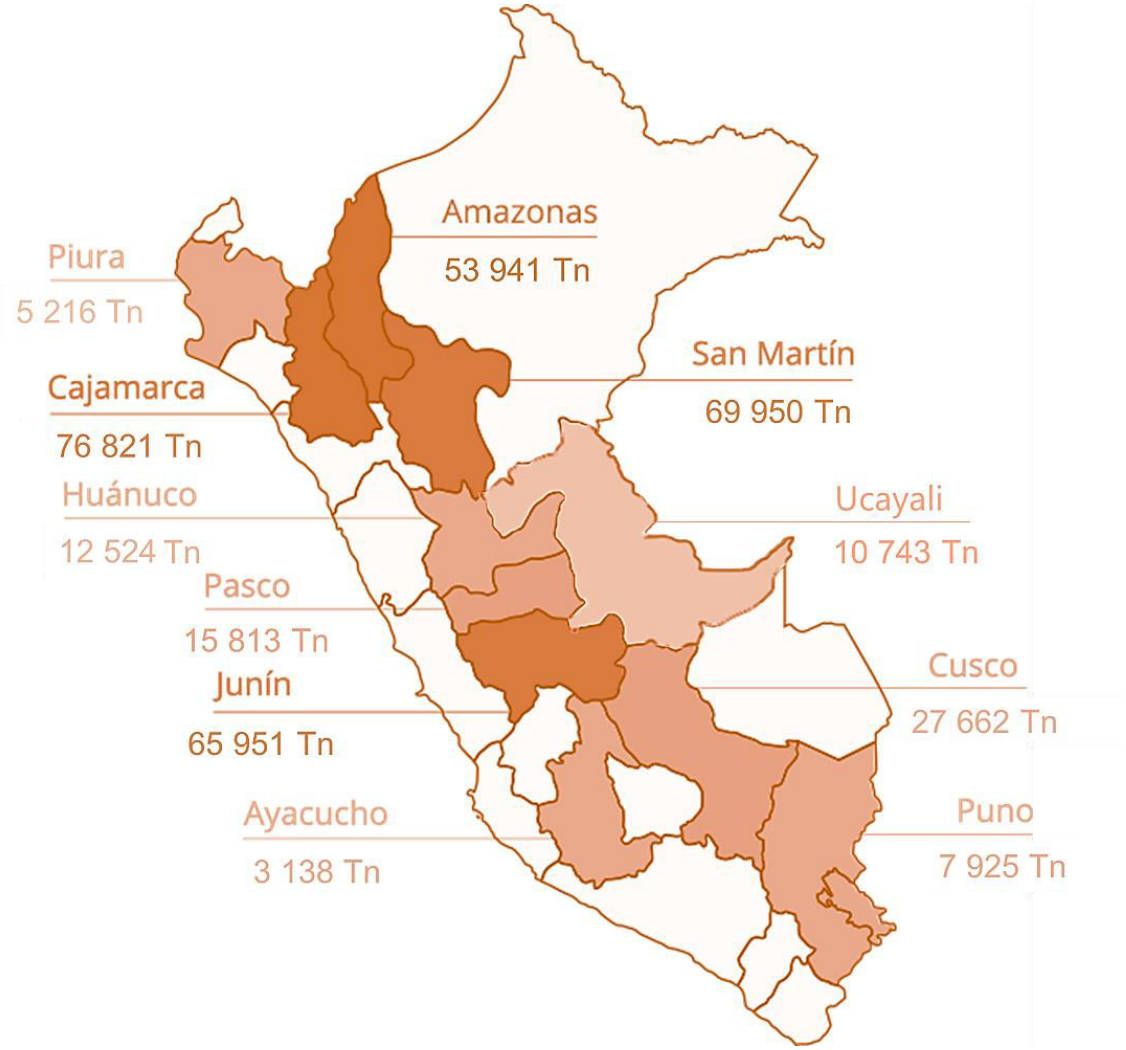


Figura 1. Distribución geográfica de la producción de café en Perú. Los datos de producción de café corresponden al Boletín Trimestral N° 04-2022- MIDAGRI[29]

Coffea arábica L. es el más cultivado en Perú e incluye variedades como Typica que representa el 70 %, Caturra 20 % y otras (10 %). Las características sensoriales, la gama de aromas y sabores, dependen principalmente de las variedades y procedencia[3]. En ese sentido, la distinción en los perfiles en taza de café podría presentar cierta similitud con las variedades de uva empleadas para los diferentes tipos de vino[17].

3.1.2. Características generales

El cafeto es un árbol originario de Etiopía perteneciente a la familia de las Rubiáceas, no obstante, el género *Coffea* difiere los otros miembros en su tipo de placentación denominada coffeana[14].

En la Tabla 1 se observa la clasificación taxonómica del café:

Tabla 1. Taxonomía de *Coffea arábica L.* **"**Café"

Clase	Equisetopsida C. Agardh
Sub clase	Magnoliidae Novák ex Takht
Super orden	Asteranae Takht
Orden	Gentianales Juss. ex Bercht. & J. Presl
Familia	Rubiaceae Juss
Género	*Coffea*
Especie	*Coffea arábica*

*Tomado de Villano, 2021[3]

El cafeto es cultivado en climas tropicales a altitudes entre 1200 a 1800 m. La mayoría de frutos del café está provista de dos semillas cubiertos por una capa de pulpa. Además, están revestidos por pergamino, pulpa y piel[30] (Figura 2).

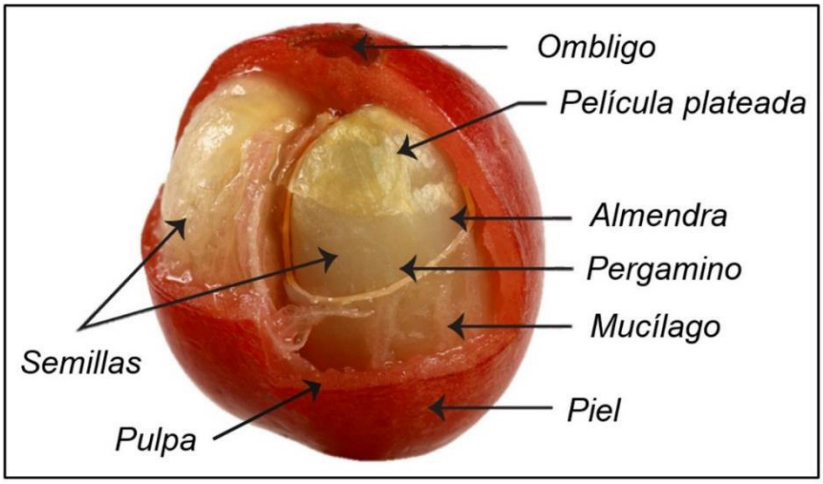


Figura 2. Partes del fruto del café

*Tomado de Ramos et al., 2010[31]

Las capas del fruto o cereza de café son:

- Piel (exocarpio). Es la capa externa y su color varía de acuerdo al grado de maduración de verde a rojo intenso según la variedad de la planta.

- Pulpa (mesocarpio). Debajo de la piel se encuentra la pulpa y su capa interna viscosa es el mucílago, y este último contiene pectina, la pulpa es retirada en el despulpado.
- Pergamino (endocarpio). Es una cascarilla amarillo pálido que cubre las semillas que están envueltas por una capa fina llamada película plateada que se despega durante el tostado y una capa más interna en forma de malla denominada almendra[31,32].

a) Mucílago del café

La capa restante de mucílago adherido al pergamino es utilizada durante la fermentación del café despulpado. La cantidad de mucílago en la semilla del café depende de la maduración del fruto[33]. En la Tabla 2 se presenta la composición química del mucílago de café.

Tabla 2. Composición química del mucílago de café

Variable	Inicial %	Final %
Humedad	88,6	92,4
Proteínas	0,93	1,05
Azúcares totales	6,79	1,00
Azúcares reductores	4,16	0,44
Sustancias pécticas	0,57	2,02
Acidez (mg de $CaCO_{3)}$	969	7000

Los valores finales son a las 74 h de fermentación

*Tomado de Puerta, 2011[34]

3.1.3. Proceso de producción del café

El proceso productivo para la obtención de café involucra diferentes etapas, y se caracteriza por ser un proceso complejo ya que se requiere entrega y experiencia para lograr café de calidad.

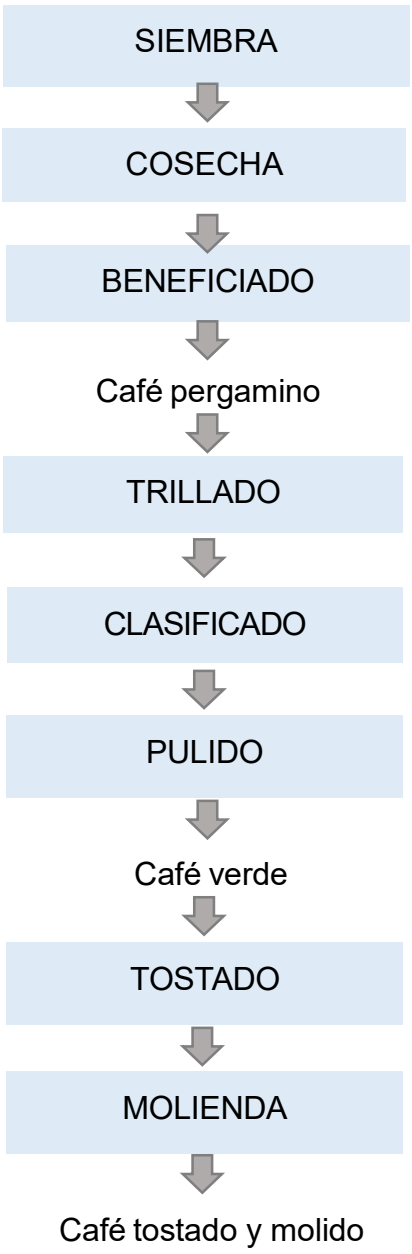


Figura 3. Flujograma del proceso productivo de café tostado y molido por vía húmeda

A continuación, se describen las etapas:

a) Siembra

Se inicia con la siembra hasta el crecimiento de la planta, la variedad a reproducir es según características de aclimatación, productividad, calidad del grano en taza, y se considera su tolerancia a plagas y el mercado objetivo. Puede realizarse

sistemas de producción según luminosidad al sol o bajo sombra, y emplear practicas adecuadas en el cultivo[35].

b) Cosecha

Se recogen los frutos manualmente para permitir su selección adecuada, se debe cosechar frutos maduros (rojo o amarillo según variedad de la planta), buen tamaño, sanos y sin daños debido a enfermedades o plagas. Para ello se emplea recipientes recolectores y costales de fibra[23].

c) Beneficiado

Con el fin de obtener café pergamino libre de pulpa y mucilago se considera principalmente actividades como despulpado, fermentado, lavado y secado para eliminar la pulpa, descomponer el mucilago, eliminar restos de este en el grano y poder conservarlo respectivamente. Las operaciones varían según el método de procesamiento que pueden ser húmedo, seco y semiseco. Para ello se emplea despulpadoras, tanques de fermentación y/o zarandas de madera y canales de lavado, Además, se recomienda que se procese el café el mismo día de la recolección[35].

El beneficiado o procesamiento del café tiene influencia en su calidad sensorial en taza, y consiste en una serie de operaciones[36]. Este se puede llevar a cabo por tres métodos: húmedo, seco o mixto y así obtener el café pergamino desde el fruto del café[14].

- **Método húmedo**

La vía húmeda incluye recepción, lavado y selección de frutos a procesar, despulpado, fermentación con agua para remover el mucílago, lavado y secado de las semillas para la obtención de café pergamino seco. De hecho, este sistema húmedo es más homogéneo ya que luego del despulpado los granos de café son puestos en reposo en un tanque abierto con agua durante 15 a 40 h tomando en cuenta la temperatura. Esto con el objetivo de descomponer el material mucilaginoso restante adherido al grano[14,37,38].

- **Método seco**

Es un proceso heterogéneo, también conocido como natural donde tradicionalmente los frutos de café maduros con cáscara son colocados para deshidratación en superficies denominadas “camas” aproximadamente entre 15 a 20 días[17]. Por esta vía se produce café “fuerte” con sabor medicinal, se caracteriza por tener más cuerpo y ser más terroso, por el contrario, el húmedo es homogéneo, produce café de mejor calidad, menos cuerpo, mayor acidez, aroma y aceptación[8,39,40].

d) Trillado

Es la etapa de descascarillado con la finalidad de pelar o quitar la capa que recubre los granos llamada pergamino. Se realiza con máquinas trilladoras o descascaradoras[41].

e) Clasificación

Se separa los tipos de grano teniendo en base a calidad del grano, forma, tamaño y el mercado. Esta determinará los tipos de café y un producto final de calidad, el grano grande suele ser más apreciado.

f) Pulido

Los granos son pulidos con la finalidad de retirar la película plateada y así darle un mejor aspecto.

g) Tostado

Se emplean temperaturas por encima de 100 °C y diferentes tiempos según el grado de tueste para transformar por completo el grano verde de café. Generalmente a 220-230 °C durante 15 a 20 min se desarrollan completamente las características aromáticas. La finalidad es generar olor, sabor y otras características organolépticas del café[42].

h) Molienda

Tiene como finalidad reducir el grano de café tostado a polvo y sea posible la extracción de los componentes solubles del café tostado y molido[43].

3.1.4. Factores que afectan la producción y la calidad del café

Entre estas se encuentra la variedad de café, la región, las condiciones de cultivo, métodos de procesamiento, tipo de microorganismos, tecnología empleada para el grado de tostado, grado de molienda y método de preparación[17,22,44,45]. Además, los tipos de suelo, los factores climáticos y las prácticas agrícolas proporcionarán características diferentes[22]. Por ejemplo, existen sabores y aromas regionales debido a la variedad microbiana dispuesta territorialmente[46].

a) Condiciones ambientales del cultivo del café

El crecimiento y el desarrollo del cafeto, están relacionados con factores edafoclimáticos de las zonas cfetaleras[14,35]. En la Tabla 3 se muestra las condiciones ambientales que favorecen el cultivo de café y generan una mayor producción[14].

Tabla 3. Condiciones ambientales para una mayor producción de café

Condiciones	Rangos
Altitud (m)	1200 – 1600
Precipitación pluvial (mm/año)	1000 – 2500
Temperatura (°C)	18 – 22
Humedad relativa (%)	70 – 95
Luminosidad (horas de brillo solar)	1500 - 2500
Vientos	≤ 30 Km/h

*Tomado de Guerrero, 2019[47]; Desco 2012[35]; Sierra 2012[22]

El cultivo de café requiere condiciones climáticas propias de regiones subtropicales o tropicales. En las zonas cafetaleras de Perú, la temperatura varía entre 16 y 24 °C; la precipitación pluvial adecuada está en el rango de 1000 a 3000 mm/año, son estos factores los que influyen en la producción de café[22]. Además, altitudes de 1500 a 1800 m determinaron perfiles de taza con el mejor sabor[47].



Figura 4. Plantaciones de cafeto del "Fundo San Vicente" en Perené-Chanchamayo

De hecho, la producción de cultivos de café tiene límites fijados por los Trópicos de Cáncer y Capricornio caracterizado por condiciones climáticas adecuadas[16] (Figura 5). E inclusive se ha determinado que perfiles de calidad están asociados a cada país y su influencia en valor de mercado[48].

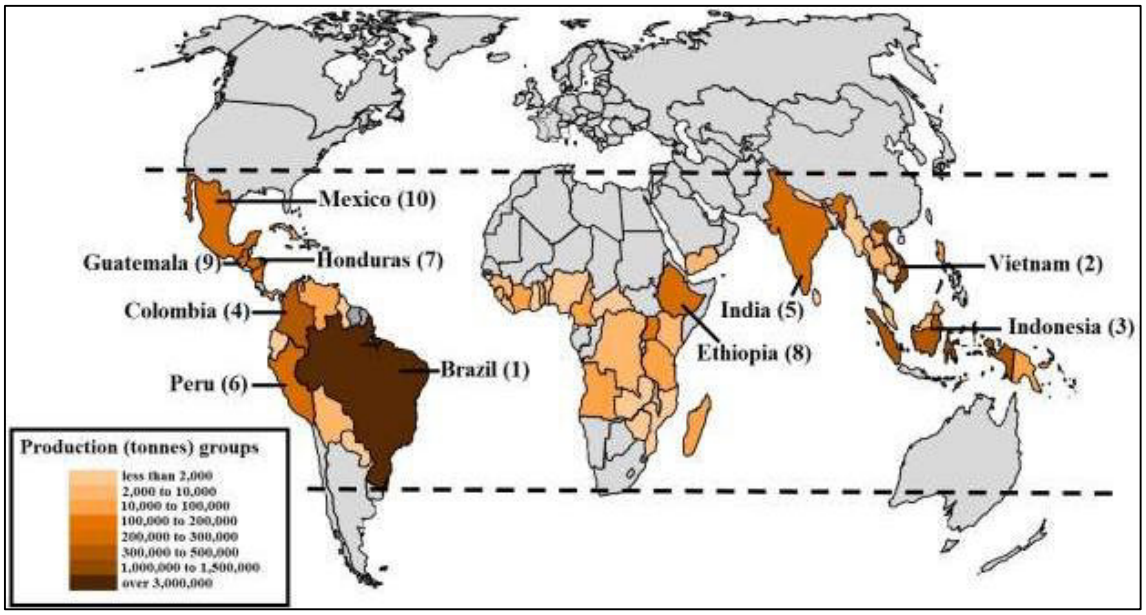


Figura 5. Distribución geográfica de la producción de café a nivel mundial. AMECAFE, 2012[16]. Las líneas discontinuas indican la zona del cinturón del café.

3.2. Fermentación del café

Es un proceso en el que se dan cambios fisicoquímicos en el grano del café debido a la acción de las enzimas de microorganismos específicos que producen alcoholes, ácidos, cetonas y CO_2[14,49,50].

3.2.1. Rol de la fermentación en el procesamiento del café

La fermentación adecuada permite acentuar ciertas características dependiendo del método de procesamiento empleado, además de evitar defectos en los granos de café y sabores indeseables en taza[51,52]. El CENICAFE, indica que durante la fermentación del café, se alteran las características, intensidades y frecuencias de los sabores distintivos, así como de los compuestos químicos y volátiles que se encuentran en el café[37]. Al término de la fermentación, los granos de café están sin restos de mucílago y la calidad del café estará determinada por el tiempo de fermentación[4,26,53].

3.2.2. Factores que afectan la fermentación

Durante la fermentación intervienen factores externos o ambientales e internos que se relacionan con los microorganismos. Entre los primeros están la calidad del agua, condiciones del grano, tiempo, temperatura, pH, oxígeno, potencial redox,

sustrato, etc., mientras que en los internos están los microorganismos, la población inicial (UFC/mL) y su metabolismo[37].

De hecho, los factores determinantes son las levaduras, el tiempo de fermentación y la temperatura para fijar las características del producto[54]. Sin embargo, el tiempo no es una variable a considerar durante el monitoreo de degradación de mucílago en la fermentación espontánea[7]. En la fermentación se producen diversas reacciones, siendo relevante en la calidad final en taza la formación de sustancias producidas por levaduras y bacterias propias del mucílago que cambian las condiciones del medio y, en consecuencia las cualidades del grano[55]. No obstante, la fermentación aún no es tomada en cuenta para la generación de perfiles especiales y un valor agregado[56–58].

