



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Química e Ingeniería Química**

**Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial**

**Aprovechamiento de levaduras silvestres aisladas a partir de las heces de coatí (*Nasua nasua*) en la fermentación controlada de café variedad Colombia**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Ingeniera Agroindustrial

**AUTOR**

Heydy Merly TORRES RAMOS

**ASESOR**

Ph. D. Waldir Desiderio ESTELA ESCALANTE

Lima, Perú

2023



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

---

Torres Ramos, H. (2023). *Aprovechamiento de levaduras silvestres aisladas a partir de las heces de coatí (Nasua nasua) en la fermentación controlada de café variedad Colombia*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química, Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

---

## Metadatos complementarios

<b>Datos de autor</b>	
Nombres y apellidos	Heydy Merly Torres Ramos
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	72875208
URL de ORCID	
<b>Datos de asesor</b>	
Nombres y apellidos	Waldir Desiderio Estela Escalante
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	09548299
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0002-8917-7472">https://orcid.org/0000-0002-8917-7472</a>
<b>Datos del jurado</b>	
<b>Presidente del jurado</b>	
Nombres y apellidos	Miriam Estela Memenza Zegarra
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	41564297
<b>Miembro del jurado 1</b>	
Nombres y apellidos	Roberto Robles Calderón
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06078749
<b>Datos de investigación</b>	
Línea de investigación	Tecnología de los alimentos

Grupo de investigación	No aplica
Agencia de financiamiento	Perú. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (Fondecyt). 029-2018-FONDECYT-BMIADT-AV
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Química, Ingeniería Química e Ingeniería Agroindustrial País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Latitud: -12.05819215 Longitud: -77.0189181894387
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2021-2023
URL de disciplinas OCDE	Agricultura, Silvicultura, Pesquería <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.01.00">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.01.00</a> Alimentos y bebidas. <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.11.01">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.11.01</a> Ingeniería de producción. <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.11.03">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.11.03</a>



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

**FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA**  
Central: 619 7000 anexos 1202, 1203, 1205, 1206, 1207    Telefax: 1209, 1218  
Ciudad Universitaria – Av. Venezuela s/n – Lima 1

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL**

## **A C T A DE SUSTENTACIÓN DE TESIS VIRTUAL**

Los suscritos Miembros del Jurado nombrados por la Dirección de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, bajo la Presidencia de la **Mg. MIRIAM ESTELA MEMENZA ZEGARRA**, el **Mg. ROBERTO ROBLES CALDERÓN** (Miembro) y el **Ph.D. WALDIR DESIDERIO ESTELA ESCALANTE** (Asesor), habiendo presentado para el efecto la **TESIS**, titulada “**Aprovechamiento de levaduras silvestres aisladas a partir de las heces de coatí (*Nasua nasua*) en la fermentación controlada de café variedad Colombia**”, después de **SUSTENTADA Y APROBADA LA TESIS** elaborada por el Bachiller en Ingeniería Agroindustrial: **TORRES RAMOS HEYDY MERLY**; para optar el **TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL**, acordando calificarlo con la **NOTA** de:

**DIECIOCHO**

(LETRAS)

**18**

(NÚMEROS)

Lima, 24 de abril del 2023

**Mg. Miriam Estela Memenza Zegarra**  
Presidenta

**Mg. Roberto Robles Calderón**  
Miembro

**Ph.D. Waldir Desiderio Estela Escalante**  
Asesor



Firmado digitalmente por NAGLES  
VIDAL Edgar Orlando FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 16.05.2023 15:44:50 -05:00

**Dr. EDGAR ORLANDO NAGLES VIDAL**  
Director de la EP de Ingeniería Agroindustrial



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

**FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA**  
Central: 619 7000 anexos 1202, 1203, 1205, 1206, 1207 Telefax: 1209, 1218  
Ciudad Universitaria – Av. Venezuela s/n – Lima 1