Tabla 4. Características de la fermentación húmeda del café en un sistema abierto según CENICAFÉ

Factor	Condiciones
Cantidad de agua (%)	30
Temperatura (°C)	20,5
Tiempo (h)	16 - 24
pH (Acidez)	3,9 – 4,2
°Brix	5,8 -7,9
Concentración de alcohol (%)	0,20 – 0,25

*Tomado de Puerta, 2012[59]

3.2.3. Control del proceso de fermentación

A nivel nacional el beneficio del café es un proceso artesanal no estandarizado sobre todo para la obtención del fruto de café fermentado que asegure una calidad permanente. No obstante, a nivel internacional se han desarrollado diferentes patentes que se basan en el control de variables pero que no se adaptan a las condiciones socioeconómicas ni formas de producción de caficultores peruanos.

Por ejemplo, se han desarrollado en base a tiras para medir pH, etanol, ácido láctico, glucosa y temperatura (“Coffee fermentation kit and method"), o uso de un dispositivo que mide la reducción del volumen del grano ("Method and device for determining critical process finalization which includes reducing apparent density"), y sensores de pH, temperatura y oxígeno que indican cuando finalizar y abrir el tanque de fermentación ("Coffee processing system and method")[60].

3.3. Levaduras

3.3.1. Definición

Son microorganismos unicelulares que pertenecen al reino Fungi, a las divisiones de Ascomicetos o Basidiomicetos. Además pueden presentar hifas y pseudohifas y reproducirse por gemación o fisión[61,62]. Así pues, están en la superficie de los frutos con contenido de azúcares elevados[56,57].

3.3.2. Características generales

Las levaduras presentan formas ovoide, esférica, alargada, de pera, etc. con variación en el tamaño en ancho (1 – 9 µm) y longitud (2 – 20 µm) según especie[63–65]. De hecho, su morfología microscópica y macroscópica es similar aunque dentro de una misma especie se puede encontrar diferencias fenotípicas[58,66,67]. Estas variedades se dan según la fase sexual y asexual de las levaduras, así como la edad del cultivo, y el medio empleado[58,63,68].

a) Condiciones de crecimiento

Las levaduras para su crecimiento requieren oxígeno, pero en medios sin oxígeno, fermentan azúcares. Además, para su desarrollo es necesario carbono, nitrógeno, minerales y algunas requieren vitaminas. Las levaduras crecen en medios que contengan azúcares, gracias a su habilidad de usar los azúcares simples como glucosa y fructosa, y complejos previamente hidrolizados. Estos le sirven como fuente de carbono, además diversos autores indican que las levaduras soportan medios de crecimiento con altas concentraciones. De hecho, dicha condición pueden aumentar su competencia para tomar otros nutrientes del medio como aminoácidos, pero a niveles de glucosa 5 %, las levaduras la metabolizan en etanol y CO_2[69].

Tabla 5. Condiciones de crecimiento de las levaduras

Factor	Condiciones
Requerimiento de oxígeno	Anaerobios facultativos
Temperatura de crecimiento (°C)	20 – 30
Tolerancia al pH (Acidez)	2 - 8
Concentración de glucosa crítica para fermentación alcohólica (%)	5
Productos formados	Etanol, ácido láctico, ácido butírico, ácido málico, CO_2, metano

*Tomado de Vila, 2018[63]; Kurtzman et al., 2011[58]; Coronel, 2015[64]

Establecer límites para el crecimiento de las levaduras se dificulta debido a que interaccionan entre sí[58].Sin embargo, diversos autores señalan que las condiciones óptimas de temperatura es alrededor de 28 °C y para el pH entre 4,5 a 7,0 aproximadamente ya que varía según especie[58,63,69]. Con respecto a los ácidos orgánicos estos son producidos y usados por las levaduras modificando la acidez del medio, pero concentraciones de ácido acético de 1-2 g/L afecta la calidad de los alimentos y las bebidas[69].

3.3.3. Identificación de levaduras

a) Técnicas convencionales

Las formas tradicionales para caracterizar e identificar las levaduras incluyen estudios morfológicos, es decir a nivel macroscópico de las colonias y a nivel microscópico de las características celulares. Además, complementariamente se suelen emplear pruebas fisiológicas y bioquímicas que permiten su descripción fenotípica[61,66]. Estas pruebas se fundamentan en la actividad fermentativa de azúcares o fuentes de carbono, crecimiento en compuestos nitrogenados, tolerancia a distintos rangos de temperatura, pH, concentraciones de azúcares, sales, etc.[58,64,68]. No obstante, algunas veces las levaduras presentan similitud

morfológica o existe variabilidad en condiciones de cultivo conllevando a la identificación del 1 % de microorganismos mediante técnicas convencionales[69–71].

b) Técnicas moleculares para la identificación de levaduras

La identificación de levaduras empleando las macromoléculas de ADN y ARN como criterio de caracterización inicio en la década de 1970, a causa de que la secuenciación de genes es rápida y precisa con menos limitaciones[10,64]. La comparación de las secuencias nucleotídicas del ADNr es objeto de estudio ya que como marcador molecular diferencia tanto zonas codificantes (18S; 5,8S; 26S y 5S) como no codificantes como las regiones espaciadoras entre los genes ribosómicos 18S, 26S y 5S[72]

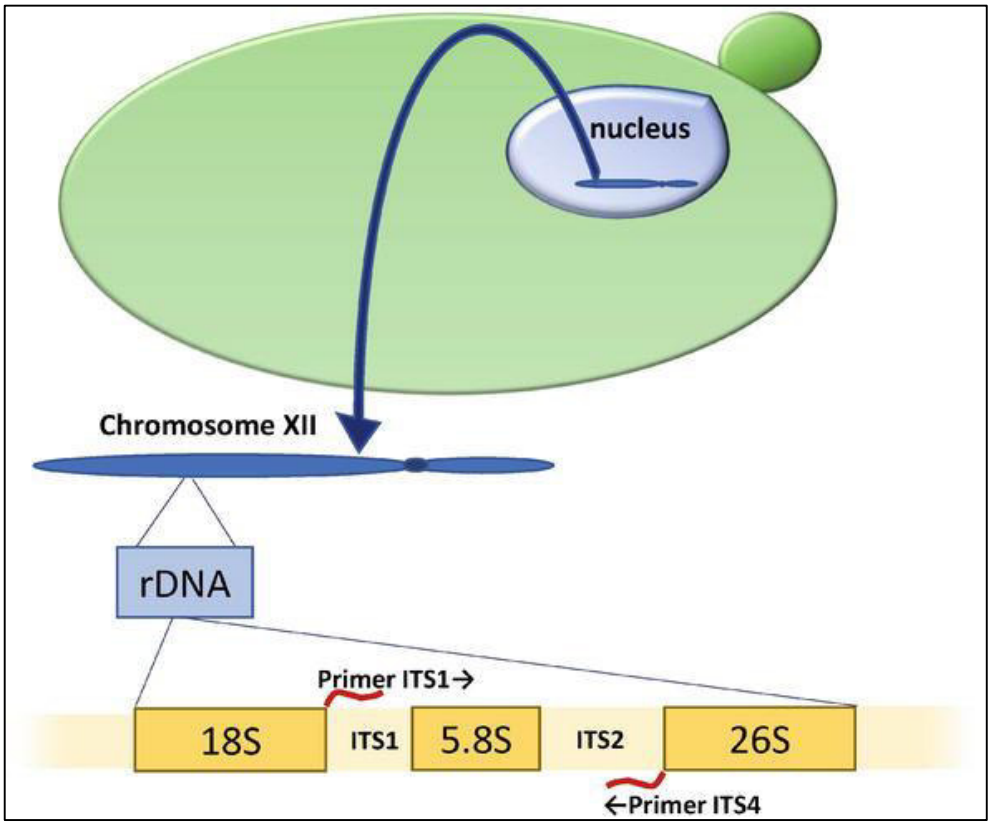


Figura 6. Gen de ADNr y región de amplificación mediante PCR utilizando los cebadores ITS1 (5′-TCCGTAGGTAACCTGCGG-3′) e ITS4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATA TGC-3′).

*Tomado de Pulcini et al., 2021[73]

De hecho, Masoud et al., 2004[74] identificaron molecularmente cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida xestobii* en el procesamiento húmedo del

café en África mediante electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (PCR-DGGE); las cuales no fueron identificadas mediante técnicas de cultivo[53]. En este aspecto, la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite amplificar un billón de copias idénticas de genes o regiones intergénicas que se puede analizar por secuenciamiento de ácidos nucleicos. Otra técnica que permite distinguir entre cepas de levaduras es el polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) mediante el uso de enzimas de restricción o endonucleasas o amplificación y corte de los operones de los genes ribosómicos[75].

- **Polimorfismos en longitud de los fragmentos de restricción – reacción en cadena de la polimerasa (RFLP-PCR)**

Es una técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite amplificar regiones específicas de ADN que digeridas con enzimas de restricción generan fragmentos de restricción en donde la detección de las diferencias en la longitud de estas produce patrones únicos de bandas conocidos como RFLP y que pueden variar entre individuos o cepas permitiendo la detección de polimorfismos[76,77].

3.4. Antecedentes de la investigación

3.4.1. Revisión de estudios sobre levaduras en la fermentación del café

En los últimos años, varios estudios han abordado la diversidad de microorganismos presentes en la fermentación del café y su impacto en la calidad del producto final. Y, según de Melo et al. 2015[10] la carga microbiana inicial y máxima es un importante factor durante la fermentación debido a que involucra diversas bacterias y levaduras que emplean como sustrato el mucílago superficial de los granos de café. Además, en el manejo postcosecha el tiempo de fermentación impacta en la comunidad microbiana[13,78,79]. En ese sentido, la calidad de café en taza está influenciada por los metabolitos microbianos que podrían difundirse al interior del grano de café en el momento de la fermentación resaltando la importancia de esta etapa[17,55,56].

Según Elhalis et al. 2020[80], en la fermentación húmeda de los granos de café se ha demostrado el rol crucial de las levaduras en la producción de café con

características superiores sensorialmente debido a la producción de metabolitos microbianos clave y compuestos aromáticos deseables. De hecho, Jiyuan et al. 2019[79] establecen una relación entre la composición microbiana, los compuestos químicos presentes y las características organolépticas del café mediante el análisis de los perfiles metabolómicos en diferentes etapas del procesamiento del café. Las levaduras presentes en los frutos del café después de utilizar el azúcar del mucílago producen enzimas que actuarían en la generación de precursores de compuestos aromatizantes y de sabor como ácidos clorogénicos, aminoácidos, azúcares reductores[38,53]. Se presenta en la Tabla 6 la población de levaduras presentes en la fermentación húmeda del café.

Tabla 6. Población inicial y máxima de levaduras en fermentaciones húmedas de café

País	Población		Referencia
	Inicial (cfu/g)	Máxima (cfu/g)	
India	$4{,}30 \times 10^4$	$5{,}50 \times 10^6$	Agate y Bhat, 1966.
Hawai	$6{,}20 \times 10^4$	$6{,}60 \times 10^4$	Frank H. et al., 1965.
México	$3{,}90 \times 10^4$	$1{,}00 \times 10^6$	Avallone et al., 2001.
Tanzania	$4{,}00 \times 10^4$	$5{,}00 \times 10^7$	Masoud et al., 2004.
Brasil	$5{,}01 \times 10^2$	$1{,}40 \times 10^7$	Melo et al., 2014.

*Tomado de Melo et al., 2017[10]

Por lo tanto, diversos autores resaltan el potencial de las levaduras para dirigir la fermentación y aumentar significativamente la calidad del café. Así, las levaduras son frecuentemente aisladas del proceso de fermentación de café con mayor frecuencia[12]. Las procedencias son suelo, aire, agua, manipuladores, tanques y herramientas[10]. En la superficie del fruto están las levaduras que participan en la fermentación espontánea[81].

3.4.2. Contribuciones de investigaciones previas

La mejora de la calidad de alimentos fermentados, como vino, cerveza, quesos, soya y embutidos, ha sido un área de interés constante en la investigación alimentaria. Y, se ha sugerido que la inoculación de levaduras como cultivos iniciadores del proceso de fermentación puede ser fundamental para garantizar la consistencia y calidad de estos productos[82]. Las fermentaciones controladas por inóculos de bacterias ácido lácticas y levaduras caracterizadas en estos alimentos han mostrado resultados positivos según evaluaciones de la calidad de estos alimentos [36,50,83]. Este enfoque permite sostener un bioproceso y obtener productos de mejor calidad.

El café, como producto fermentado, no es una excepción a esta tendencia. Investigaciones previas han demostrado que las fermentaciones controladas por inóculos de levaduras caracterizadas pueden mejorar significativamente la calidad y el perfil sensorial del café[41,84]. Por lo tanto, es importante determinar las especies microbianas persistentes en la fermentación del café para mejorar el bioproceso y potencialmente utilizarlas como inoculantes en fermentaciones controladas.

Avallone et al. 2001[85] encontraron en la fermentación de granos de café en México géneros como *Kloeckera, Candida* y *Cryptococcus* que son encontradas en plantas generalmente. Mientras que la investigación de Masoud y Jespersen, 2006[86] han identificado cepas de levaduras, especialmente del género *Pichia*, que producen enzimas degradadoras de pectina y que podría contribuir al proceso de fermentación y a la calidad del café. Además, sugiere que esta capacidad enzimática podría relacionarse con la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos no deseados al descomponer su pared celular y dificultar su crecimiento y supervivencia en al ambiente de fermentación del café.

Melo et al., 2014[11] en la fermentación del café por vía húmeda en Brasil, aislaron *Pichia fermentans* como especie predominante seguida por *Candida glabrata, C. quercitrusa, Saccharomyces sp. Pichia guilliermondii, P. caribbica,* y *Hanseniaspora opuntiae sp*.. Carvahlo et al. 2017[84] reportaron por primera vez la presencia de *Hanseniaspora vineae* en la fermentación del grano de café y que es productor de aroma gracias a la cantidad de ésteres de acetato.

En la Tabla 7 se muestran las levaduras presentes en el proceso de fermentación que han sido identificadas en diferentes países.

Tabla 7. Especies de levaduras aisladas de la fermentación húmeda del café en diferentes países

País	Género o especie	Referencia
Colombia	*Kazachstania humilis, Torulaspora delbrueckii, Wickerhamomyces anomalus*	Madrid et al., 2022.
Perú	*Hanseniaspora, Pichia, Starmerella, Lachancea*	Pérez O., 2022.
Australia	*Hanseniaspora uvarum, Pichia kudriavzevii, Candida xylopsoci, Candida railenensis, Pichia fermentans, Wickerhamomyces anomalus*	Elhalis et al., 2020.
Colombia	***Pichia nakasei**, Malassezia sp., Schwanniomyces, Candida vanderwaltii y Dipodascus tetrasporeus*	Oliveira et al., 2019.
China	*Candida humilis, Candida quercitrusa, Candida solani, Cordyceps brongniartii, Hanseniaspora uvarum, Hanseniaspora vineae, Lachancea lanzarotensis, Papiliotrema terrestres, Pichia kluyveri, Saccharomyces cerevisiae, Starmerella bacillaris, Torulaspora delbrueckii, Wickerhamomyces anomalus*	Jiyuan et al., 2019.
Brasil	***Saccharomyces sp., Torulaspora delbrueckii , Pichia kluyveri ,** Hanseniaspora uvarum , H. vineae, Meyerozyma caribbica*	Carvahlo et al., 2017.
Brasil	***Pichia fermentans,** P. guilliermondii, P. caribbica, Hanseniaspora opuntiae. Candida glabrata, C. quercitrusa, Saccharomyces sp.*	Melo et al., 2014.
Tanzania	***Pichia kluyveri, P. Anomala, Hanseniaspora uvarum**, Candida pseudointermedia, Kluyveromyces marxianus, Issatchenkia orientalis, Torulaspora delbrueckii, Eremothecium coryli.*	Masoud et al., 2004.
México	***Kloeckera apis apicuata,** Cryptococcus laurentii, C. albidus, Candida guilliermondii.*	Avallone et al., 2001.
India	***Saccharomyces marxianus** (Kluyveromyces marxianus), S. bayanus, S. Cerevisiae var. ellipsoideus, Schizosaccharomyces spp*	Agate y Bhat 1966.

Letras en negrita indican las especies predominantes

En Colombia, Oliveira et al. 2019[87] realizaron la primera descripción de comunidades bacterianas y fúngicas en la fermentación de granos de café siendo más homogénea esta última ya que *Pichia nakasei* dominó el proceso y se le atribuye la producción de acetaldehído, mientras que en tiempos específicos del proceso se identificaron a *Malassezia sp., Schwanniomyces, Candida vanderwaltii* y *Dipodascus tetrasporeus*, la presencia de esta última fue asociada a su cercanía con la región costera de Colombia de donde se muestreo. Posteriormente, Madrid et al. 2022[88] identificaron diversos géneros presentes durante el proceso de fermentación de café tales como *Saccharomyces* y *Pichia* que lo asociaron con la producción de compuestos aromáticos que incluyen ésteres y alcoholes los cuales contribuyen a las características organolépticas distintivas del café.

En Perú, Sánchez 2018[14] en su evaluación del impacto de la dosis de levadura comercial *Saccharomyces sp* en el proceso de fermentación aseguró que 60 mL logró mejorar el puntaje en taza luego de la evaluación sensorial y además redujo el tiempo de fermentación. No obstante, los géneros de levaduras aisladas de la fermentación húmeda en regiones de Cajamarca y Amazonas incluyen *Hanseniaspora, Pichia, Starmerella* y *Lachancea* según Pérez 2022[13].

Estas contribuciones de la investigación previa demuestran la importancia de entender y controlar la fermentación del café mediante la inoculación de levaduras caracterizadas. La inoculación no solo garantiza la calidad y consistencia del producto final, sino que también puede reducir los costos de producción y permitir la producción de café diferenciado y estandarizado con perfiles de sabor nuevos y deseables[53].

IV. METODOLOGÍA

4.1. Área de estudio

La fermentación del café se llevó a cabo en el “Fundo San Vicente” ubicado en Alto Yurinaki en el valle del Perené de la provincia de Chanchamayo, zona tropical a 1500 m de altitud. Además, produce café de especialidad certificada por catadores “Q grader” acreditado por el Coffee Quality Institute – CQI. La producción de café en la zona se registra desde 1969, es de alta calidad debido a la mejora de la producción después de implementar nuevas tecnologías, selección de plantas según su potencial en taza y productividad, aplicación de diferentes sistemas de beneficio y aspectos agronómicos, entre otros.

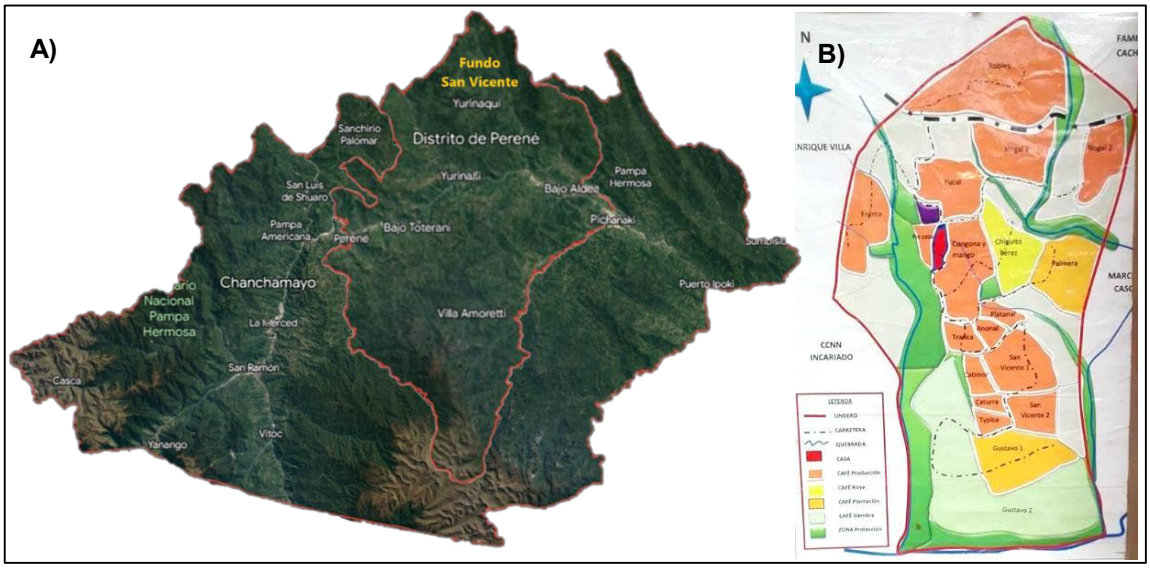


Figura 7. Fundo San Vicente en distrito de Perené – Chanchamayo. (A) Ubicación según Google Earth (B) Distribución de plantaciones del fundo

Las muestras fueron trasladadas manteniendo la cadena de frío al Laboratorio de Biología Molecular de la UNMSM-Lima, donde se realizaron los análisis correspondientes.

4.2. Materia prima

Los frutos de café fueron recolectados de plantaciones pertenecientes al “Fundo San Vicente” que cultivan café arábico 100 % (*Coffea arábica L.*) (Figura 8).



Figura 9. Plantaciones de café de la "Finca San Vicente". A) Filas de cafetos, (B) Árbol de cafeto.

Los frutos del café maduro y sin daños fueron seleccionados manualmente. El tiempo de cosecha fue aproximadamente de 4 h, debido a la variabilidad de maduración de los frutos en cada cafeto.



Figura 8. Cosecha de los frutos de café. (A) Cosecha manual de frutos de café, (B) Frutos de café.

Los frutos de color rojo fueron recolectados en canastos y costales, colocados en la sombra hasta su transporte a la zona de beneficio (Figura 9).

4.3. Diseño de la investigación

El estudio se diseñó como observacional descriptivo, con el objetivo de caracterizar fenotípicamente e identificar las levaduras presentes en el proceso de fermentación del café por vía húmeda.

4.3.1. Diseño muestral

- Población: Los frutos de café cosechados en un día en el Fundo San Vicente del distrito de Perené –Chanchamayo, con un total de 185 kg de café.
- Muestra: Para cada tiempo de fermentación, se recolectaron dos muestras de frutos de café en frascos estériles, lo que resulto en un total de 14 muestras durante el proceso de fermentación.
- Unidad de análisis: Cada muestra individual de frutos de café recolectada en los frascos estériles durante el proceso de fermentación, con el objetivo de aislar y caracterizar las levaduras presentes.

4.4. Metodología experimental

Los frutos cosechados se transportaron a la zona de beneficio, luego se colocaron en un tanque de recepción y verificó la calidad del fruto mediante los grados Brix. En seguida, se lavaron y seleccionaron por inmersión en agua donde los frutos no aptos flotaron y fueron retirados. Los de calidad se llevaron a una despulpadora mecánica para eliminar las cáscaras y pulpa (exocarpio y parte del mesocarpio). La semilla o “grano” se fermentó en un tanque de concreto revestido de mayólica.

La fermentación se realizó durante 18 h para eliminar el mucílago (parte del mesocarpio) adherido al grano, del proceso de fermentación se recolectaron muestras cada 3 h hasta las 18 h y conservaron en hielo (Figura 10).



Figura 10. Poza de fermentación espontánea del café, Fundo San Vicente en distrito de Perené, Chanchamayo

4.5. Métodos de análisis

4.5.1. Análisis fisicoquímicos

A las muestras del proceso de fermentación del café se les analizó la concentración de azúcares reductores según método de Miller et al., 1959[89] (anexo 1)y el pH empleando un potenciómetro según instrucciones del fabricante [72].

4.5.2. Recuento celular

Se realizó según la técnica de recuento en placas empleando el método de superficie, donde a matraces con 90 mL de agua salina peptonada estéril, se añadieron 10 mL del fermentado, homogenizó para obtener diluciones de 1/10 y a partir de ello se realizó diluciones seriadas. Posteriormente, el recuento celular fue por microscopía en cámara de Neubauer (anexo 2). Asimismo, se realizó el recuento de colonias viables usando medio YPD [extracto de levadura 1 %, glucosa 2 %, peptona 2 %, agar 2 % (p/v), pH 5,5] suplementado con cloranfenicol 100 mg/L y fueron incubadas en aerobiosis a 30 °C por 48 h (anexo 3)[90].

4.5.3. Aislamiento de levaduras del café

- **Aislamiento primario**

Se realizó la siembra en superficie a partir de diluciones seriadas de las muestras y se sembró en placas petri con medio YPD [extracto de levadura 1 % , glucosa 2 %, peptona 2 %, agar 2 % (p/v), pH 5,5] (MilliporeSigma, Bedford, MA, USA) suplementado con cloranfenicol 100 mg/L para la inhibición de bacterias e incubó a 30 °C en aerobiosis de 2 a 3 días[91].

- **Aislamiento en cultivo puro**

Mediante la técnica de agotamiento de estría por tres pasajes sucesivos, cada aislado fue sembrado en medio YPD. Se aislaron cinco colonias de cada placa en base a diferencias macroscópicas tales como tamaño, color, forma, borde y apariencia de las colonias. Los aislados se conservaron en YPD con glicerol 25 % (v/v) a -80 °C, y en medio YPD[11].

- **Selección de levaduras del café**

Se seleccionaron los aislados con características morfológicas y fisiológicas distintivas. Los aislados seleccionados se codificaron y conservaron en caldo YPD con glicerol (Difco) 25 % (v/v) por duplicado a -80 °C[9,11,61].

4.5.4. Caracterización morfológica de levaduras

En los ensayos se usaron cultivos en fase de crecimiento exponencial por triplicado.

- **Observación microscópica**

Para ello, los aislados se cultivaron en caldo YPD pH 5,5 e incubados a 30 °C por 24 h. Luego para una mejor visibilidad en el microscopio óptico se realizó la tinción Gram y observó al microscopio a un aumento de 100 X empleando aceite de inmersión[77,92].

- **Observación macroscópica**

El crecimiento se realizó en medio YPD pH 5,5 a 30 °C por 48 h en aerobiosis. Los cultivos evidenciaron turbidez, formación de sedimento, película superficial, y presencia de gas[93,94].

La morfología de la colonia se determinó en medio YPD pH 5,5; 30 °C en aerobiosis por 48 h. Después, se observó forma, aspecto, bordes, superficie, tamaño y color[58]. Además, se evaluó el crecimiento en Agar nutriente WL (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) a pH 6,5 en aerobiosis a 30 °C por 4 días. En este medio se observó la morfología colonial y los distintos tonos de coloración[93].

4.5.5. Caracterización fisiológica de levaduras

Las levaduras se cultivaron en placas Petri con medio YPD modificado según ensayo. Estos simularon diferentes condiciones de estrés que ocurren durante la fermentación húmeda de los granos de café. Los experimentos se hicieron por triplicado.

a) Tolerancia a la temperatura

Las levaduras se cultivaron en placas con medio YPD e incubaron a temperaturas de 25, 30, 37 y 43 °C durante 48 h en aerobiosis[11,58].

b) Tolerancia a concentraciones de glucosa

Al medio YPD se añadió glucosa al 15 %, 30 % y 50 %. Luego se sembraron las levaduras e incubaron a 30 °C por 48 h en aerobiosis[11].

c) Tolerancia a etanol

Para determinar la tolerancia al etanol se cultivaron las levaduras en placas con medio YPD pH 5,5 conteniendo 0 %, 4 %, 6 %, 8 %, y 10 % de etanol. Este reactivo, fue añadido en un ambiente estéril y enfriado a aproximadamente 45 °C. Posteriormente se sembraron los aislados e incubaron a 30 °C durante 48 h en condición aeróbica y debidamente selladas con parafilm[11,62,94].

d) Tolerancia al pH

Los cultivos activos fueron inoculados en caldo YPD modificado; donde se usó como medio diluyente soluciones Buffer correspondientes según cada pH a analizar: buffer acetato a pH 2,0 y 4,0; buffer fosfato a pH 6,0; y buffer Tris-HCl a pH 8,0. Los ajustes del pH se realizaron con HCl a 0,1 M o NaOH 0,1 M estéril. Luego, fueron incubados aeróbicamente a 30 °C por 48 h[11].

e) Tolerancia a ácidos orgánicos

El crecimiento de levaduras en presencia de ácidos orgánicos se realizó en medio YPD esterilizado, se dejó enfriar hasta 45 °C y en esterilidad se añadió ácido láctico al 1 %, 2 % y 3 %. El procedimiento se realizó con ácido acético al 1 %, 2 % y 3 %. Las placas se incubaron a 30 °C por 48 h a condiciones aeróbicas[11,58].

f) Capacidad pectinolítica

Las levaduras se cultivaron en medio YPD enriquecido con pectina (Sigma) (anexo 4) e incubaron a 30 °C durante 48 h en aerobiosis. Después, a las placas se añadió HCl 6 M. Las levaduras que formaron un halo transparente alrededor de las colonias fueron positivas[57,86,95]. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

4.5.6. Caracterización molecular de levaduras

a) Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico se realizó por dos métodos: Primero, mediante un kit comercial Quick-DNA TM fungal/bacterial miniprep (Zymo Research) siguiendo el protocolo del fabricante, y segundo, por solventes orgánicos usando el protocolo de Querol et al., 1992[96] modificado (anexo 5).

b) Análisis molecular a nivel de cepa mediante polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción – reacción en cadena de la polimerasa (RFLP-PCR)

La identificación se realizó con la técnica RLFP-PCR de la región 5,8S-ITS empleando como cebadores a ITS1 (5'- TCCGTACGTGAACCTGCGG - 3') e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3') descritos por Esteve-Zarzoso et al., 1999[97] (anexo 6).

Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en geles de agarosa (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) a 1 % (p/v) en tampón TBE 1X (Tris 0,9 M; ácido bórico 0,9 M; EDTA 20 mM; pH 8,0). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio 10 µg/mL y fueron observados a través de un transiluminador UV (UVP Ultra-Violet Products).

Los ADN amplificados fueron digeridos con la enzima *Hae-III.* Los fragmentos de restricción fueron separados por electroforesis en geles de agarosa 3 % (p/v) usando buffer TBE 1X. Como marcador de peso molecular se usó el marcador GeneRuler 100 pb plus DNA Ladder (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). Los geles fueron coloreados con bromuro de etidio y observados por luz UV.

c) Secuenciación de la región 5,8S-ITS

Los productos amplificados fueron secuenciados por servicio en Macrogen (USA) en condiciones estandarizadas. Posteriormente, se analizó la calidad de los cromatogramas, editó manualmente y analizó la secuencia utilizando la herramienta bioinformática "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST) para determinar homología con las secuencias reportadas en el GenBank (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

4.5.7. Análisis estadístico

Los ensayos fueron llevados a cabo en tres repeticiones de manera aleatoria, y los resultados se muestran como promedios acompañados de su respectivo error estándar. El análisis de los datos se efectuó utilizando la herramienta de hoja de cálculo Excel.

V. RESULTADOS

5.1. Fermentación espontánea del café del distrito de Perené

A partir de las muestras de fermentación espontánea del café a las 0, 3, 6, 9, 12 y 18 h se determinaron las características fisicoquímicas del proceso y el análisis microbiológico, morfológico, fisiológico y molecular.

5.1.1. Características fisicoquímicas

La fermentación espontánea de café en el Fundo San Vicente (Perené, Chanchamayo, Perú) utilizó frutos con alrededor de 18 °Brix que fueron despulpados y fermentados en condiciones de temperatura entre 17 y 20 °C durante 18 h. Las muestras permitieron determinar la variación de la concentración de azúcares reductores y el pH durante la fermentación espontánea del café por vía húmeda (Figura 11).

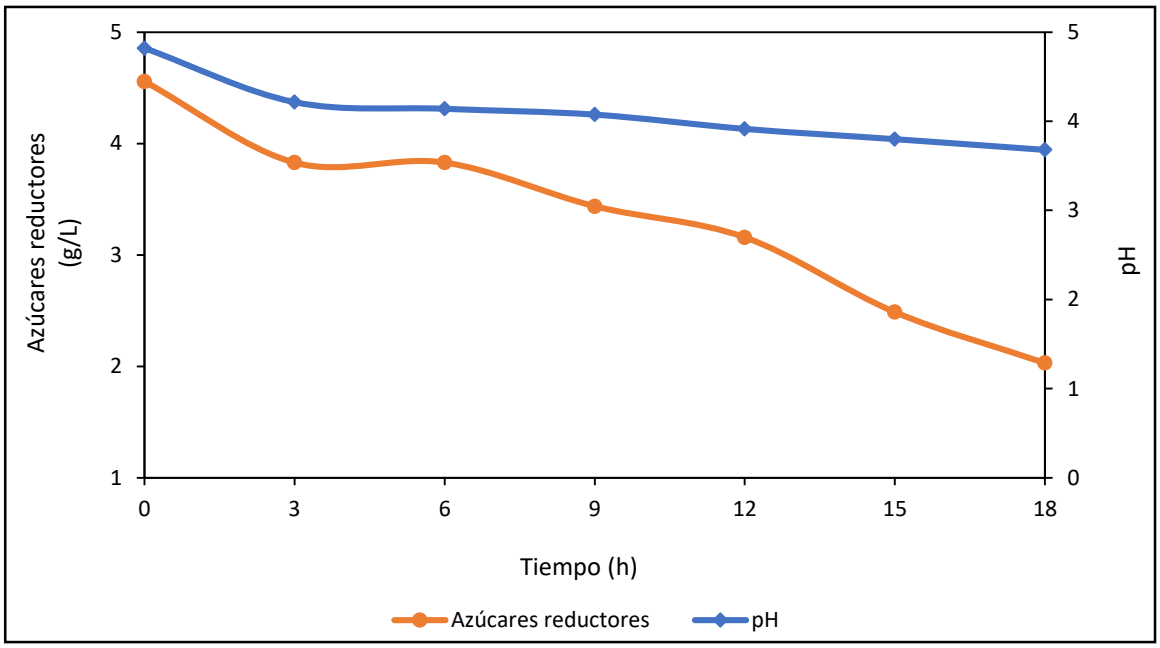


Figura 11. Variación de la concentración de azúcares reductores y el pH durante la fermentación espontanea del café por vía húmeda

En la Figura 11 se observa que, al inicio de la fermentación el pH y los azúcares reductores fueron de 4,82 ± 0,08 y 4,56 ± 0,03 g/L respectivamente. Estos disminuyeron progresivamente y al término del proceso, se registró valores finales de pH 3,68 ± 0,03 y azúcares reductores 2,03 ± 0,01 g/L en 18 h de fermentación.

5.1.2. Recuento celular

En la Figura 12, se presenta la evolución de la población de levaduras durante las 18 h de fermentación del café. Se inició con una población de levaduras de 6,19 log_{10} UFC.mL^{-1} en los frutos de café despulpados sumergidos en agua sin fermentar. Con respecto a la evolución de la fermentación espontánea, la población de levaduras presento el recuento más alto a las 3 h con 6,84 log_{10} UFC.mL^{-1} y luego disminuyó ligeramente a las 6 h manteniéndose relativamente constante hasta 15 h, luego a las 18 h finalizó con 6,13 log_{10} UFC.mL^{-1} (Figura 12).

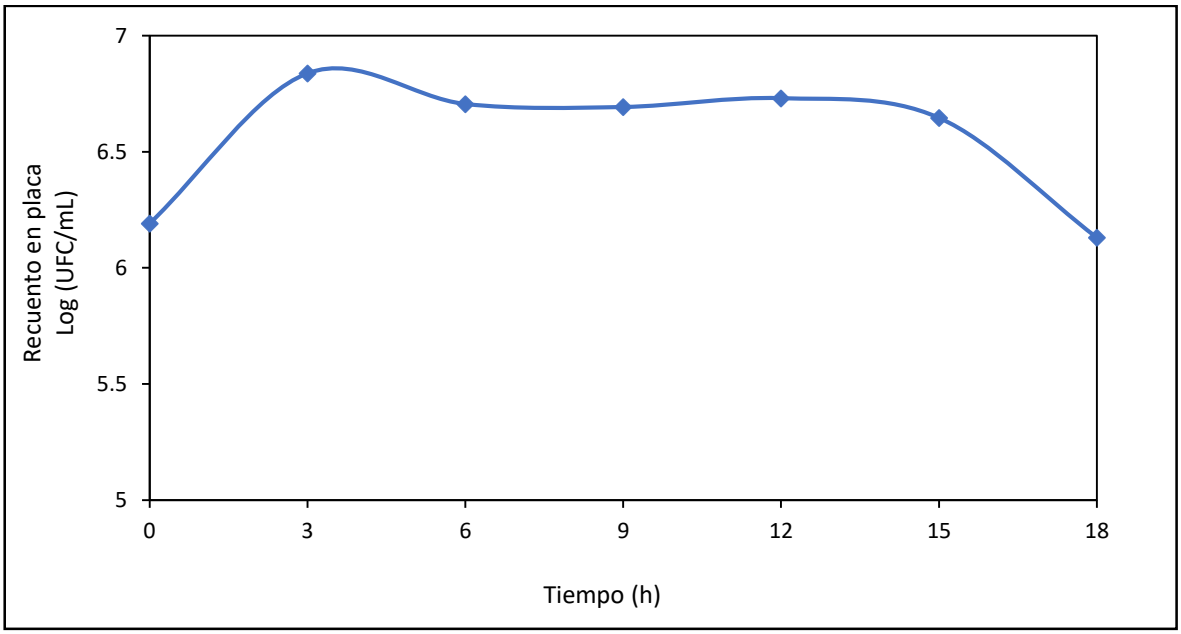


Figura 12. Evolución de la población de levaduras durante la fermentación espontánea del café por recuento en placa (YPD)

5.2. Caracterización fenotípica de las levaduras aisladas de la fermentación espontánea del café

5.2.1. Caracterización morfológica de las levaduras

Las levaduras aisladas fueron observadas al microscopio y se obtuvieron morfologías ovalada, esférica y elipsoidal. Además, en algunas fue posible presenciar pequeñas yemas como parte de una forma de reproducción. En la Figura 13 (A) perteneciente a la cepa MH 1 se observa células elipsoidales, mientras que en (B) la cepa MH 10 presentó forma esférica.

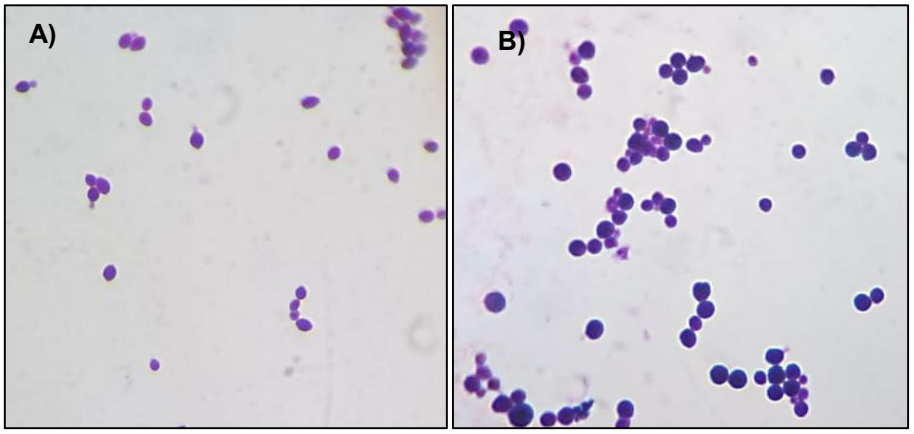


Figura 13. Microscopia óptica (100 X) de levaduras**.** (A) Cepa MH 1, (B) cepa MH

En caldo YPD algunas levaduras formaron película y producir gas (Tabla 8).