*“Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional”*

**EP DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

## **INFORME DE EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD**

1. Facultad; Química e Ingeniería Química
2. Escuela Profesional: Ingeniería Agroindustrial
3. Autoridad académica que emite el informe de originalidad: **Director de la Escuela profesional de Ingeniería Agroindustrial**
4. Apellidos y Nombres de la autoridad académica: **Edgar Orlando Nagles Vidal**
5. Operador del programa informático de similitudes: **Turnitin**
6. Documento evaluado Tesis para título de pregrado: **“Aprovechamiento de levaduras silvestres aisladas a partir de las heces de coatí (Nasua nasua) en la fermentación controlada de café variedad Colombia”**
7. Autores del documento:
  - **TORRES RAMOS Heydy Merly**
8. Fecha de recepción del documento: **22/03/2022**
9. Fecha de aplicación del programa informático de similitudes: **24/03/2022**
10. Software utilizado: **Turnitin**
11. Configuración del programa detector de similitudes
  - Excluye textos entrecomillados
  - Excluye bibliografía
  - Excluye cadenas menores a 40 palabras
  - Otros criterios (especificar)
12. Porcentaje de similitudes según programa detector de similitudes: **OCHO POR CIENTO (8%)**
13. Fuentes originales de las similitudes encontradas: **ANEXO ADJUNTO**
14. Observaciones
15. Calificación de originalidad
  - Documento cumple criterios de originalidad, sin observaciones **(8%)**
16. Fecha del informe: **Lima 28/03/2022**



Firmado digitalmente por NAGLES VIDAL Edgar Orlando FAU 20148092282 soft Motivo: Soy el autor del documento Fecha: 28.03.2022 10:21:47 -05:00

Firma del evaluador

/cpa.



Firmado digitalmente por NAGLES VIDAL Edgar Orlando FAU 20148092282 soft Motivo: Soy el autor del documento Fecha: 28.03.2022 10:21:13 -05:00

Dr. Edgar Orlando Nagles Vidal  
Director

## DEDICATORIA

A mis padres y hermana por su apoyo incondicional en cada nuevo paso que doy, por la formación que me brindaron, los valores que me inculcaron y por infundir el deseo de aprender y superarme día a día.

A todas las personas ávidas de adquirir y compartir conocimiento.

*“Fear is temporary, regret is forever”*



## AGRADECIMIENTO

A PROCENCIA por financiar este proyecto bajo el contrato N°29-2018-FONDECYT-BM-IADT-MU y permitir este ansiado logro profesional.

A mi asesor, el Dr. Waldir D. Estela Escalante, por su confianza, guía y conocimientos compartidos durante el desarrollo de esta investigación.

A mi *alma mater*, la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por la formación académica y humana adquirida durante todos estos años de estudio.

A mis profesores, en especial los que me educaron en los ciclos que desarrollé esta tesis, por comprenderme y apoyarme.

A mis padres por su amor, comprensión y apoyo incondicional; a mi hermana por siempre creer en mí y apoyarme en los distintos proyectos que llevé a cabo.

A mi base 16 por darme los mejores momentos en la universidad, por enseñarme la unión y solidaridad.

A todas las personas que siempre me brindaron sus mejores deseos, me apoyaron y confiaron en mí desde el principio, a las que se sumaron en el camino y a los que aún me acompañan.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	12
SUMMARY .....	13
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN .....	14
CAPÍTULO II: OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo general.....	16
2.2 Objetivos específicos .....	16
CAPÍTULO III: MARCO TEÓRICO.....	17
3.1 El café .....	17
3.1.1 Generalidades.....	17
3.1.2 Variedades de café .....	17
3.1.3 Composición fisicoquímica del mucílago .....	19
3.1.4 Procesamiento de café.....	21
3.2 Levaduras .....	23
3.2.1 Generalidades .....	23
3.2.2 Fases de crecimiento de levadura.....	24
3.2.3 Rutas metabólicas.....	25
3.2.4 Características morfológicas .....	26
3.2.5 Actividad pectinolítica .....	27
3.2.6 Producción de etanol .....	28
3.2.7 Levaduras <i>Saccharomyces</i> .....	29