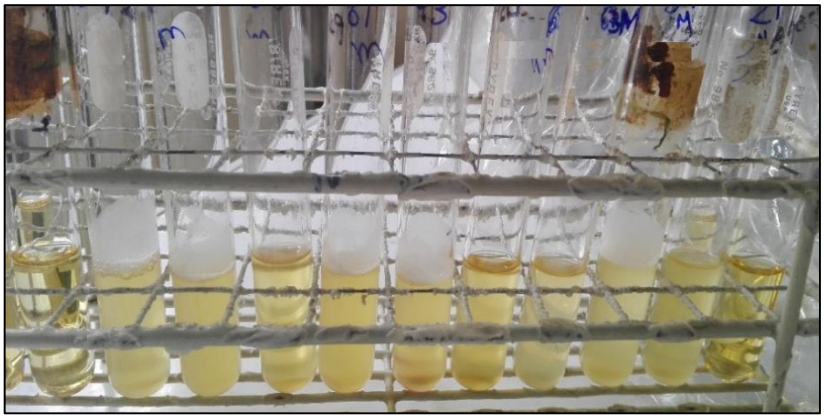


Figura 14. Crecimiento en caldo YPD de levaduras aisladas de frutos de café (*Coffea arábica L.)*

La identificación macroscópica de los 24 aislados mostraron colonias donde el 87,5 % posee una forma circular, el 62,5 % borde entero, y el color crema representó un 62,5 % de las cepas totales. Además, la caracterización morfológica en medio YPD exhibió diferentes morfotipos, de los cuales el género *Pichia* presentó el mayor número y el menor fueron las cepas del género *Torulaspora* y *Starmerella*.

Las características de crecimiento de las levaduras en medio YPD exhibieron colonias de color blanco o crema con tamaños entre 1 a 4 mm, de forma circular con bordes enteros o dentados, irregulares o puntiformes, aspectos brillantes u opacos, y con superficie lisa o rugosa (Tabla 8 y Figura 15).

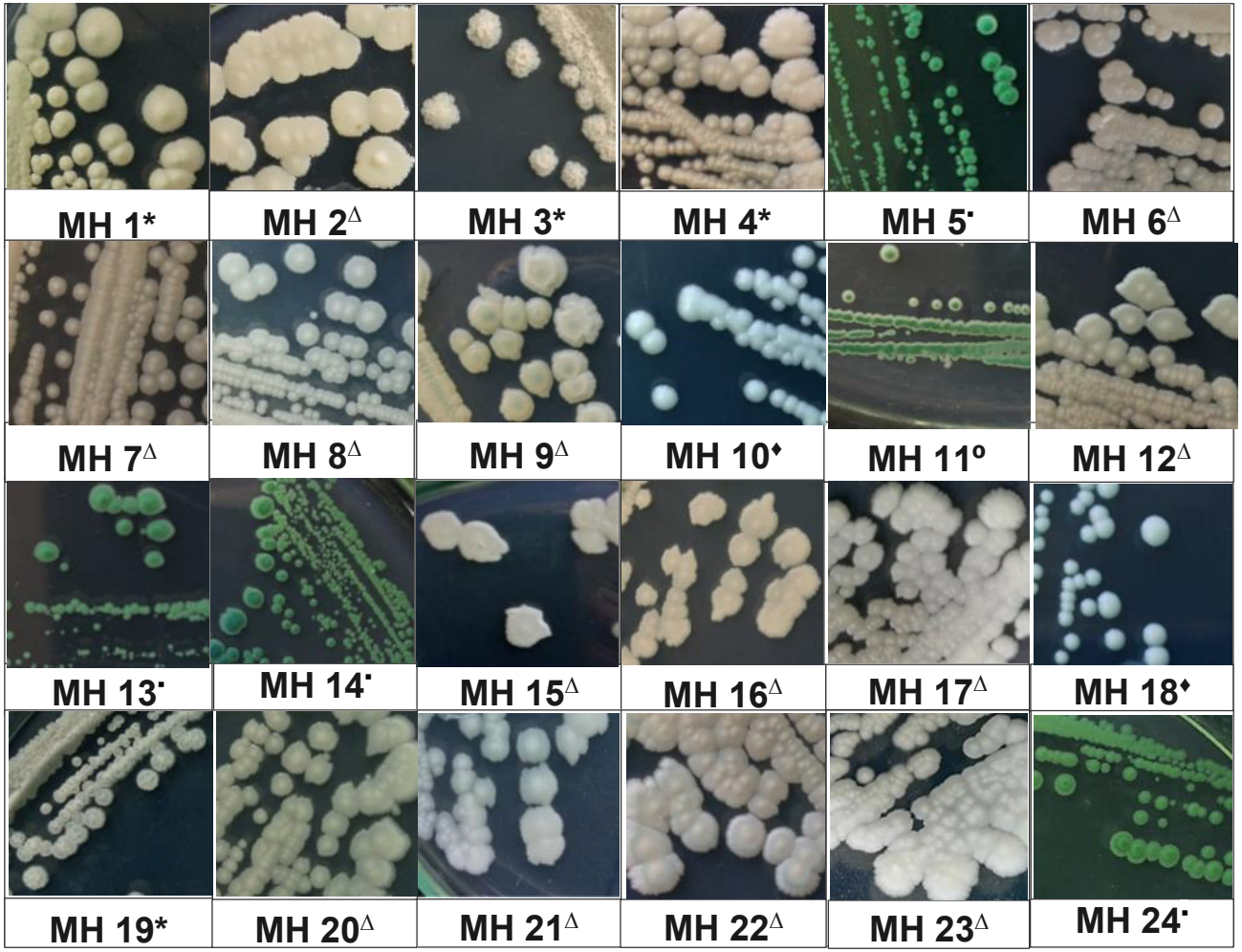


Figura 15. Formación de colonias de levaduras en colonia aisladas de café sobre medio YPD

Tabla 8. Características de las levaduras aisladas de la fermentación espontánea del café del distrito de Perené-Chanchamayo

Cepa	Grado turbidez celular	Formación de película	Producción de gas	Colonia					
				Tamaño colonia (mm)	Aspecto	Superficie	Color	Forma	Borde
MH 1	+	-	-	1- 2	Brillante	Lisa	Crema	Circular	Entero
MH 2	+++	+	-	2-3	Opaco	Lisa	Blanco	Circular	Entero
MH 3	+++	+	+	2-3	Opaco	Rugosa	Crema	Irregular	Ondulado
MH 4	+++	-	+	1-2	Brillante	Lisa	Crema	Circular	Entero
MH 5	+	+	+	3-4	Brillante	Lisa	Crema	Circular	Entero
MH 6	+++	+	+	2-4	Opaco	Rugosa	Crema	Circular	Dentada
MH 7	++	+	+	2-3	Opaco	Lisa	Crema	Circular	Dentada
MH 8	+++	+	+	2-3	Opaco	Lisa	Crema	Circular	Dentada
MH 9	+++	+	-	2-3	Opaco	Rugosa	Crema	Circular	Dentada
MH 10	+++	-	+	1-2	Brillante	Lisa	Blanco	Circular	Entero
MH 11	+	-	-	1	Brillante	Lisa	Blanco	Puntiforme	Entero
MH 12	+++	-	-	2-4	Opaco	Lisa	Crema	Circular	Dentada
MH 13	+++	+	+	3-4	Opaco	Rugosa	Blanco	Circular	Entero
MH 14	+++	+	-	3-4	Opaco	Rugosa	Blanco	Circular	Entero
MH 15	+++	+	+	2-3	Opaco	Rugosa	Crema	Circular	Dentada
MH 16	+++	-	+	2-3	Opaco	Lisa	Crema	Circular	Entero
MH 17	+	-	-	1-2	Brillante	Lisa	Blanco	Circular	Entero
MH 18	++	-	+	1-2	Brillante	Lisa	Blanco	Circular	Entero
MH 19	+++	+	-	2-3	Opaco	Rugosa	Crema	Irregular	Ondulado
MH 20	++	+	+	2-3	Opaco	Lisa	Crema	Circular	Entero
MH 21	+++	-	-	2-3	Opaco	Rugosa	Crema	Circular	Dentada
MH 22	+	-	-	1-2	Brillante	Lisa	Blanco	Circular	Entero
MH 23	+	+	+	2-3	Opaco	Lisa	Crema	Circular	Entero
MH 24	+++	+	+	3-4	Opaco	Rugosa	Blanco	Circular	Entero

- Caldo YPD a 30 °C y 24 h cultivo. Grado de turbidez celular: +, poco; ++, intermedio, +++, alto. Producción de película o gas: +, sí; -, no.



* *Cándida,* Δ *Pichia,* · *Hanseniaspora,* ♦ *Torulaspora,* ° *Starmerella*. Agar nutritivo WL

Figura 16. Características macroscópicas de las levaduras aisladas de la fermentación espontánea del café del distrito de Perené-Chanchamayo

Asimismo, el crecimiento y las características de cada aislado en el agar nutriente WL presentó diferencias en sus características morfológicas que fueron más evidentes y facilitaron la agrupación de algunas cepas de un mismo género (Figura 16).

En la Figura 16 se observa que las colonias de levaduras presentan diversas tonalidades de color, también evidencian diferencias en los bordes, superficie, consistencia, tamaño, etc.

Las cepas MH 10 y MH18 comparten similitudes en el medio nutritivo WL, estas son de color verde pálido, de aspecto lisas, brillosas y tamaños de 2 mm e identificadas dentro del género *Torulaspora*. Por otro lado, los aislados MH5, MH13, MH14 y MH24 identificadas como *Hanseniaspora* mostraron colonias circulares con coloración verde oscuro, tamaño de 1 a 2 mm y de superficie lisa, mientras que MH 11 identificada como *Starmerella* presentó forma puntiforme y color verde oscuro (Figura 16).

5.2.2. Caracterización fisiológica de levaduras

a) Tolerancia a diferentes factores

De la prueba de tolerancia a la temperatura, el 67 % de las cepas crecieron a 37 °C, mientras que a 43 °C no hubo crecimiento. Con respecto al crecimiento en medio YPD con glucosa 50 % sólo la cepa MH21 no creció. El 100 % de las cepas crecieron en medio YPD con etanol 4 %, mientras que al 10 % de etanol fue 42 % (Tabla 9).

Con referencia al pH el 92 % de las levaduras aisladas crecieron a pH 6,0 y 8,0 mientras sólo el 45 % a pH 2,0. Asimismo, en presencia de ácido acético 1 % se inhibió el crecimiento mientras que en ácido láctico 3 % inhibió al 20 % de las cepas.

Tabla 9. Tolerancia a condiciones de estrés en levaduras aisladas de la fermentación húmeda del café de Perené – Chanchamayo

Cepa	Temp	Glucosa	Etanol[a]		pH[b]		Ac. Láctico 3
	37 °C	50 %	8 %	10 %	2,0	4,0	%
MH 1	-	+	+	-	-	-	+
MH 2	+	+	+	-	-	+	+
MH 3	+	+	+	-	-	+	+
MH 4	-	+	-	-	+	-	+
MH 5	-	+	-	-	+	+	+
MH 6	+	+	-	-	+	+	+
MH 7	+	+	-	-	+	+	+
MH 8	+	+	+	-	+	+	+
MH 9	+	+	+	+	+	+	+
MH 10	+	+	-	-	+	+	+
MH 11	+	+	+	+	+	+	+
MH 12	+	+	+	+	+	+	+
MH 13	-	+	-	-	-	-	-
MH 14	+	+	+	+	-	+	+
MH 15	+	+	+	-	-	-	+
MH 16	+	+	+	+	-	+	+
MH 17	-	+	+	-	-	-	-
MH 18	-	+	+	+	-	+	-
MH 19	+	+	-	-	+	+	-
MH 20	+	+	+	+	+	+	+
MH 21	+	-	+	+	-	-	+
MH 22	-	+	+	+	-	+	+
MH 23	-	+	-	-	-	+	+
MH 24	+	+	+	+	-	+	-

[a]Etanol - tolerancia a 8 y 10 %; [b]Crecimiento en diferentes niveles de pH

b) Capacidad pectinolítica

La cepa MH 10 hidrolizó este sustrato después de 48 h (Figura 17).

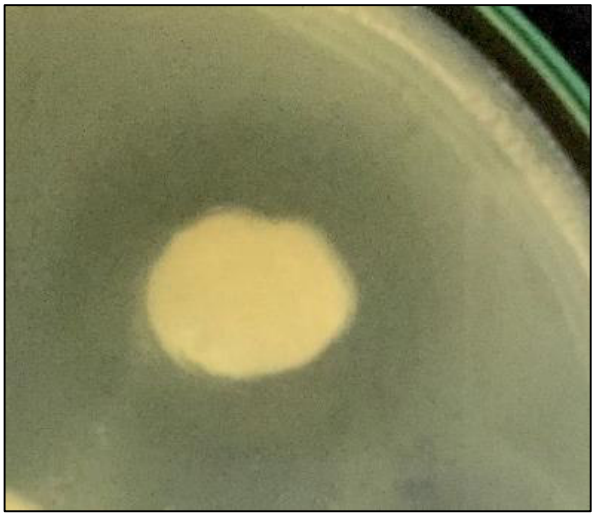


Figura 17. Halo de hidrólisis de la levadura MH 10 en medio enriquecido con pectina

En general, las levaduras aisladas mostraron la capacidad de crecer en condiciones hostiles similares al proceso fermentativo. Además, se investigaron algunos rasgos fenotípicos sobre la base de los cambios fisicoquímicos que afrontan las levaduras durante la fermentación.

5.3. Caracterización molecular

5.3.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico mediante solventes orgánicos se observa en la Figura 18. La variación de las concentraciones depende de la naturaleza de cada levadura. Asimismo, la extracción de ADN usando el kit comercial permitió obtener concentraciones homogéneas en todas las cepas.

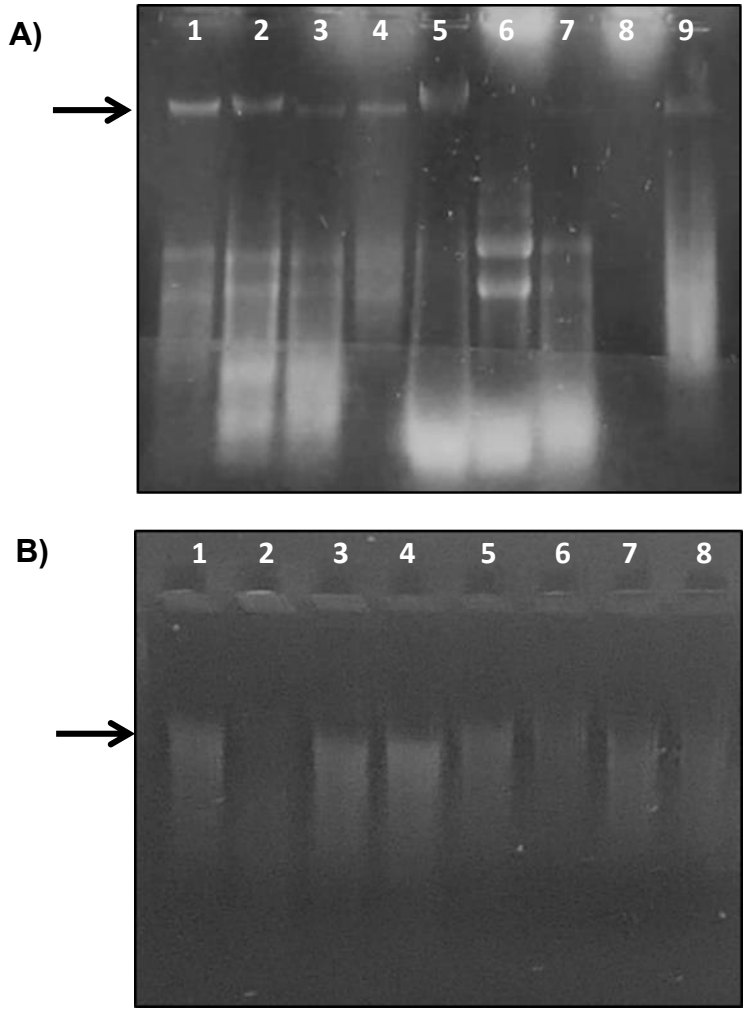


Figura 18. Gel de agarosa 1 % mostrando el ADN genómico de las levaduras extraídas. (A) Solventes orgánicos, (B) Kit comercial.

5.3.2. Análisis RFLP-PCR

Los genes ribosómicos 5,8S y las regiones intergénicas colindantes se amplificaron empleando cebadores ITS-1 e ITS-4. Se encontraron productos de PCR de peso molecular aproximado de 800 pb y 600 pb (Figura 19). Los productos amplificados de la región 5,8S-ITS fueron digeridos con *Hae-III* y separados por electroforesis en geles de agarosa 3 %.

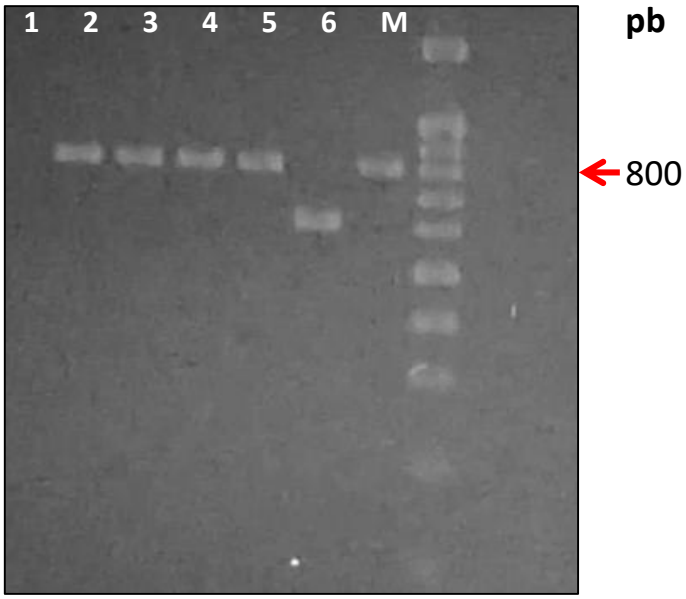


Figura 19. Gel de agarosa 1,5 %mostrando la región 5,8S-ITS amplificada por PCR de levaduras aisladas de la fermentación espontánea de café de Perené-Chanchamayo. Líneas: M, ladder 100 pb; 1-6, región 5,8 S-ITS.

Los productos amplificados de la región 5,8S-ITS fueron digeridos con *Hae-III* y separados por electroforesis en geles de agarosa 3 %, de esta forma se obtuvieron cinco perfiles de restricción con fragmentos entre 450 y 800 pb. Así, las cepas pertenecientes a los géneros *Torulaspora* y *Hanseniaspora* presentaron fragmentos de 800 pb y 750 pb respectivamente, *Candida* de 600 pb, mientras que *Starmerella* de 500 pb y *Pichia* de 450 pb (Figura 20).

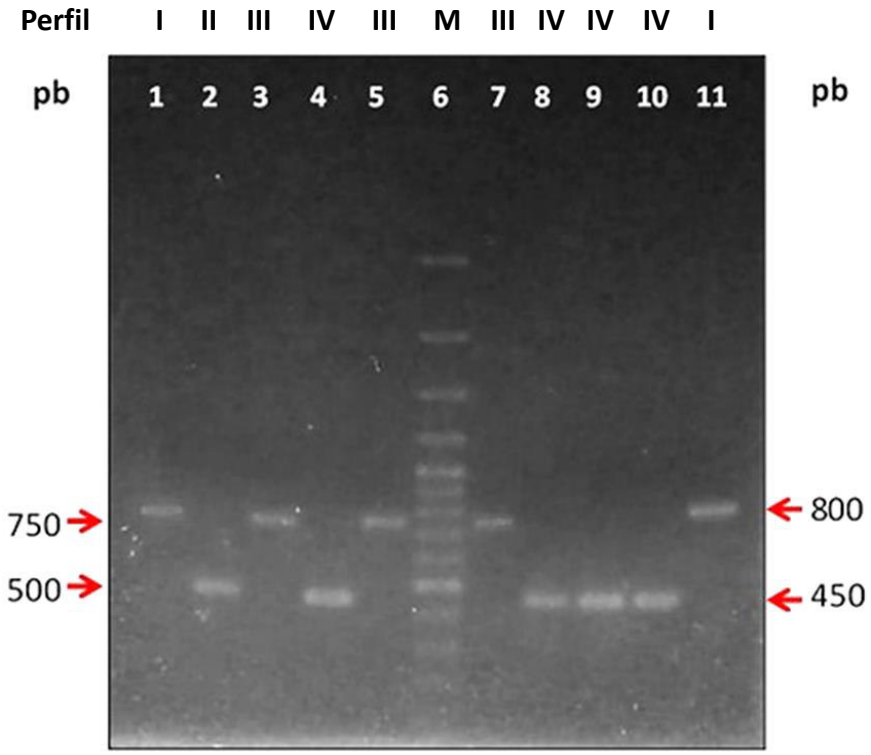


Figura 20. Gel de agarosa 3 % mostrando el patrón de digestión por *Hae-III* de la región 5,8S-ITS amplificada de las levaduras aisladas. Líneas: 1, MH 10; 2, MH 11; 3, MH 5; 4, MH 12; 5, MH 13; 6, Marcador 100 pb; 7, MH 14; 8, MH 15; 9, MH 16; 10, MH 17; 11, MH 18.

5.3.3. Secuenciación de la región 5,8S-ITS

El análisis de las secuencias de la región 5,8S-ITS de las levaduras aisladas de la fermentación húmeda del café indica la agrupación en número de perfiles que corresponden a diferente género así perfil I, *Torulaspora* (2); II, *Starmerella* (1); III, *Hanseniaspora* (4); IV, *Pichia* (13); V, *Cándida* (4) (Tabla 10).

Tabla 10. Perfiles de restricción de la región 5,8S-ITS de las levaduras aisladas de la fermentación húmeda del café de Perené -Chanchamayo

Perfil de restricción	Fragmento ADN (pb)	Cepas	Género
I	800	MH 10, MH 18	*Torulaspora*
II	500	MH 11	*Starmerella*
III	750	MH5, MH13, MH14, MH24	*Hanseniaspora*
IV	450	MH 2, MH 6, MH7, MH8, MH9, MH12, MH15, MH16, MH17, MH20, MH21, MH22, MH23	*Pichia*
V	600	MH 1, MH 3, MH 4, MH 19	*Candida*

El porcentaje de similitud de las secuencias nucleotídicas de la región 5,8S -ITS en todas las cepas fue mayor a 94 %. Por ejemplo, las cepas MH2 y MH22 presentaron 100 % de similitud con el género *Pichia* (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis de las secuencias nucleotídicas de la región 5,8S-ITS de levaduras aisladas de la fermentación húmeda del café de Perené- Chanchamayo.

Código cepa	Perfil de restricción 5.8S-ITS	Género	Similitud de secuencia (%)
MH 1	V	*Candida*	98,41
MH 2	IV	*Pichia*	100,00
MH 3	V	*Candida*	99,64
MH 4	V	*Candida*	99,31
MH 5	III	*Hanseniaspora*	95,83
MH 6	IV	*Pichia*	99,75
MH 7	IV	*Pichia*	98,38
MH 8	IV	*Pichia*	99,47
MH 9	IV	*Pichia*	97,66
MH 10	I	*Torulaspora*	99,45
MH 11	II	*Starmerella*	99,53
MH 12	IV	*Pichia*	99,79
MH 13	III	*Hanseniaspora*	97,39
MH 14	III	*Hanseniaspora*	94,42
MH 15	IV	*Pichia*	96,38
MH 16	IV	*Pichia*	98,18
MH 17	IV	*Pichia*	99,50
MH 18	I	*Torulaspora*	99,35
MH 19	V	*Candida*	99,63
MH 20	IV	*Pichia*	94,40
MH 21	IV	*Pichia*	99,75
MH 22	IV	*Pichia*	100,00
MH 23	IV	*Pichia*	98,97
MH 24	III	*Hanseniaspora*	99,00

VI. DISCUSIÓN

El fundo San Vicente del distrito de Perené – Chanchamayo se encuentra en una región tropical a una altitud de 1500 m.s.n.m., dentro de lo recomendado para el cultivo de café que es entre 1500 y 1800 m.s.n.m., lo cual garantiza perfiles de taza con mejor sabor[47]. Asimismo, las condiciones de la fermentación húmeda del café fueron entre 17 y 20 °C durante 18 h, ya que a mayor temperatura se pueden desarrollar características organolépticas desfavorables[36,44]. Estudios previos como el de Camizán et al. 2020[98], indican que prolongar el tiempo de fermentación, entre 20 y 24 h puede impactar en la calidad sensorial en algunas variedades de café. En algunos casos, el incremento del tiempo de fermentación no afecta los perfiles del café cuando el pH final esté entre 3,7 y 4,1; margen considerado seguro y adecuado para finalizar el proceso[99]. Sin embargo, el rango óptimo de acidez no garantiza las características organolépticas deseadas[100]. Por ello, en el fundo San Vicente del distrito de Perené la finalización de la fermentación es a las 18 h, sobre la base de pruebas organolépticas del producto y el nivel de acidez[84]

Por otro lado, la disminución del pH se debe a la aparición de ácidos orgánicos como el ácido láctico registrado a las 16 h[78]. Esta variación fue de 4,82 ± 0,08 a 3,68 ± 0,03 similar a lo reportado a la fermentación espontánea del café en Amazonas[13] (Figura 11). En este contexto, el cambio de pH depende de la variedad de café, el clima y la zona geográfica. Así, estudios en Nicaragua indican pH inicial 5,6 y final 4,6; en tanto en México fue de 6,3 a 4,1[85,101]. Todos estos valores están próximos a los rangos óptimos de fermentaciones controladas del café en sistemas abiertos por vía húmeda entre 18 a 30 h de fermentación, siendo el inicial de 5,3 a 5,6 mientras que el final de 3,9 a 4,2[37]. De igual forma Jackels & Jackels 2005[101], consideran el pH 4,6 como indicador de finalización de la fermentación. El descenso del pH en la fermentación es consecuencia de la producción de los ácidos láctico, acético, entre otros por efecto de la hidrólisis de los azúcares del mucílago[99].

Con respecto a azúcares reductores (Figura 11), la concentración disminuyó de 4,56 ± 0,03 g/L a 2,03 ± 0,01 g/L a las 18 h de fermentación. Sin embargo, Córdoba et al.[102] reportaron al inicio 7 g/L y al termino 2,4 g/L a las 24 h. En este aspecto, el mucílago contiene alrededor de 4,16 % y 2,59 % de azúcares reductores y no reductores respectivamente[99]. Según Puerta et al. 2012[99], el 14 % de azúcares

reductores iniciales y 16 % de azúcares totales es degradado a las 20 h de fermentación a 20,5 °C. Estos cambios incluyen oxidación de azúcares por las levaduras durante la fermentación, que conlleva la formación de dióxido de carbono, etanol y compuestos aromáticos[99,103]. Durante el tostado del café, estos compuestos contribuyen a la formación de aromas y sabores mediante la reacción de Maillard, que involucra azúcares y aminoácidos derivados de la fermentación[104]. Por ello, la fermentación húmeda de los granos de café ha demostrado impactar en el sabor, el aroma y la calidad sensorial del café donde las levaduras determinan las características sensorialmente al producir metabolitos y compuestos aromáticos deseables[80,105].

Con referencia al recuento total de levaduras durante la fermentación (Figura 12), al inicio fue de 6,19 log UFC/mL y al final 6,13 log UFC/mL. Estos valores se asemejan a los reportados por Elhalis et al. 2021[12], quienes encontraron 5,5 log UFC/mL al inicio y 7,3 log UFC/mL a las 36 h a 25 °C en el día y 12 °C durante la noche. Carvahlo et al. 2017[84] reportaron al inicio 6,60 log UFC/mL y a las 48 h 7,89 log UFC/mL a 23 °C. En consecuencia, la carga de levaduras durante la fermentación del café esta entre 2 a 7 log UFC/mL, lo cual depende de la variedad del café, la zona geográfica, el suelo, la concentración y el tipo de azúcares reductores, la temperatura, entre otros[11,74,79,84,85]. Asimismo, la población inicial de levaduras depende de diversos factores, como la calidad y el grado de maduración de los frutos, la variedad de la planta, la higiene del tanque de fermentación, los utensilios utilizados y la calidad del agua utilizada al inicio del proceso[10,11].

A nivel de análisis morfológico, las 24 levaduras aisladas presentaron rasgos distintivos en las colonias, destacando formas circulares o irregulares de 1 a 3 mm, opacas, de color blanco y elevación plana o elevada en medios sólidos[61,68,106](Tabla 8). La variabilidad morfológica observada se debe a diferencias genéticas inter e intraespecíficas, condiciones de cultivo y tiempos de incubación**.** Por ejemplo, el agar nutriente WL es utilizado para la discriminación rápida en base a la morfología y el color de la colonia[107] (Figura 16). De este modo, *Hanseniaspora* presenta colonias verdes oscuro de aspecto liso y opaco, mientras que las de *Torulaspora* son verde claro coincide con Martín, 2022[108] quien reconoció *H. uvarum* y *Torulaspora* con estas características. Además, se evidenció diferentes sombras

de color verde en algunas cepas del género *Pichia* (MH9 Y MH22) y en una cepa de *Candida* (MH 1). Estos podrían no ser necesariamente diferentes cepas sino pequeños mutantes como indica el reconocimiento de levaduras de la RESOLUCIÓN OIV/OENO 206/2010.

En cuanto a las pruebas de tolerancia, se evaluó la capacidad de las levaduras para crecer ante factores de estrés como temperatura, pH, concentraciones de etanol, glucosa, ácido láctico y acético. De esta forma se observó que la mayoría de las cepas *MH2, MH6, MH7, MH8, MH9, MH12, MH15, MH16, MH17, MH20, MH21, MH22, MH23* pertenecientes al género *Pichia* (Tabla 9) demostraron crecimiento a 37 °C. Estas características resaltan la adaptabilidad de ciertas cepas a condiciones de estrés térmico. Por otro lado, *Hanseniaspora uvarum* fue la más aislada de fermentaciones húmedas de café en Tanzania, Brasil, China y Australia[11,74,80,81,85], cuyas colonias son blancas, cremosas y aspecto brilloso a las 72 h y 30 ºC[65,109] concordando con el aislado MH5 de este género.

En relación con la tolerancia al etanol, se encontró que cepas de los géneros *Pichia* y *Starmerella* toleraron concentraciones entre 8 % y 10 %, indicando su resistencia a ambientes con altos niveles de etanol (Tabla 9). Por su lado, *Torulaspora*, mostró resistencia moderada a etanol, mientras que cepas de *Candida* y *Hanseniaspora* presentaron tolerancia variable. Levaduras pertenecientes a los dos últimos géneros crecen al inicio de la fermentación cuando hay bajos niveles de etanol[109]. Asimismo, las levaduras aisladas demostraron alta capacidad para utilizar glucosa como fuente de carbono, lo que sugiere la fermentación de los azúcares presentes en el mucílago del café. De esta forma, la generación de ácidos orgánicos durante la fermentación es un aspecto primordial, destacando la importancia de mantener un pH adecuado para evitar sabores indeseables. La tolerancia a pH entre 4,0 y 8,0 muestra la adaptabilidad de las levaduras a condiciones variables[110]. No obstante, hay reportes de las condiciones para su mayor presencia como es el caso de *Hanseniaspora* y *Starmerella* a pH 3,71 y 17,4 °C mientras que las de *Pichia* es pH 4,69 y 18,5 °C[13]. La tolerancia a ácidos orgánicos es crucial ya que estos se acumulan durante la fermentación afectando el pH. Por ejemplo, los ácidos láctico y acético son producidos en 3,35 g/L y 1,27 g/L respectivamente a las 48 h de fermentación espontánea[84]. Las cepas, en especial MH 10 del género *Torulaspora*,

mostraron resistencia a ácido láctico 3 %, lo cual contribuiría a la estabilidad del proceso fermentativo del café (Tabla 9). Además, las cepas MH9, MH12 pertenecientes al género *Pichia* y la cepa MH 11 perteneciente al género *Starmerella* resistieron a todas las condiciones evaluadas demostrando su adaptabilidad a condiciones variables.

La capacidad pectinolítica de las levaduras permite la liberación de azúcares durante la fermentación del café[12,45] además de degradar el mucilago adherido al grano evidenciando la diversidad funcional en la fermentación[45,86,111–113]. Así, la cepa MH 10 perteneciente al género *Torulaspora* presentó alta actividad en placas de medio enriquecido con pectina (Figura 17), Marques, 2011[45] y Pereira et al., 2021[114] reportaron *T. delbrueckii* con esta capacidad, la otra cepa MH18 identificada con este género no presento esta actividad lo cual indica que esta levadura pertenece a una especie o variante diferente.

Las características fisiológicas y metabólicas de las levaduras nativas aisladas de la fermentación del café son importantes para conocer su potencial biotecnológico, no obstante, para la identificación se emplean técnicas moleculares. De este modo, se identificaron las 24 cepas aisladas mediante la amplificación por PCR de la región 5,8S-ITS y restricción con la enzima *Hae-III* (Figura 20); así como por secuenciación de esta región. Sobre la base del análisis de estas pruebas se determinó que las cepas aisladas pertenecen a cinco géneros. De igual forma, Melo et al., 2017[10] describen estos géneros de levaduras aisladas del beneficio húmedo del café. Asimismo, Elhalis & Zhao, 2020[78]; Oliveira et al., 2019[87]; Wang, 2019[115] y Pérez, 2020[13] reportaron diversos géneros implicados en la fermentación el café. Aunque, Madrid et al. 2022[88] indican que ciertas cepas son asociadas a un impacto positivamente en los sabores y aromas de cafés debido a la producción de metabolitos como ácidos orgánicos y esteres.

El análisis de la secuenciación de la región 5,8S-ITS de las 24 cepas de levaduras permitió agruparlas en los géneros: *Pichia, Candida, Hanseniaspora, Torulaspora* y *Starmerella* (Tabla 10). Así, especies de los géneros *Pichia* y *Candida* están asociados a frutos amazónicos. Mientras que, las de *Torulaspora* producen compuestos aromáticos y son usadas en la corrección de la acidez volátil del

vino[109,112]. De esta forma, cepas de *T. delbrueckii* usadas en fermentaciones semiindustriales aportaron mejores características organolépticas[109]. Las diferencias entre cepas del mismo género se deben a la diversidad genética inter e intraespecífica[40].

En Tanzania, en la fermentación de café por vía húmeda se identificaron *Pichia kluyveri, Hanseniaspora uvarum* y *Torulaspora delbrueckii* mediante electroforesis en gradiente en gel (DGGE)[116]. Mientras que, Pérez 2022[13] identificó *Hanseniaspora* y *Pichia* en fermentaciones húmedas del café procedente de Amazonas; en café de Cajamarca se reportaron *Starmerella* y los dos géneros identificados en Amazonas[13]. Asimismo, *Pichia* y *Candida* han sido aisladas de la fermentación húmeda y seca de los frutos del café en Brasil[11,56,117]. En este contexto, algunos géneros y especies están en el fruto del café, sin interesar el tipo de procesamiento[85]. Así, *Pichia kudriavzevii* fue reportada en la fermentación húmeda de café en Australia[78]. Sin embargo, junto a *P. kluyveri* también ha sido aislada de las heces del (*Nasua nasua*) "coati" (alimentado con café para la producción de café misha), a estas levaduras se le atribuye la producción del acetato de etilo de importancia a nivel sensorial[92]. De igual forma en Brasil, Melo et al. 2014[11] reportaron a *Pichia fermentans y Cándida quercitrusa* mediante ARDRA; y Carvalho et al. 2017[84] describen a *Pichia kluyveri, Hanseniaspora uvarum*, *H. vinae* y *Torulaspora delbrueckii*, esta última es predominante en las fermentaciones húmedas y semisecas[40,45]. Por otro lado, en Colombia Oliveira et al. 2019[87] han reportado la dominancia de *Pichia nakasei* por primera vez.

Las variaciones en las características fenotípicas de las cepas pertenecientes a los cinco géneros se atribuyen a las condiciones geográficas particulares de Perené, por ejemplo, la altitud, la composición del suelo, el clima y las prácticas agrícolas locales. La procedencia geográfica puede influir en las actividades metabólicas de las levaduras, justificando así las diferencias observadas en comparación con la literatura. En este sentido, diversos estudios indican la influencia diferenciadora de cada cepa en las características organolépticas del café, especialmente las aromáticas asociadas con productos volátiles[62]. Así, por ejemplo, en Australia, se inocularon cepas nativas de *Hanseniaspora uvarum* y *P. krudiavzevii* a la fermentación húmeda del café, las cuales produjeron aromas y sabores

característicos[12]. Esto sugiere que las levaduras ejercen un rol fundamental en el desarrollo de compuestos organolépticos deseables[80,88].

Por último, Silva et al. 2021[118] señalan que: “los sabores y aromas regionales en los productos fermentados pueden deberse en parte a diversidad microbiana estructurada regionalmente” llamado terruño microbiano. Con esto y precedentes de alimentos fermentados espontáneamente como vino, queso, masa madre entre otros, se debe aislar, identificar y conservar los microorganismos con la finalidad de producir café de alto valor con denominación de origen mediante fermentación controlada[87,88,104]. Además, la diversidad de cepas de levaduras aisladas de la fermentación espontanea del café de Perené, ofrecen una base para comprender, potenciar y mejorar la calidad y las características sensoriales del café en la región. Asimismo, estas levaduras se pueden utilizar para la elaboración de otros productos fermentados como el cacao. Por otro lado, estas levaduras se pueden utilizar en la producción de metabolitos de interés industrial como ésteres, polioles, ácidos orgánicos, enzimas, vitaminas, aminoácidos, entre otros, de este modo se valorará a la diversidad genética nativa.

VII. CONCLUSIONES

- Durante el proceso de fermentación espontánea del café por vía húmeda, se registró una disminución progresiva en el pH, pasando de 4,82 a 3,68, y en la concentración de azúcares reductores, que descendieron de 4,56 g/L a 2,03 g/L, en un rango de temperatura entre 17 y 20 °C.
- Se identificaron 24 cepas de levaduras con variabilidad morfológica y fisiológica, indicando una adaptación específica a factores como temperatura, pH y concentración de etanol y ácidos. La tolerancia a bajos niveles de pH, a altas concentraciones de glucosa 50 %, y de etanol entre el 8 % y el 10 % resalta la capacidad de estas levaduras para prosperar en un ambiente fermentativo desafiante.
- Los análisis de PCR-RFLP y secuenciación de la región 5,8S - ITS de las levaduras aisladas revelaron la presencia predominante de los géneros (5): *Pichia* (13), *Candida* (4), *Hanseniaspora* (4), *Torulaspora* (2) y *Starmerella* (1).