3.2.8	Levaduras No <i>Saccharomyces</i> .....	30
3.3	Fermentación de alimentos .....	31
3.3.1	Fermentación espontánea .....	31
3.3.2	Fermentación controlada .....	32
CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA .....		36
ETAPA I. Recolección y acondicionamiento de la muestra.....		36
ETAPA II. Evaluación de la capacidad fermentativa de azúcares por levaduras aisladas de las heces de coatí para su potencial uso en procesos de fermentación de café.....		36
4.2.1	Evaluación microscópica de la morfología .....	36
4.2.2	Evaluación macroscópica de la morfología .....	37
4.2.3	Evaluación de la capacidad fermentativa de las levaduras en diferentes fuentes de carbono .....	37
ETAPA III. Evaluación de la actividad pectinolítica de las levaduras y la capacidad de producción de etanol para su potencial uso en la fermentación de café .....		38
4.3.1	Evaluación de la actividad pectinolítica de las levaduras aisladas de las heces del coatí.....	38
4.3.2	Evaluación de la producción de etanol en levaduras aisladas de las heces del coatí.....	39
ETAPA IV. Evaluación del comportamiento fermentativo de levaduras en café despulpado de variedad Colombia mediante fermentación semi seca y húmeda ....		39

4.4.1	Comportamiento fermentativo de levaduras en café despulpado de la variedad Colombia mediante fermentación semi seca.....	40
4.4.2	Comportamiento fermentativo de levaduras en café despulpado de la variedad Colombia mediante fermentación húmeda.....	40
4.4.3	Diseño experimental.....	41
CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		44
5.1	Evaluación de la capacidad fermentativa de azúcares por levaduras aisladas de las heces del coatí ( <i>Nasua nasua</i> ) para su potencial uso en procesos de fermentación de café.....	44
5.1.1	Evaluación microscópica de la morfología de las levaduras aisladas de las heces del coatí.....	44
5.1.2	Evaluación macroscópica de la morfología de las levaduras aisladas de las heces del coatí.....	47
5.1.3	Evaluación de la capacidad fermentativa de las levaduras en diferentes fuentes de carbono .....	49
5.2	Evaluación de la actividad pectinolítica de las levaduras y la capacidad de producción de etanol para su potencial uso en la fermentación de café.....	50
5.2.1	Evaluación de la actividad pectinolítica de las levaduras aisladas de las heces del coatí.....	50
5.2.2	Producción de etanol de levaduras aisladas de las heces de coatí en dos medios.....	55
5.3	Evaluación del comportamiento fermentativo de las levaduras aisladas de las	

heces de coatí en dos tipos de fermentación sobre café despulpado de la variedad Colombia. ....	64
5.3.1 Comportamiento fermentativo de las levaduras en fermentación semi seca .....	64
5.3.2 Comportamiento fermentativo de las levaduras en fermentación húmeda	67
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES .....	76
CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES .....	78
CAPÍTULO VIII: REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA .....	79
IX. ANEXOS .....	92