VIII. REFERENCIAS

1. Instituto Nacional de Estadistica e Informatica (INEI): IV Censo Nacional Agropecuario [Internet]. Lima: CENAGRO; c2012 [citado 19 de abril 2023]. Disponible de: http://censos1.inei.gob.pe/Cenagro/redatam/

2. Arce M. Sucesión generacional en la cooperativa agraria cafetalera Perené, Chanchamayo-Junín [Tesis de pregrado]. Huancayo: Universidad Nacional del Centro del Perú, 2019 [citado 19 de abril 2023]. 89 p. Disponible de: http://hdl.handle.net/20.500.12894/6411

3. Villano A. Producción de café (Coffea arabica L.): Experiencias en el centro poblado San Juan de ubiriki Chanchamayo-Perene [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina, 2021 [citado 19 de abril 2023]. 83 p. Disponible de: https://hdl.handle.net/20.500.12996/4734

4. Tomapasca M. Evaluación de la influencia de parámetros de fermentación en calidad sensorial del café variedad Catimor (Coffea arábica L.) en el distrito de Copallín- Bagua 2021 [Tesis de pregrado]. Amazonas: Universidad Politecnica Amazónica, 2022 [citado 19 de abril 2023]. 58 p. Disponible de: http://hdl.handle.net/20.500.12897/130

5. Quinde L. Fermentacion en el cafe (Coffea arabica)de la variedad catimor acondicionando piña (Ananas Comosus) con fines sensoriales [Tesis de pregrado]. Piura: Universidad Nacional de Piura, 2020 [citado 19 de abril 2023]. 98 p. Disponible de: http://repositorio.unp.edu.pe/handle/20.500.12676/2344

6. Gutierrez K. Selección y caracterización de hongos provenientes de la filosfera del café (Coffea arabica L.) con capacidad biocontroladora contra fitopatógenos fúngicos [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina, 2022 [citado 19 de abril 2023]. 110 p. Disponible de: https://hdl.handle.net/20.500.12996/5220

7. Sanz-Uribe J, Velásquez-Henao J. Producción de café con fermentaciones incompletas y fermentaciones prolongadas utilizando el Fermaestro®. Rev Cenicafé [Internet]. 2022 [citado 19 de abril 2023]; 73(1):e73105. Disponible de: https://doi.org/10.38141/10778/73105

8. Thierry J, Laffargue A, Descroix F, Doulbeau S, Bertrand B, de Kochko A, et al. Influence of environmental factors, wet processing and their interactions on the biochemical composition of green Arabica coffee beans. Food Chem [Internet]. 2010 [citado 21 de abril 2023]; 118(3):693–701. Disponible de: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.048

9. Vegas C, Zavaleta A, Canales P, Esteve-Zarzoso B. Yeasts Associated with Various Amazonian Native Fruits. Polish J Microbiol [Internet]. 2020 [citado 21 de abril 2023]; 69(3):251–261. Disponible de: https://doi.org/10.33073/pjm-2020-027

10. de Melo V, Thomaz V, Kaur S, Neto E, Ricardo C. Microbial ecology and starter culture technology in coffee processing. Crit Rev Food Sci Nutr [Internet]. 2015 [citado 22 de abril 2023]; 57(13):2775–2788. Disponible de http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2015.1067759

11. de Melo G, Thomaz V, Pandey A, Pedroni A, Rodrigues J, Luiz A, et al. Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. Int J Food Microbiol [Internet]. 2014 [citado 22 de abril 2023]; 188:60–66. Disponible de: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.008

12. Elhalis H, Cox J, Frank D, Zhao J. Microbiological and Chemical Characteristics of wet coffee fermentation inoculated with Hansinaspora uvarum and Pichia kudriavzevii and their impact on coffee sensory quality. Front Microbiol [Internet]. 2021 [citado 24 de abril 2023]; 12(August):1–13. Disponible de: https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.713969

13. Pérez J. Caracterización biológica y química del fermentado espontáneo del café (Coffea arabica) en Amazonas [Tesis de maestría]. Amazonas: Universidad Nacional Toribio Rodriguez de Mendoza de Amazonas, 2022 [citado 25 de abril 2023]. 94 p. Disponible de: https://hdl.handle.net/20.500.14077/2989

14. Sanchez I. Efecto de la adición de levadura (Saccharomyces sp) en el proceso de fermentacion de café (Coffea arabica) [Tesis de pregrado]. Amazonas: Universidad Nacional Toribio Rodrígues de Mendoza de

Amazonas, 2018 [citado 2 de mayo 2023]. 62 p. Disponible de: https://hdl.handle.net/20.500.14077/1514

15. Agrobanco Cultivo del Café [Internet]. Lima: MINAG; c2007 [citado 2 de mayo 2023]. Disponible de: https://www.agrobanco.com.pe/pdfs/publicacionagroinforma/1_cultivo_del_cafe.pdf

16. Asociacion Mexicana de la Cadena Productiva del Café: Plan integral de promoción del café de México. Ciudad de México: AMECAFE; c2012 [citado 2 de octubre 2023]. Disponible de: https://www.yumpu.com/es/document/view/14134237/plan-integral-de-promocion-del-cafe-de-mexico-amecafe

17. Arcos C. Monografía: Efecto de la fermentación aerobia del grano de café orgánico, en el desarrollo de características sensoriales de la bebida en el Municipio de Pitalito [Tesis de pregrado]. Bogotá: Universidad Nacional Abierta y a Distancia, 2019 [citado 6 de octubre 2023]. 45 p. Disponible de: https://repository.unad.edu.co/handle/10596/13481

18. Silva C, Trejos C. Prospectiva del café en Nariño : sabor y aroma de una tradición. Rev Estrateg Organ [Internet]. 2016 [citado 6 de octubre 2023]; 5(1):11–28. Disponible de: https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00315-9

19. Junta Nacional del Café: El café de Perú [Internet]. Lima:JNC; c2020 [citado 7 de octubre 2023]. Disponible de: https://juntadelcafe.org.pe/wp-content/uploads/2020/09/Elcafe%CC%81dePru%CC%81.pdf

20. Banco Central de Reserva del Perú: Anexo 24-memoria-2022 [Internet]. Lima: BCRP; c2022 [citado 7 de octubre 2023]. Disponible de: https://www.bcrp.gob.pe/estadisticas.html

21. Junta Nacional del café. La caficultura peruana está en riesgo por bajos precios y altos costos de producción. El Cafetalero [Internet]. 2019 [citado 7 de octubre 2023]; 62(Octubre):1–35. Disponible de: https://juntadelcafe.org.pe/wp-content/uploads/2019/05/REV-62final-la-caficultura-peruana-esta%CC%81-en-riesgo-1.pdf

22. Sierra H. Caracterización de las zonas cafetaleras en el Peru: Informe final del programa para el desarrollo de la Amazonía del MINAG [Internet]. Lima: MINAG; 2012 [citado 7 de octubre 2023]. Serie de Informes Técnicos Proamazonía. Disponible de: http://www.minedu.gob.pe/DeInteres/xtras/download.php?link=resumen_enrique_prochazka.pdf

23. Diaz C, Carmen M. Línea Base del Sector Café en el Perú: Documento de Trabajo del PNUD [Internet]. Lima: PNUD; 2017. Disponible de: https://www.midagri.gob.pe/portal/pncafe-publicaciones/20118-linea-de-base-del-sector-cafe-en-el-peru#:~:text=Línea de Base del Sector,y presenta los principales indicadores.

24. Murguía L. Gestión de innovación en agronegocios para aumentar la competitividad de la cooperativa café Perú en la provincia de Chanchamayo [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2016 [citado 7 de octubre 2023]. 146 p. Disponible de: http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2734/E21-M87-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y

25. Choque D. Evolución de la exportación de café: 2010-2020 [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad de Lima; 2021 [citado 9 de octubre 2023]. 53 p. Disponible de: https://hdl.handle.net/20.500.12724/13716

26. Alarcón G. Comportamiento de tres variedades de café (Coffea arabica L.) en el valle del Perené, Junín - Perú [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2016 [citado 9 de octubre 2023]. 120 p. Disponible de: http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/1982?show=full

27. Llanos D. Análisis de los costos logísticos de la cadena de valor del café de Chanchamayo. [Tesis de maestría]. Lima: Universidad del Pacífico; 2021 [citado 9 de octubre 2023]. 105 p. Disponible de: https://hdl.handle.net/11354/3048

28. Reyes C, Santana G. Análisis de los factores: Calidad, capacitación y asociatividad que influyen en las exportaciones de café especial de

Chanchamayo-Junín, Perú en el periodo 2014-2018 [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas; 2020. [citado 9 de octubre 2023]. 114 p. Disponible de: https://repositorioacademico.upc.edu.pe/handle/10757/652891

29. Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. "Observatorio de Commodities: Café"- Boletín trimestrasl N° 04-2023 [Internet]. Lima: MIDAGRI; c2022 [citado 19 de abril 2023]. Disponible de: https://www.gob.pe/institucion/midagri/informes-publicaciones/3251275-commodities-trimestral-2022

30. Cárdenas J, Pardo J. Caracterización de las etapas de fermentación y secado del café La Primavera. Implement Sci [Internet]. 2014 [citado 10 de octubre 2023]; 39(1):1–24. Disponible de: https://repositorio.escuelaing.edu.co/handle/001/159

31. Ramos P, Sanz R, Oliveros C. Identificación y clasificación de frutos de café en tiempo real, a través de la medición de color. Cenicafé [Internet]. 2010 [citado 10 de octubre 2023]; 61(4):315–326. Disponible de: http://hdl.handle.net/10778/506

32. Vásquez B, Rueda C, Ramírez L. Determinación del pH y tiempo de fermentación teniendo en cuenta la temperatura ambiental durante el beneficio de café de variedad castillo. Rev Matices Tecnológicos [Internet]. 2022 [citado 10 de octubre 2023]; 14:19–24. Disponible de: http://138.117.111.22/index.php/revistamaticestecnologicos/article/view/507

33. Pineda C, Reyes C, Alonso F: Beneficiado y calidad del café en Man caficultura. Honduras: Instituto Hondureño del Café; c2012 [citado 11 de octubre 2023]. Disponible de: https://www.ihcafe.hn/?mdocs-file=4241

34. Puerta-Quintero G, Ríos-Arias S. Composición química del mucílago de café, según el tiempo de fermentación y refrigeración. Cenicafé [Internet]. 2011 [citado 11 de octubre 2023]; 62(2):23-40. Disponible de: http://hdl.handle.net/10778/478

35. Centro de Estudios y Promoción del Desarrollo. Producción de cafés

especiales Manual Técnico Lima: DESCO; c2012 [citado 11 de octubre 2023]. Disponible de: https://www.desco.org.pe/produccion-de-cafes-especiales-manual-tecnico

36. Puerta G. Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficiado del café. Cenicafé [Internet]. 2010 [citado 11 de octubre 2023]; Avances Técnicos N° 402. Disponible de: http://hdl.handle.net/10778/345

37. Betancur J, Zurita M. Evaluación de la fermentación controlada con inoculación de levaduras (Saccharomyces cerevisiae) y su efecto en la calidad del café (Coffea arabica) [Tesis de pregrado]. Zamorano: Escuela agrícola Panamericana, 2020 [citado 12 de octubre 2023]. 32 p. Disponible de: https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/6921

38. Puerta G, Echeverry J. Fermentación controlada del café. Cenicafé [Internet]. 2015 [citado 12 de octubre 2023]; Avances Técnicos N° 454. Disponible de: http://hdl.handle.net/10778/558

39. Liang L, Mun C, Philip C, Bin Y, Shao L. Coffee fermentation and flavor - An intricate and delicate relationship. Food Chem [Internet]. 2015 [citado 12 de octubre 2023]; 185:182–191. Disponible de: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.124

40. Sunarharum W, Williams D, Smyth H. Complexity of coffee flavor: A compositional and sensory perspective. Food Res Int [Internet]. 2014 [citado 12 de octubre 2023]; 62:315–25. Disponible de: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.030

41. Marques D. Isolamento e caracterizacao convencional e molecular por ARDRA e DGGE da microbiota associada ao café despolpado (Coffea arabica L.) [Tesis de pregrado]. Brasil: Universidad Federal de Lavras, 2009 [citado 14 de octubre 2023]. 82 p. Disponible de: http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/6783

42. Guzmán D. Potencial tecnológico de cepas nativas de levaduras aisladas en procesos de fermentación natural de café para la producción de Cafés Especiales [Trabajo de especialidad]. Antioquia: Universidad de Antioquia,

2021 [citado 14 de octubre 2023]. 29 p. Disponible de: https://hdl.handle.net/10495/21397

43. Osorio V, Pabón J. Efecto de las temperaturas y tiempos de tueste en la calidad sensorial del café. Rev Cenicafé [Internet]. 2022 [citado 14 de octubre 2023]; 73(1):e73102. Disponible de: https://doi.org/10.38141/10778/73102

44. Guevara R, Castaño J. Caracterización granulométrica del café Colombiano tostado y molido. Cenicafé [Internet]. 2005 [citado 14 de octubre 2023]; 56(1):13. Disponible de: http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/122/1/arc056(01)005-018.pdf

45. Bhumiratana N, Adhikari K, Chambers IV E. Evolution of sensory aroma attributes from coffee beans to brewed coffee. LWT - Food Sci Technol [Internet]. 2011 [citado 14 de octubre 2023]; 44(10):2185–92. Disponible de: https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.07.001

46. Marques D. Selecao in vitro de culturas iniciadoras para fermentacao de frutos de café (Coffea arabica L.) processados via seca e semi-seca [Tesis de pregrado]. Brasil: Universidad Federal de Lavras, 2011 [citado 16 de octubre 2023]. 82 p. Disponible de: http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/6622

47. Belda C. La fermentación como estrategia para la mejora de las propiedades funcionales de residuos y subproductos de alimentos de origen vegetal [Tesis de maestría]. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia, 2022 [citado 17 de octubre 2023]. 32 p. Disponible de: http://hdl.handle.net/10251/188499

48. Guerrero J. Fermentación del café y calidad de taza según pisos altitudinales en la cuenca Urubamba, Tabaconas-San Ignacio [Tesis de pregrado]. Cajamarca: Universidad de Jaén, 2019 [citado 16 de octubre 2023]. 98 p. Disponible de: http://repositorio.unj.edu.pe/handle/UNJ/125

49. Conley J, Wilson B. Coffee terroir: cupping description profiles and their impact upon prices in Central American coffees. GeoJournal [Internet]. 2020 [citado 16 de octubre 2023]; 85(1):67–79. Disponible de: https://doi.org/10.1007/s10708-018-9949-1

50. Pivaral R, Cruz J. Evaluación del efecto de Saccharomyces cerevisiae sobre la caracterización sensorial del café en dos sistemas de fermentación [Tesis de pregrado]. Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana; 2018 [citado 17 de octubre 2023]. 35p. Disponible de: https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/6232/1/AGI-2018-T019.pdf

51. Haile M, Kang W. Isolation, identification, and characterization of pectinolytic yeasts for starter culture in coffee fermentation. Microorganisms [Internet]. 2019 [citado 17 de octubre 2023]; 7(10): 1-16. Disponible de: https://doi.org/10.3390/microorganisms7100401

52. Puerta G. Buenas prácticas para la prevención de los defectos de la calidad del café: fermento, reposado, fenólico y mohoso. Cenicafé [Internet]. 2015 [citado 14 de octubre 2023]; Avances Técnicos N° 461. Disponible de: https://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/675

53. Freitas R, Ferrerira C, Batista L. Coffee Fermentation. Handb Plant-Based Fermented Food Beverage Technol [Internet]. 2° ed. Londres: CRC Press; 2012 [citado 17 de octubre 2023]; 2864 p. Disponible de: https://api.taylorfrancis.com/content/books/mono/download?identifierName=doi&identifierValue=10.1201/b15438&type=googlepdf#page=70

54. Sánchez I, Olivares S. Efecto de la adición de levadura (Saccharomyces sp) en el proceso de fermentación de café (Coffea arabica) [Tesis de pregrado]. Amazonas: Universidad Nacional Toribio Rodrígues de Mendoza de Amazonas, 2019 [citado 17 de octubre 2023]. 62 p. Disponible de: https://hdl.handle.net/20.500.14077/1514

55. Mendoza J. Tiempo óptimo de fermentación de variedades de café, procedentes de parcelas agroforestales de Jaén y San Ignacio [Tesis de pregrado]. Cajamarca: Universidad de Jaén, 2019 [citado 17 de octubre 2023]. 100 p. Disponible de: http://repositorio.unj.edu.pe/handle/UNJ/118

56. Reis S, Ferreira C, Pedrozo da Cruz M, de Souza C, Marques A, Ferreira W, et al. Improvement of coffee beverage quality by using selected yeasts strains during the fermentation in dry process. Food Res Int [Internet]. 2014 [citado 17 de octubre 2023]; 61:183–195. Disponible de:

https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.033

57. Ferreira C, Marques D, de Souza C, Ferreira W, Ribeiro Dias D, Freitas R. Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. World J Microbiol Biotechnol [Internet]. 2013 [citado 18 de octubre 2023]; 29(2):235–247. Disponible de: https://doi.org/10.1007/s11274-012-1175-2

58. Kurtzman C, Fell J, Boekhout T. The Yeasts: A Taxonomic Study - Google Libros [Internet]. 5th ed. Londres: Elsevier B.V.; 2011 [citado 18 de octubre 2023]. 2354 p. Disponible de: https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=yfg79rlIFIkC&oi=fnd&pg=PP2&dq=The+Yeasts,+a+Taxonomic+Study+Kurtzman+CP&ots=M_JZmyMzBp&sig=QBi_MayFYnKMzu6ZNAu0HUJP_Wk#v=onepage&q&f=false

59. Puerta G, Marín J, Osorio G. Microbiología de la fermentación del mucílago de café según su madurez y selección. Cenicafé [Internet]. 2012 [citado 18 de octubre 2023]; 63(2):58–78. Disponible de: https://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/536

60. Plazas L. Desarrollo de un sistema para el monitoreo inteligente del proceso de fermentación del café [Tesis de maestría]. Colombia: Universidad Autónoma de Occidente, 2022 [citado 18 de octubre 2023]. 115 p. Disponible de:

61. Rangel A, Suárez L. Potencial biotecnológico de levaduras identificadas en Norte de Santander. Prospectiva [Internet]. 2022 [citado 19 de octubre 2023]; 20(1). Disponible de: http:://doi.org/10.15665/rp.v20i1.2729

62. Bernardi A. Selección de levaduras vínicas provenientes de la Provincia De Mendoza [Tesis de pregrado]. Mendoza: Universidad Nacional de Cuyo, 2013 [citado 19 de octubre 2023]. 70p. Disponible de: https://bdigital.uncu.edu.ar/5049

63. Vila E. Aislamiento y selección de levaduras nativas capaces de producir altos rendimientos de alcohol empleando como sustrato el exudado de cacao (Theobroma cacao L.) clon CCN-51 den el distrito de San Alejandro [Tesis de

pregrado]. Pucallpa: Universidad Nacional de Ucayali; 2018 [citado 19 de octubre 2023]. 110p. Disponible de: http://repositorio.unu.edu.pe/handle/UNU/3868

64. Coronel D. Aislamiento e identificación de taxa de levaduras presentes en el fruto de Mortiño (Vaccinium floribundum) con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica. [Tesis de pregrado]. Quito: Universidad Politécnica Salesiana; 2015 [citado 19 de octubre 2023]. 128p. Disponible de: http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/8867

65. Salazar L. Aislamiento y caracterizacion de microorganismos durante el proceso de fermentación de Theobroma Cacao L. de la variedad “Chuncho” obtenida en Cuzco, Perú [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2017 [citado 19 de octubre 2023]. 93p. Disponible de: https://hdl.handle.net/20.500.12866/1436

66. Campoverde M, González F. Determinación de mohos y levaduras del sistema de agua de la junta administradora de agua potable de la Parroquia Baños [Tesis de pregrado]. Cuenca: Universidad de Cuenca; 2012 [citado 19 de octubre 2023]. 178p. Disponible de: http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/2472

67. Mendoza M. Importancia de la identificación de levaduras. Rev la Soc Venez Microbiol [Internet]. 2005 [citado 19 de octubre 2023]; 25(1):15–23. Disponible de: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562005000100004&lng=es&nrm=iso&tlng=es

68. Navarro Y. Caracterización fenotípíca de cepas de levaduras con actividad antagonista frente a Colletotrichum sp. [Tesis de pregrado]. Villavicencio: Universidad de los Llanos; 2018 [citado 19 de octubre 2023]. 61p. Disponible de: https://repositorio.unillanos.edu.co/handle/001/1468

69. Arevalo S. Optimización de la Producción del agente de biocontrol Candida sake (CPA-1) [Tesis de doctorado]. Lérida: Universidad de Lérida; 1998 [citado 19 de octubre 2023]. 94 p. Disponible de: https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/8389/TSMAC3de3.pdf

70. Torija M. Ecología de levaduras: selección y adaptación de dermentaciones vínicas [Tesis de pregrado]. Cataluña: Universidad Rovira i Virgili; 2002 [citado 20 de octubre 2023]. Disponible de: http://hdl.handle.net/10803/8643

71. Sharma D, Singh D, Manzoor M, Meena K, Sharma V, Butaney K, et al. Realizing Bioremediation Through Metagenomics: A Technical Review. Metagenomics Tech Appl Challenges Oppor [Internet]. 2020 [citado 20 de octubre 2023]; 91–107. Disponible de: https://doi.org/10.1007/978-981-15-6529-8_6

72. Rodriguez N. Identificación taxonómica de microorganismos responsables de la fermentación espontánea del ají charapita " Capsicum frutescens" [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2018 [citado 20 de octubre 2023]. 95 p. Disponible de: https://hdl.handle.net/20.500.12672/9777

73. Pulcini L, Gamalero E, Costantini A, Tommaso E, Tsolakis C, Garcia-Moruno E. An Overview on Saccharomyces cerevisiae Indigenous Strains Selection Methods [Internet]. In: Grapes and Wine [Internet]. London: IntechOpen; 2022 [citado 21 de octubre 2023]. 381 p. Disponible de: https://doi.org/10.5772/intechopen.99095

74. Masoud W, Cesar L, Jespersen L, Jakobsen M. Yeast involved in fermentation of Coffea arabica in East Africa determined by genotyping and by direct denaturating gradient gel electrophoresis. Yeast [Internet]. 2004 [citado 21 de octubre 2023]; 21 (7):549–556. Disponible de: https://doi.org/10.1002/yea.1124

75. Santos M. Evaluación enológica de co-inoculación de levaduras Saccharomyces y no-Saccharomyces en vios chilenos [Tesis de pregrado]. Madrid: Universidad Politécnica de Madrid; 2016 [citado 21 de octubre 2023]. 146p. Disponible de: https://oa.upm.es/43986/

76. Sánchez J. Caracterización molecular de bacterias ácido lácticas aisladas de frutos procedentes de la Región Loreto [tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2019 [citado 22 de octubre 2023]. 124p. Disponible de: https://hdl.handle.net/20.500.12672/10767

77. Montes J. Caracterización molecular de bacterias con actividad L-asparaginasa aisladas de las Salinas de Pilluana, Maras y Chilca [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2018 [citado 22 de octubre 2023]. 95p. Disponible de: https://hdl.handle.net/20.500.12672/10054

78. Elhalis H, Cox J, Zhao J. Ecological diversity, evolution and metabolism of microbial communities in the wet fermentation of Australian coffee beans. Int J Food Microbiol [Internet]. 2020 [citado 22 de octubre 2023]; 321(January):108544. Disponible de: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108544

79. Jiyuan S, De Bruyn F, Pothakos V, Contreras G, Cai Z, Moccand C, et al. Influence of various processing parameters on the microbial community dynamics, metabolomic profiles, and cup quality during wet coffee processing. Front Microbiol [Internet]. 2019 [citado 22 de octubre 2023];10(November):1–24. Disponible de: https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02621

80. Elhalis H, Cox J, Frank D, Zhao J. The crucial role of yeasts in the wet fermentation of coffee beans and quality. Int J Food Microbiol [Internet]. 2020 [citado 3 de enero 2024]; 333:108796. Disponible de: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108796

81. Agate A, Bhat J. Role of pectinolytic yeasts in the degradation of mucilage layer of Coffea robusta cherries. Appl Microbiol [Internet]. 1966 [citado 3 de enero 2024]; 14(2):256–260. Disponible de: https://doi.org/10.1128/aem.14.2.256-260.1966

82. Machuca-Guevara J, Suárez-Peña EA, Motte E, Mialhe-Matonnier E. Caracterización molecular de los microorganismos presentes durante el proceso fermentativo de los granos de cacao (Theobroma cacao). Rev Peru Biol [Internet]. 2019 [citado 4 de enero 2024]; 26(4):535–42. Disponible de: http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v26i4.17220

83. Enciso M. Evaluación del efecto de la inoculación de cultivos iniciadores sobre las características organolépticas del café durante su proceso de fermentación seca [Tesis de pregrado]. Bucaramanga: Universidad de

Santander; 2019 [citado 4 de enero 2024]. 76 p. Disponible de: https://repositorio.udes.edu.co/handle/001/3752

84. de Carvalho D, de Melo G, Tanobe V, Soccol V, da Silva B, Rodrigues C, et al. Yeast diversity and physicochemical characteristics associated with coffee bean fermentation from the Brazilian Cerrado Mineiro region. Fermentation [Internet]. 2017 [citado 4 de enero 2024]; 3(1). Disponible de: http://dx.doi.org/10.3390/fermentation3010011

85. Avallone S, Guyot B, Brillouet JM, Olguin E, Guiraud JP. Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. Curr Microbiol [Internet]. 2001 [citado 5 de enero 2024]; 42(4):252–256. Disponible de: https://doi.org/10.1007/s002840110213

86. Masoud W, Jespersen L. Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of Coffea arabica in East Africa. Int J Food Microbiol [Internet]. 2006 [citado 5 de enero 2024]; 110(3):291–296. Disponible de: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.030

87. de Oliveira A, de Melo G, Coral J, Alvear M, Rosero R, de Carvalho D, et al. First description of bacterial and fungal communities in Colombian coffee beans fermentation analysed using Illumina-based amplicon sequencing. Sci Rep [Internet]. 2019 [citado 5 de enero 2024]; 9(1):1–10. Disponible de: https://doi.org/10.1038/s41598-019-45002-8

88. Madrid M, Reyes A, Peñuela A. Metagenomic, metabolomic and sensorial characteristics of fermented Coffea arábica L. var. Castillo beans inoculated with microbial starter cultures [Tesis de pregrado]. Bogotá: Universidad de los Andes; 2022 [citado 5 de enero 2024]. 38 p. Disponible de: http://hdl.handle.net/1992/55985

89. Miller G. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Anal Chem [Internet]. 1959 [citado 12 de octubre 2022]; 31(3):426–428. Disponible de: https://doi.org/10.1021/ac60147a030

90. Vegas C, Gonzáles D, Sueros S, Hurtado A, Zavaleta A. Analysis of the microbial population dynamics during spontaneous and controlled

fermentation of Chili “Charapita” (Capsicum frutescens). Sci Agropecu [Internet]. 2016 [citado 13 de octubre 2022]; 7(3):201–206. Disponible de: https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2016.03.06

91. de Melo G, da Cruz M, Lacerda C, Freitas R. Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined starter culture. Appl Environ Microbiol [Internet]. 2012 [citado 14 de octubre 2022]; 78(15):5395–5405. Disponible de: https://doi.org/10.1128/AEM.01144-12

92. Pérez J. Evaluación del potencial fermentativo de microorganismos aislados a partir de heces de coatí de cola anillada (Nasua nasua) para su aplicación en procesos fermentativos tecnológicos [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2019 [citado 15 de octubre 2022]. 97 p. Disponible de: https://hdl.handle.net/20.500.12672/11404

93. Van Der Aa Kühle A, Jespersen L. Detection and identification of wild yeasts in lager breweries. Int J Food Microbiol [Internet]. 1998 [citado 15 de octubre 2022]; 43(3):205–213. Disponible de: https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00113-5

94. Huamán M. Selección y caracterización de levaduras autóctonas aisladas de " cachina " del distrito de Lunahuaná [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2010 [citado 16 de octubre 2022]. 73 p. Disponible de: https://hdl.handle.net/20.500.12672/889

95. Zink R, Chatterjee A. Cloning and expression in Escherichia coli of pectinase genes of Erwinia carotovora subsp. carotovora. Appl Environ Microbiol [Internet]. 1985 [citado 16 de octubre 2022]; 49(3):714–7. Disponible de: https://doi.org/10.1128/aem.49.3.714-717.1985

96. Querol A, Barrio E, Huerta T, Ramon D. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. Appl Environ Microbiol [Internet]. 1992 [citado 17 de octubre 2022]; 58(9):2948–2953. Disponible de: https://doi.org/10.1128/aem.58.9.2948-2953.1992

97. Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, Querol A. Identification of yeasts by

RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. Int J Syst Bacteriol [Internet]. 1999 [citado 19 de octubre 2022]; 49(1):329–337. Disponible de: https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-329

98. Camizán R. Evaluación del tiempo de fermentación de café (Coffea arábica L.) en relación a la calidad organoléptica [Tesis de pregrado]. Chiclayo: Universidad Señor de Sipán; 2020 [citado 9 de noviembre 2023]. Disponible de: https://hdl.handle.net/20.500.12802/7349

99. Puerta G. Factores, procesos y controles en la fermentación del Café Cenicafé [Internet]. 2012 [citado 10 de noviembre 2023]; Av Técnicos N° 422. Disponible de: https://www.academia.edu/download/49023039/fermentacion_del_cafe.pdf

100. Vásquez J, Ramirez M, Monsalve Z. Actualización en caracterización molecular de levaduras de interés industrial. Rev Colomb Biotecnol [Internet]. 2016 [citado 12 de noviembre 2023]; 18(2):129. Disponible de: https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61530

101. Jackels S, Jackels C. Characterization of the Coffee Mucilage Fermentation Process Using Chemical Indicators: A Field Study in Nicaragua. J Food Sci [Internet]. 2005 [citado 12 de noviembre 2023]; Jun;70(5):C321–5. Disponible de: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2005.tb09960.x

102. Córdoba N, Guerrero J. Caracterización de los procesos tradicionales de fermentación de café en el departamento de Nariño. Biotecnoloía en el Sect Agropecu y Agroindustrial [Internet]. 2016 [citado 14 de noviembre 2023]; 14(2):75. Disponible de: http://dx.doi.org/10.18684/BSAA(14)75-83

103. Ardila J, Cuadros E. Evaluación de la concentración de azúcares totales, reductores y grados brix durante la fermentación de pulpa de café para la obtención de ácido láctico [Internet]. 2021 [citado 16 de noviembre 2023]. Disponible de: https://hdl.handle.net/10901/19903

104. Juárez T, Maldonado Y, González R, Ramírez M, Álvarez P, Salazar R. Caracterización fisicoquímica y sensorial de café de la montaña de Guerrero.

Rev Mex Ciencias Agrícolas [Internet]. 2021 [citado 18 de noviembre 2023]; 12(6):1057–1069. Disponible de: https://www.google.com/url?q=https://doi.org/10.29312/remexca.v12i6.2773&sa=D&source=editors&ust=1639509288955000&usg=AOvVaw08uY15YmbvyiWFIxdyRj9A

105. Zhang S, Page-Zoerkler N, Genevaz A, Roubaty C, Pollien P, Bordeaux M, et al. Unlocking the Aromatic Potential of Native Coffee Yeasts: From Isolation to a Biovolatile Platform. J Agric Food Chem [Internet]. 2023 [citado 20 de noviembre 2023]; 71(11):4665–4674. Disponible de: https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c08263

106. Linares M, Solís F. Identificación de levaduras. Rev Iberoam Micol [Internet]. 2007 [citado 25 de noviembre 2023]; 3(11):11-21. Disponible de: http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo11.pdf

107. Segura L. Caracterización de levaduras nosaccharomyces para la producción de tequila con un perfil aromático específico [Tesis de doctorado]. Lima: Francia: Universidad de Toulouse; 2016 [citado 27 de noviembre 2023]. Disponible de: https://theses.hal.science/tel-04246757

108. Martín S. Aislamiento y selección de levaduras no-Saccharomyces en Tempranillo [Tesis de doctorado]. España: Universidad de Valladolid; 2022 [citado 27 de noviembre 2023]. 89 p. Disponible de: https://uvadoc.uva.es/handle/10324/55589

109. Belda I. Estudio filo-funcional de levaduras de interés enológico para su aplicación industrial [Tesis de doctorado]. España: Universidad Complutense de Madrid; 2017 [citado 28 de noviembre 2023]. 283 p. Disponible de: https://hdl.handle.net/20.500.14352/22337

110. Suárez-Machín C, Garrido-Carralero N, Guevara-Rodríguez C. Levadura Saccharomyces cerevisiae y la producción de alcohol. Instit Cubano Invest Deriv Caña Azúcar Cuba [Internet]. 2016 [citado 30 de noviembre 2023]; 50(1): 20-28. Disponible de: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223148420004

111. Ludlow C, Cromie G, Garmendia-Torres C, Sirr A, Hays M, Field C, et al. Independent Origins of Yeast Associated with Coffee and Cacao Fermentation. Curr Biol [Internet]. 2016 [citado 30 de noviembre 2023]; 26(7):965–971. Disponible de: http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2016.02.012

112. Grijalva N. Caracterización bioquímica Y tecnológica de levaduras aisladas en bebidas fermentadas tradicionales del Ecuador [Tesis de doctorado]. España: Universidad de Valencia; 2019 [citado 30 de noviembre 2023]. 232 p. Disponible de: https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=271750&orden=0&info=link

113. Longhi S, Martín M, Morat V. Sistemas enzimáticos microbianos que asisten en la maceración impactando en las propiedades fisico-químicas y tecnológicas del vino. Rev Aliment Latinoam [Internet]. 2019 [citado 2 de diciembre 2023]. Disponible de: http://alaccta.org/revista-la-alimentacion-latinoamericana-n346/

114. Pereira A, Juliana S, Inácio A, Meira F, Freitas S. Influence of yeast inoculation on the quality of fermented coffee (Coffea arabica var. Mundo Novo) processed by natural and pulped natural processes. Int J Food Microbiol [Internet]. 2021 [citado 15 de diciembre 2023]. 343 (2021): 109107. Disponible de: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109107.

115. Wang C, Sun J, Lassabliere B, Yu B, Quan Liu S. Coffee flavour modification through controlled fermentation of green coffee beans by Saccharomyces cerevisiae and Pichia kluyveri: Part II. Mixed cultures with or without lactic acid bacteria. Food Res Int [Internet]. 2020 [citado 3 de diciembre 2023]; 136:109452. Disponible de: https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109452

116. Masoud W, Kaltoft C. The effects of yeasts involved in the fermentation of Coffea arabica in East Africa on growth and ochratoxin a (OTA) production by Aspergillus ochraceus. Int J Food Microbiol [Internet]. 2006 [citado 5 de diciembre 2023]; 106(2):229–234. Disponible de: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.015

117. Silva C, Schwan R, Sousa Ë, Wheals A. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of Coffea arabica in Brazil. Int J Food

Microbiol [Internet]. 2000 [citado 5 de diciembre 2023]; 60(2–3):251–260. Disponible de: https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00315-9

118. da Silva A, de Melo V, de Carvalho D, Dario R, Goés-Neto A, Kato R, et al. Facility-specific 'house' microbiome ensures the maintenance of functional microbial communities into coffee beans fermentation: implications for source tracking. Environ Microbiol Rep [Internet]. 2021 [citado 8 de diciembre 2023]; 13(4):470–481. Disponible de: https://doi.org/10.1111/1758-2229.12921

119. International Organisation of Vine and wine (OIV): Resolution OIV-OENO 206-2010 [Internet]. París: OIV; c2010 [citado 29 de marzo 2024]. Disponible de: https://www.oiv.int/public/medias/3128/oiv-oeno-206-2010-es.pdf

IX. ANEXOS

Anexo 1. Determinación de azúcares reductores (Miller, 1959[89])

Es una técnica de óxido-reducción que se basa en la capacidad de la glucosa para reducir el ácido 3,5 dinitrosalicílico bajo determinadas condiciones, esta reducción produce una coloración que se hace más intenso a medida que aumenta la concentración de azúcares reductores. Se evidencia por medio de la lectura de la absorbancia en espectrofotómetro lo que conlleva a la aplicación de la ley de Beer-Lambert[81].

Reactivo:

Ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS): Adicionar 50 mL de agua destilada en un beaker de 250 mL, adicionar 1,6 g de Hidróxido de sodio y disolver mediante agitación continua en plancha magnética a temperatura ambiente. Posteriormente adicionar lentamente 43,8 g de Tartrato de sodio y potasio hasta que se disuelva por completo (es mejor a 60 °C por 10 min). Recubrir el beaker con papel kraft (con el fin de proteger de la luz) y agregar lentamente 1 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico. Complete con agua destilada hasta 100 mL en balón aforado. Verter la mezcla a un frasco oscuro y dejar agitando durante 12 h. Filtrar antes de utilizar el reactivo.

Procedimiento:

Las muestras obtenidas de la fermentación espontáneo del café fueron centrifugadas a 10000 rpm por 10 min. Después, se mezcló 0,125 mL del sobrenadante con 0,125 mL de DNS. Esta mezcla se calentó a 100 °C por 5 min. Luego, se enfrió sobre hielo por 5 min y posteriormente se adiciona 1,25 mL de agua destilada. Dejar en reposo 15 min. Esta solución es leída a una longitud de onda de 540 nm.

Nota:

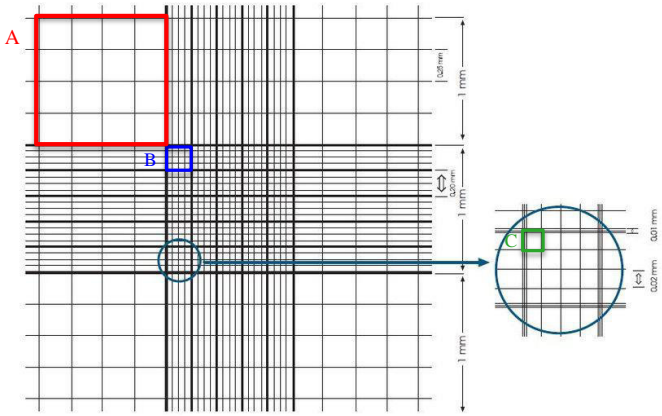
La ecuación de la curva patrón es una ecuación lineal: Y = aX + b

Y: Es la Absorbancia hallada de la muestra problema.

Despejar X para hallar la concentración de azúcar de la muestra problema $X = \frac{Y-b}{a}$

Anexo 2. Cuantificación de células por microscopía usando la cámara de Neubauer

Es una técnica común, rápida y económica para cuantificar células totales por microscopio. En esta tesis se usó la cámara de Neubauer con un área de 0,0025 mm^2 y 0,100 mm de profundidad.