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Composición química del café.....	20
<b>Tabla 2</b> Diversidad morfológica de las levaduras.....	27
<b>Tabla 3</b> Diseño factorial para fermentación seca de café.....	42
<b>Tabla 4</b> Diseño factorial para la fermentación húmeda de café Colombia.....	43
<b>Tabla 5</b> Morfología de las colonias de las levaduras aisladas de las heces del coatí.....	49
<b>Tabla 6</b> Generación de CO <sub>2</sub> y formación de película de las levaduras estudiadas.....	51
<b>Tabla 7</b> Halo de degradación de pectina.....	52
<b>Tabla 8</b> Análisis de varianza (ANOVA) para actividad pectinolítica.....	52
<b>Tabla 9</b> Prueba de rango múltiple Duncan para actividad pectinolítica.....	53
<b>Tabla 10</b> Producción de etanol en jugo de manzana.....	56
<b>Tabla 11</b> Análisis de varianza (ANOVA) para fermentación de jugo de manzana.....	58
<b>Tabla 12</b> Prueba de rango múltiple de Duncan para fermentación en jugo de manzana.....	59
<b>Tabla 13</b> Porcentaje de producción de etanol en mosto de malta.....	60
<b>Tabla 14</b> Análisis de varianza (ANOVA) para fermentación en mosto de malta.....	61
<b>Tabla 15</b> Prueba de rango múltiple de Duncan para fermentación en mosto de malta.....	61
<b>Tabla 16</b> Resultados de la fermentación semi seca con las levaduras estudiadas.....	65
<b>Tabla 17</b> Análisis de varianza (ANOVA) de producción de etanol para <i>P.kudriavzevii</i> en fermentación semi seca.....	67
<b>Tabla 18</b> Análisis de varianza (ANOVA) de producción de ácido acético para <i>P.kudriavzevii</i> en fermentación semi seca.....	67
<b>Tabla 19</b> Resultados de la fermentación húmeda con las levaduras estudiadas.....	70
<b>Tabla 20</b> Análisis de varianza (ANOVA) de producción de etanol de <i>P. kudriavzevii</i> en fermentación húmeda.....	71
<b>Tabla 21</b> Análisis de varianza (ANOVA) de producción de ácido acético de <i>P.kudriavzevii</i> en fermentación húmeda.....	72
<b>Tabla 22</b> Análisis de varianza (ANOVA) de producción de etanol de <i>P. kluyveri</i> en fermentación húmeda.....	73

<b>Tabla 23</b> Análisis de varianza (ANOVA) de producción de ácido acético de <i>P.kluyveri</i> en fermentación húmeda.....	73
<b>Tabla 24</b> Análisis de varianza (ANOVA) de producción de etanol de <i>S.cerevisiae</i> en fermentación húmeda.....	74
<b>Tabla 25</b> Análisis de varianza (ANOVA) de producción de ácido acético de <i>S.cerevisiae</i> en fermentación húmeda.....	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Cerezo de café.....	18
<b>Figura 2</b> Café var. Colombia.....	19
<b>Figura 3</b> Estructura de la pectina.....	21
<b>Figura 4</b> Tipos de procesamientos en la producción de café.....	22
<b>Figura 5</b> Curva de crecimiento de levaduras.....	25
<b>Figura 6</b> Metabolismo fermentativo de glucosa por las levaduras.....	26
<b>Figura 7</b> Fermentación alcohol.....	28
<b>Figura 8</b> Curva de crecimiento celular y etanol.....	29
<b>Figura 9</b> Morfología de <i>Pichia kluyveri</i> en medio sintético.....	45
<b>Figura 10</b> Morfología de <i>Pichia kudriavzevii</i> en medio sintético.....	46
<b>Figura 11</b> Morfología de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio sintético.....	47
<b>Figura 12</b> Morfología macroscópica de las levaduras aisladas de las heces del coatí...	48
<b>Figura 13</b> Cinética de Brix y pH en jugo de manzana y mosto de malta.....	63
<b>Figura 14</b> Porcentaje de etanol (ml de etanol/Kg de café) obtenido por <i>P.kudriavzevii</i> en fermentación semi seca.....	68
<b>Figura 15</b> Superficie 3D para producción de etanol (ml de etanol /Kg de café) de <i>P.kudriavzevii</i> en fermentación húmeda.....	72
<b>Figura 16</b> Superficie 3D para producción de ácido acético (g de ácido acético /Kg de café) de <i>P.kluyveri</i> en fermentación húmeda.....	74
<b>Figura 17</b> Superficie 3D para producción de etanol (ml de etanol /Kg de café) de <i>S.cerevisiae</i> en fermentación húmeda.....	75



## ANEXOS

<b>ANEXO 1</b> Formación de película de las levaduras estudiadas.....	92
<b>ANEXO 2</b> Resultado del análisis de pectina de la empresa Elymar.....	93
<b>ANEXO 3</b> Radio de halos de actividad pectinolítica para (A) <i>P.kudriavzevii</i> , (B) <i>P.kluyveri</i> y (C) <i>S.cerevisiae</i> .....	94
<b>ANEXO 4</b> Sistema de destilación.....	94
<b>ANEXO 5</b> Formación de película en jugo de manzana.....	95
<b>ANEXO 6</b> Formación de película en mosto de malta.....	95
<b>ANEXO 7</b> Tabla nutricional de jugo de manzana Motts.....	96
<b>ANEXO 8</b> Morfología de <i>P.kudriavzevii</i> en jugo de manzana.....	96
<b>ANEXO 9</b> Morfología de <i>P.kluyveri</i> en jugo de manzana.....	97
<b>ANEXO 10</b> Morfología de <i>S.cerevisiae</i> en jugo de manzana.....	97
<b>ANEXO 11</b> Datos experimentales de °Brix y pH en fermentación de jugo de manzana de la marca Motts.....	98
<b>ANEXO 12</b> Datos experimentales de °Brix y pH en mosto de malta	98
<b>ANEXO 13</b> Formación de película <i>P.kluyveri</i> en fermentación de café.....	99
<b>ANEXO 14</b> Formación de película por el género <i>Pichia</i> en fermentación de café en fermentación semi seca.....	99
<b>ANEXO 15</b> No formación de película por el género <i>Saccharomyces</i> en fermentación de café en fermentación semi seca.....	100
<b>ANEXO 16</b> Análisis de varianza (ANOVA) de producción de etanol por parte de <i>P.kluyveri</i> en fermentación semi seca.....	100
<b>ANEXO 17</b> Análisis de varianza (ANOVA) de producción de ácido acético de <i>P.kluyveri</i> en fermentación semi seca.....	101
<b>ANEXO 18</b> Análisis de varianza (ANOVA) de producción de etanol <i>S.cerevisiae</i> en fermentación semi seca.....	101
<b>ANEXO 19</b> Análisis de varianza (ANOVA) de producción de ácido acético de <i>S.cerevisiae</i> en fermentación semi seca.....	101

**ABREVIATURAS**

ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ATP	Adenosín trifosfato
°C	Grados centígrados
Células/ml	Células por mililitro
g/L	Gramos por litro
h	Horas
m	Metros
ml	Mililitros
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
N	Normalidad
PG	Poligalacturonasa
pH	Potencial de hidrogeniones
PME	Pectin metil esterasa
T°	Temperatura
µm	Micrómetros
v/v	Volumen/volumen
PL	Pectin liasa

## RESUMEN

En la presente investigación se evaluó el poder fermentativo de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* y *Pichia kudriavzevii* aisladas de las heces del coatí (*Nasua nasua*) y se realizaron fermentaciones controladas sobre el grano de café de la variedad Colombia. Se identificó la morfología microscópica y macroscópica de las levaduras, resultando *P. kluyveri* y *P. kudriavzevii* con morfología apiculada y colonia blanquecina opaca, mientras que *S. cerevisiae* tuvo morfología globulosa y colonia blanquecina brillante; en cuanto al perfil de azúcares *P. kudriavzevii* y *S. cerevisiae* pudieron fermentar glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa y galactosa; mientras *P. kluyveri* tuvo menor poder fermentativo para maltosa. Se evaluó la capacidad para producir etanol, en donde sobresalió *P. kluyveri* en la fermentación en jugo de manzana ( $4,59\% \text{ v/v} \pm 0,71$ ), mientras que en mosto de malta lideró *S. cerevisiae* ( $1,51\% \text{ v/v} \pm 0,59$ ). Se analizó la actividad pectinolítica, destacando *P. kudriavzevii* la cual tuvo un radio de halo de degradación ( $0,91\text{mm} \pm 0,34$ ). Finalmente la capacidad fermentativa en matraces usando como medio el mucílago del café en una fermentación semi seca en la cual se controló la cantidad del inóculo ( $10^5, 5.005 \times 10^7$  y  $10^8$  células/g) y la temperatura ( $T^\circ$  ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ),  $27^\circ\text{C}$  y  $30^\circ\text{C}$ ) donde se obtuvo que a temperatura ambiente hubo más producción de etanol para las levaduras estudiadas resaltando *P. kudriavzevii* la cual obtuvo 7.56 ml de etanol/ Kg de café a  $25^\circ\text{C}$ . En fermentación húmeda se controló el porcentaje de agua (10%, 20% y 30%), cantidad del inóculo ( $10^5, 5.005 \times 10^7$  y  $10^8$  células/g) donde a mayor concentración de agua se obtuvo menor concentración de ácido acético y etanol para las levaduras estudiadas como es el caso de *P. kudriavzevii* la cual obtuvo el valor más bajo 0.031g de ácido acético/Kg café con una concentración de  $10^5$  y 30% de agua añadida y *P. kudriavzevii* obtuvo la mayor cantidad de etanol 8.055ml de etanol/Kg de café con 10% de agua y  $10^8$ .