Relación entre los diferentes cuadros:

A = 16 B

B = 25 C

Profundidad = 0,1 mm

Volumen A = 1 x 1 x 0,1 = 0,1 mm^3 = 10^{-4} mL

Volumen B = 0,25 x 0,25 x 0,1 x 10^{-3} = 6,25 10^{-6} m

Volumen C = 0,05 x 0,05 x 0,1 x 10^{-3} = 2,5 10^{-7} m

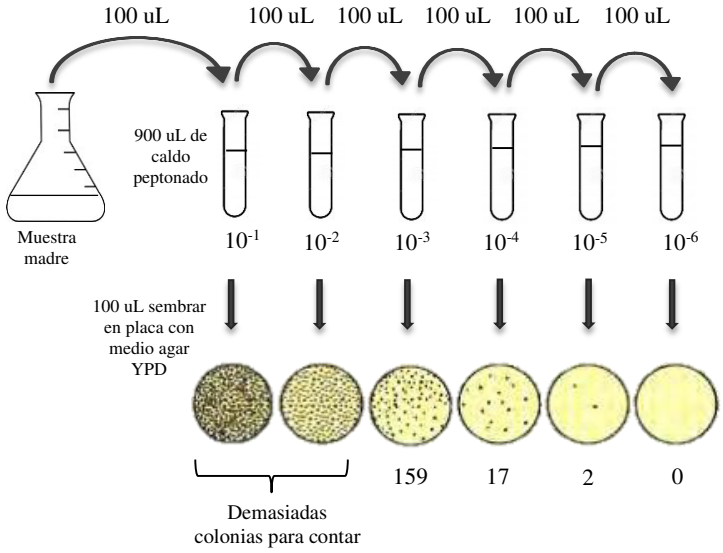
Cálculo:

$$Número\ de\ células = \frac{(número\ de\ células\ contadas)}{(número\ de\ cuadrados)x(volumen\ del\ cuadrado)x(dilución)}$$

Anexo 3. Técnica de recuento en placas

Esta técnica consiste en contar el total de colonias formadas en placas. Se procedió en condiciones estériles a diluciones seriadas de una muestra concentrada de microorganismos. Para ello, se diluye la muestra con agua peptonada estéril en una proporción de 1:10, y a partir de este se sigue dicho patrón para las otras diluciones como se observa en la figura. De cada dilución se sembró superficialmente 1mL en las placas de medio YPD con cloranfenicol expandiendo homogéneamente con la ayuda de perlas de vidrio o triángulo de drigalsky. Luego se incuban las placas a temperatura ambiente de 30 °C por 72 h.

Ejemplo:



Cálculo:

(#cel contadas)(Fact.dilución)(10)= UFC/mL

Seleccionar las placas que contengan mayor a 30 y menor a 300 UFC y contar las colonias.

Anexo 4. Preparación de medios de cultivos

Medio YPD (Yeast Peptone Dextrose)

Este medio de cultivo es utilizado para la recuperación de levaduras. La preparación del medio consiste en: (g/L)

- Glucosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 20
- Peptona (MilliporeSigma, Bedford, MA, USA) 20
- Extracto de Levadura (MilliporeSigma, Bedford, MA, USA) 10
- Agar (MilliporeSigma, Bedford, MA, USA) 20
- Cloranfenicol (MilliporeSigma, Bedford, MA, USA) 0,10

La mezcla de todos los productos se disuelve con agua destilada adicionando el antibacteriano. Luego se esteriliza mediante la autoclave a 121 °C por 15 min.

Fuente: Vegas et al., 2016[90]

Caldo YPD (Yeast Peptone Dextrose)

Este medio de cultivo es utilizado para la recuperación de levaduras. La preparación del medio consiste en: (g/L)

- Glucosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 20
- Peptona (MilliporeSigma, Bedford, MA, USA) 20
- Extracto de Levadura (MilliporeSigma, Bedford, MA, USA) 10
- Cloranfenicol (MilliporeSigma, Bedford, MA, USA) 0,10

La mezcla de todos los productos se disuelve con agua destilada adicionando el antibacteriano. Luego se esteriliza mediante la autoclave a 121 °C por 15 min.

Fuente: Vegas et al., 2016[90]

Medio con pectina

Este medio de cultivo es utilizado para la recuperación de levaduras. La preparación del medio consiste en: (g/L)

- Glucosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 20
- Peptona (MilliporeSigma, Bedford, MA, USA) 20

- Extracto de Levadura (MilliporeSigma, Bedford, MA, USA) 10
- Pectina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 10
- Agar (MilliporeSigma, Bedford, MA, USA) 20

La mezcla de todos los productos se disuelve con agua destilada. Luego se esteriliza mediante la autoclave a 121 °C por 15 minutos.

Fuente: Adaptado de Masoud y Jespersen (2006)[86]

Agar nutriente WL

Este medio de cultivo es empleado en la diferenciación de levaduras de cerveza o procesos de fermentación en función de morfología y los diferentes colores de las colonias.

La composición del agar es el siguiente (g/L):

- Extracto de Levadura 4,0
- Triptona 5,0
- Dextrosa 50,0
- Fosfato de dihidrógeno de potasio 0,55
- Cloruro de potasio 0,425
- Cloruro de calcio 0,125
- Sulfato de magnesio 0,125
- Cloruro férrico 0,0025
- Sulfato de mangaeso 0,0025
- Verde de bromocresol 0,022
- Agar 15,0

La preparación es según las instrucciones del fabricante y consiste en:

Añadir 75 g a 1 L de agua destilada. Llevar a ebullición hasta dilución completa. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min. Si fuese necesario ajustar el pH.

Para el reconocimiento de colonias de levadura evalúe la morfología de la colonia de la siguiente forma:

- ***Saccharomyces spp.:*** las colonias crecen bien durante 4 días en agar nutriente WL, produciendo colonias circulares de color crema a verde pálido. Las diferentes sombras de color no indican necesariamente la presencia de diferentes cepas, sino la presencia de pequeños mutantes; las colonias tienen protuberancias cónicas o redondas, su superficie es lisa y opaca, y su consistencia butírica. No crece en agar lisina.

- ***Torulaspora spp.:*** las colonias son similares a las de *Saccharomyces spp*. Crece en agar lisina.

- ***Hanseniaspora spp. (Kloeckera spp.):*** Crece en agar nutriente WL en 4 días, produciendo colonias verde oscuro, planas, lisas y de consistencia butírica. Crece en agar lisina y en agar diferencial WL.

- ***Candida stellata*****:** Crece en agar nutriente WL en 4 días, produciendo colonias verde guisante, lisas y de consistencia butírica; se van poniendo oscuras por el centro a medida que envejecen. Crece en agar lisina.

- ***Saccharomycodes spp.:*** Crece en agar nutriente WL en 4 días, produciendo colonias verde claro, suaves, de consistencia butírica y convexas. Crece en agar lisina, pero no en agar diferencial WL.

Nota: sus células, vistas al microscopio, son muy grandes (hasta 25 mm).

- ***Schizosaccharomyces pombe:*** Crece en agar nutriente WL en 4 días, produciendo colonias milimétricas, lisas y de color verde oscuro. Crece en agar lisina.

Nota: sus células se reconocen fácilmente en el microscopio debido a su típica división por escisión.

- ***Rhodotorula spp*.:** Crece en agar nutriente WL en 4 días, produciendo colonias de consistencia butírica rosa oscuro, de superficie suave y mucosa. Crece en agar lisina.

- ***Metschnikowia spp.:*** Crece en agar nutriente WL en 4 días, produciendo pequeñas colonias claras, suaves y de consistencia butírica. Un pigmento rojizo se difumina en el medio por debajo de las colonias. Crece en agar lisina.

- ***Pichia membranifaciens*:** Crece en agar nutriente WL en 4 días, produciendo colonias convexas grisáceas o azuladas, de superficie basta y pulverulenta. Crece en agar lisina.

- ***Pichia anomala*** (antes *Hansenula anomala)*: Crece en agar nutriente WL en 4 días, produciendo colonias color crema o azuladas que se azulean claramente después de 8 días. Las colonias son circulares, la superficie es suave y la consistencia butírica, pero a veces claramente mucosa. Crece en agar lisina.

- ***Dekkera spp. o Brettanomyces spp*.:** Crece en agar nutriente WL en 8 días, produciendo pequeñas colonias en forma de cúpula, color crema, suaves y butíricas. Produce una gran cantidad de ácido acético, claramente perceptible por el olor, poniendo el medio de color amarillo. Crece en agar lisina y en agar diferencial WL. El crecimiento en este último medio hace posible distinguirlo de *Zygosaccharomyces bailii*.

Nota: Se puede confirmar mediante examen microscópico: *Dekkera* tiene células pequeñas, algunas de ellas con la típica forma de ojiva.

- ***Zygosaccharomyces bailii*:** Crece en agar nutriente WL en 4 días, produciendo pequeñas colonias circulares de color crema, lisas y de consistencia butírica. Crece en agar lisina, pero no en agar diferencial WL. A menudo se ve un halo amarillento alrededor de las colonias jóvenes.

Nota: Cuando crece en vino embotellado, produce agrupaciones marrones de 0,5 a 1 mm. Sus células no tienen forma de ojiva.

- **Las acetobacterias** crecen en agar nutriente WL con colonias que van de pequeñas a milimétricas, color verde oscuro brillante, muy positivas al ensayo de la catalasa. (Nota – Este medio no es apropiado para su recuento).

- **Las lactobacterias** crecen en agar nutriente WL en 10 días con colonias milimétricas, claras, catalasa-negativas. (Nota – Este medio no es apropiado para su recuento).

Fuente: Adaptado de Van der Aa Kuhle y Jespersen (1998)[93], OIV[119]

Anexo 5. Extracción de ADN en levadura (Querol et al., 1992[96])

1. Centrifugar 2 mL de cultivo a 1000 RPM por 10 min y descartar el sobrenadante.
2. Lavar el pellet con 1 mL de agua PBS
3. Adicionar 500 µL de buffer 1 (Sorbitol 0,9M, EDTA 0,1M; pH 7,5) y 50 µL del preparado de liticasa (1 mg de liticasa en 500 µL buffer 1).
4. Incubar en baño húmedo a 37 °C por 30 min. Luego se añadió 10 µL de Proteinasa K e incubó a baño maría a 50 °C por 1 h.
5. Centrifugar a 10000 RPM por 10 min. Descartar el sobrenadante
6. Añadir al concentrado celular 500 µL de buffer 2 (Tris 50 mM; EDTA 20 mM; pH 7,4) y 13 µL de SDS al 10 %.
7. Incubar en baño húmedo a 65 °C por 10 min y añadir 200 µL de acetato de Na 5 M.
8. Conservar a -20 °C por 15 min.
9. Añadir 700 µL de una mezcla de fenol 25:cloroformo 24:alcohol isoamílico 1.
10. Centrifugar a 10000 RPM por 10 min a 4 °C.
11. Trasvasar la fase superior a tubos nuevos con 500 µL de isopropanol.
12. Centrifugar a 10000 RPM por 10 min a 4 °C y descartar el sobrenadante.
13. Adicionar 350 µL de etanol al 70 % (v/v).
14. Centrifugar a 10000 RPM por 10 min a 4 °C.
15. Secar el precipitado a 42 °C por 20 a 30 min y resuspender en 50 µL de TE.
16. Incubar a 37 °C por 10 min y conservar a - 20 °C.

Anexo 6. PCR-RFLP del fragmento 5.8s de ARN ribosomal más los ITS colindantes.

Condiciones de la PCR basado en Esteve-Zarzoso et al., 1999[97]

Primers:

ITS1: 5'- TCCGTACGTGAACCTGCGG - 3'

ITS4: 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'

H_2O MilliQ	36,80 ul
Buffer 10X	5,00 ul (1X)
$MgCl_2$	3,00 ul (1.5 mM)
dNTPs (10 mM)	1,00 ul (0.2 mM)
ITS1 (forward)	0,50 ul (0.5 uMol)
ITS4 (reverse)	0,50 ul (0.5 uMol)
Taq polimerasa	0,20 ul (1 U)
TOTAL	47,00 ul

ADN	3,00 ul

El programa de PCR

Incubación 5 min a 95 °C

30 ciclos de:
30 seg a 95 °C (Desnaturalización)
1 min a 52 °C (Hibridación)
1 min a 72 °C (Polimerización)

Al final 7 min a 72 °C para terminar de polimerizar.

Anexo 7. Materiales, reactivos y equipos

a) Materiales

- Tanque de fermentación.
- Placas de Petri.
- Tubos de ensayo de 10 mL.
- Frascos de vidrio de 500 mL.
- Frascos estériles para muestra de 50 mL.
- Cubetas plástico 3 mL para espectrofotómetro.
- Tips de 200 y 1000 uL.
- Tips con filtro de 1000 uL.
- Microtubos de 0,5, 1,5 y 2 mL.
- Criotubos 2 mL.
- Gradillas.
- Micropipeta.

b) Reactivos

- Etanol Q.P. Fisher Chemical
- Ácido láctico Q.P. Sigma-Aldrich
- Ácido acético Q.P. Sigma-Aldrich
- Ácido clorhídrico Q.P. Sigma-Aldrich
- Acetato de sodio Q.P. Sigma-Aldrich
- Ácido bórico Q.P. Sigma-Aldrich
- Borato de sodio Q.P Fisher Chemical
- Tris-hidroximetil-aminometano. Merck
- Solución de ácido sulfúrico de 1 M. Fisher Chemical
- Solución de hidróxido de sodio al 1 M. Fisher Chemical
- Kit comercial para extracción de ADN. Zymo Research
- Marcador 100 pb. Thermoscientific
- Cloranfenicol. Merck
- Agua destilada.
- Glicerol. Difco™
- Pectina. Sigma
- Glucosa. Sigma
- Agarosa. Sigma

- Extracto de levadura. Merck
- Agar nutritivo del Laboratorio Wallerstein (WLN). Oxoid

c) Equipos

- Potenciómetro portátil HANNA INSTRUMENTS. Modelo HI98127.
- Baño termostatizado FRAVILL. Modelo SL.261102
- Centrifugadora EPPENDORF. Modelo 5810R.
- Balanza analítica SARTORIUS. Modelo Entris 224I 1S
- Microscopio binocular de campo LX400. LABOMED.
- Incubadora. PRECISION SCIENTIFIC CO. Modelo 16 Thelco
- Centrífuga EPPENDORF. Modelo Minispin plus
- Agitador magnético VWR. Modelo Hot Plate Stirrer.
- Termociclador APPLIED BIOSYSTEMS. Modelo SimpliAmp.
- Equipo electroforesis. CLEAVER SCIENTIFIC.
- Transiluminador UV. Ultra-Violet Products.

Anexo 8. Imágenes de la metodología



Figura 21. Procesamiento del café por vía húmeda en el “Fundo San Vicente”.

(A) Máquina despulpadora, (B) Poza de fermentacion de café.

Anexo 9. Resultados de la fermentación espontánea por vía húmeda

Tabla 12: Características fisicoquímicas del líquido de fermentación

TIEMPO DE FERMENTACIÓN	pH	DNS (g/L)
0	4,82 ± 0,08	4,56 ± 0,03
3	4,22 ± 0,04	3,83 ± 0,01
6	4,14 ± 0,03	3,83 ± 0,01
9	4,08 ± 0,02	3,44 ± 0,04
12	3,91 ± 0,08	3,16 ± 0,01
15	3,80 ± 0,01	2,49 ± 0,01
18	3,68 ± 0,03	2,03 ± 0,01

DNS: Solución de 3,5-dinitrosalicílico

Tabla 13: Recuento de levaduras presentes en la fermentación espontánea de café por vía húmeda

TIEMPO DE FERMENTACIÓN (h)	Recuento de UFC/mL	Log10 UFC/mL
0	$1,55 \times 10^6$	6,19
3	$6,88 \times 10^6$	6,84
6	$5,07 \times 10^6$	6,71
9	$4,92 \times 10^6$	6,69
12	$5,37 \times 10^6$	6,73
15	$4,42 \times 10^6$	6,65
18	$1,35 \times 10^6$	6,13

Anexo 10. Resultados de los aislados a la tolerancia a factores de estrés

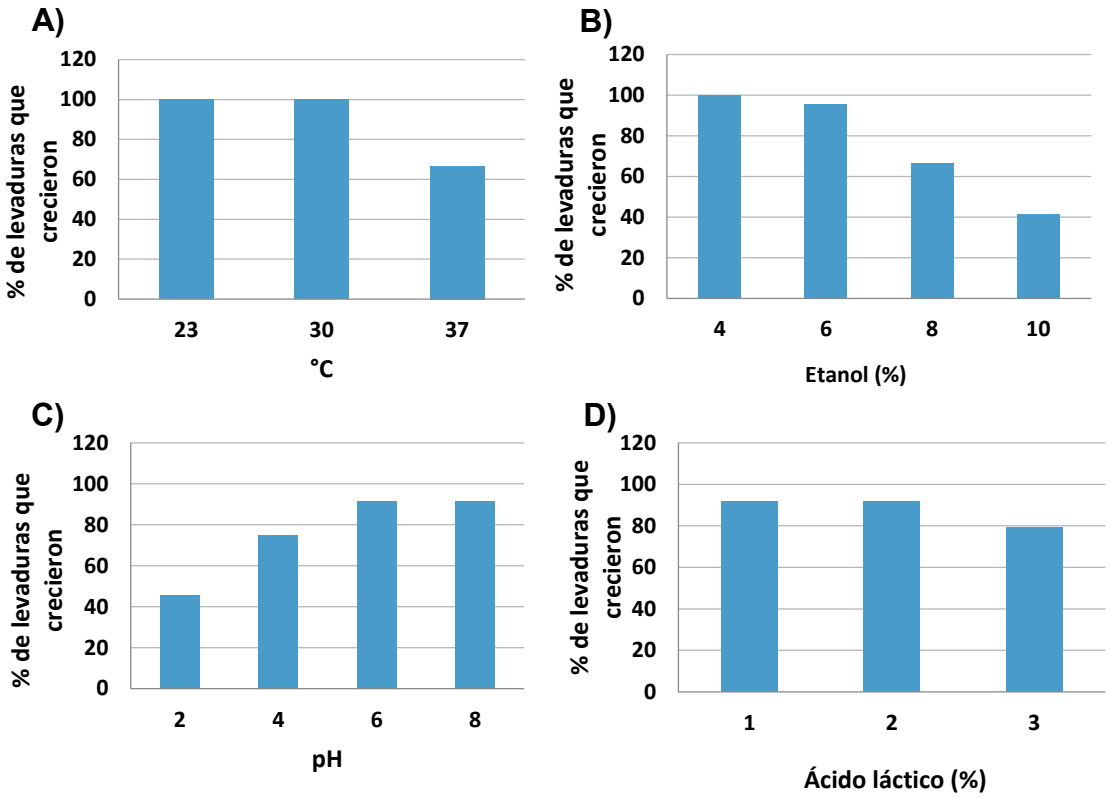


Figura 22. Porcentaje de levaduras cultivadas en diferentes condiciones fisicoquímicas. (A) Temperatura, (B) % etanol, (C) pH, (D) % Ácido láctico

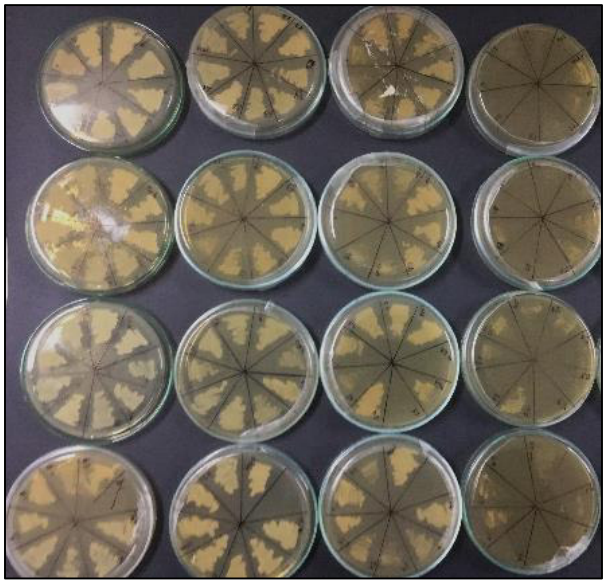


Figura 23. Tolerancia al etanol al 4, 6, 8 y 10%.