## SUMMARY

This investigation evaluated the fermentative power of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Pichia kudriavzevii* isolated from the feces of the coati (*Nasua nasua*) to carry out controlled fermentations on the coffee bean of the Colombia variety. The microscopic and macroscopic morphology of the yeasts was identified, resulting in *P. kluyveri* and *P. kudriavzevii* with apiculate morphology and an opaque whitish colony, while *S. cerevisiae* had a globular morphology with a bright whitish colony; Regarding the sugar profile, *P. kudriavzevii* and *S. cerevisiae* can ferment glucose, fructose, sucrose, maltose and galactose; while *P. kluyveri* could barely ferment maltose. The fermentative capacity to produce ethanol was evaluated, where *P. kluyveri* stood out in the fermentation in apple juice ( $4.59\% \text{ v/v} \pm 0.71$ ), while in malt was led by *S. cerevisiae* ( $1.51\% \text{ v/v} \pm 0.59$ ). The pectinolytic activity was analyzed, highlighting *P. kudriavzevii* since it was the one with the highest halo radius ( $0.91\text{mm} \pm 0.34$ ). Finally, the fermentative capacity in flasks using coffee mucilage as a medium in a semi-dry fermentation in which the amount of inoculum ( $10^5$ ,  $5.005 \times 10^7$  and  $10^8$  cells/g) and the temperature (room temperature ( $25^\circ\text{C}$ ),  $27^\circ\text{C}$  and  $30^\circ\text{C}$ ) were controlled. Where it was obtained that at room temperature there was more ethanol production for *P. kudriavzevii* (7.56 ml of ethanol/Kg of coffee), this being the temperature chosen to carry out the following fermentation. In wet fermentation, the percentage of water (10% 20% and 30%), quantity of the inoculum ( $10^5$ ,  $5.005 \times 10^7$  and  $10^8$  cells/g) was controlled, where a higher concentration of water resulted in a lower concentration of acetic acid and ethanol for the yeasts studied, as is the case of *P. kudriavzevii* which obtained 0.031g of acetic acid/Kg coffee quantity of the inoculum  $10^5$  and 30% of added water and *P. kudriavzevii* obtained 8.055ml of ethanol/Kg coffee with 10% of water and  $10^8$  quantity of inoculum.

## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

El café es la segunda bebida más consumida después del agua y la calidad es el principal factor en el precio final del producto (Pereira & Rizzo, 2021). El Perú se ha convertido en el octavo exportador mundial de café teniendo una exportación promedio anual de 3,6 millones de sacos (MIDAGRI, 2021), produce principalmente café arábigo (World Coffee Research, 2018) que crece entre 600 y 2000 m.s.n.m (MINAGRI, 2020). Nuestro país cuenta con grandes ventajas para obtener café de especialidad debido a que tiene excelentes variedades de café, condiciones climáticas y geográficas. Sin embargo, para ser competitivos es necesario superar limitaciones en cuanto a tecnología, recursos, gestión y organización, además formular estrategias de largo plazo en las que se tomen en cuenta los intereses de toda la cadena productiva, desde los caficultores hasta las exportadoras, en una relación en la que todas las partes se encuentren beneficiadas (Castro et al., 2004).

Uno de los cafés más caros del mundo es peruano y es elaborado por el coatí (*Nasua nasua*) el cual es un mamífero proveniente del orden Carnívoro y la familia *Procyonidae* y su habitat se encuentra localizado en todo América del Sur. Viven en manadas excepto los machos cuando llegan a la edad adulta. La dieta del coatí es variada y es clasificado como un animal omnívoro (Rodrigues et al., 2021). En su alimentación incluye una dieta de gusanos, insectos, legumbres, lagartos, pequeños roedores y frutas (Oliveira, 2011). El café se encuentra entre las frutas que consume; luego de la digestión, los productores cafetaleros usan las heces de este animal para producir un café de alta calidad muy valorado en el mercado internacional. Este café es conocido

como “café misha” y su costo por kilogramo es de USD 1400 (Café Misha | HIGHLAND PRODUCTS).

*Pichia kluyveri*, *Pichia kudriavzevii* y *Saccharomyces cerevisiae* son parte de los microorganismos que habitan en las heces del coatí y forman parte importante en la fermentación del café durante su paso por el tracto gastrointestinal. Las levaduras no *Saccharomyces* como *P. kluyveri* y *P. kudriavzevii* han sido consideradas durante muchos años como contaminantes en la industria de alimentos fermentados. En los últimos años las levaduras no *Saccharomyces* han venido siendo estudiadas y se ha demostrado que participan benéficamente en el proceso de fermentación dando un buen aporte en las características sensoriales (Estela Escalante, 2018)

En el Perú hay poco conocimiento acerca de las fermentaciones controladas con levaduras y el gran impacto que pueden generar en la calidad de taza final del café, por lo tanto, en este estudio se propone evaluar las características y la capacidad fermentativa de tres levaduras aisladas de las heces del coatí (*Nasua nasua*) realizando fermentaciones controladas en el café de variedad Colombia.

## CAPÍTULO II: OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Evaluar el potencial aprovechamiento de levaduras aisladas a partir de las heces de coatí (*Nasua nasua*) en la fermentación de café variedad Colombia.

### 2.2 Objetivos específicos

- Evaluar la capacidad fermentativa de azúcares por parte de las levaduras aisladas de las heces del coatí (*Nasua nasua*) en medio sintético para su potencial uso en fermentación decafé.
- Evaluar la actividad pectinolítica de levaduras aisladas de las heces del coatí (*Nasua nasua*) para su potencial uso en la fermentación de café.
- Evaluar la capacidad de producción de etanol usando jugo de manzana y extracto de malta para su potencial uso en fermentación de café.
- Evaluar el comportamiento fermentativo de levaduras aisladas de las heces del coatí (*Nasua nasua*) en café despulpado de la variedad Colombia mediante fermentación semi seca y húmeda, mediante la producción de ácido acético y etanol.

## CAPÍTULO III: MARCO TEÓRICO

### 3.1 El café

#### 3.1.1 Generalidades

El café (*Coffea arábica*) es un arbusto de hoja perenne que normalmente crece de 3 a 5 m de altura y pertenece a la familia *Rubiaceae*. Su nombre proviene de la bebida árabe llamada *Caffa*, nombre que es también distrito del sur de Etiopía (Alvim, 1985). El fruto del café está compuesto por el embrión; dos semillas (endospermo) y el pericarpio el cual está formado por la piel plateada (espermodermo), el pergamino (endocarpio), el mucílago (mesocarpio), y la piel externa o también llamada pulpa (epicarpio) (Figura 1). El epicarpio puede tener una tonalidad oscura cuando el fruto está maduro (Hameed et al., 2018). El cultivo de café tiene 4 etapas en su ciclo fenológico las cuales son: descanso, floración, llenado de grano y cosecha. El café es una planta que tiene altos requerimientos del recurso hídrico para efectuar su proceso metabólico; la temperatura juega un rol importante en la calidad de la producción de café, las altas temperaturas disminuyen la capacidad de absorción de la planta y las bajas temperaturas disminuyen la intensidad de floración; el rango de temperaturas óptimas es entre 18°C - 22°C (INIA, 2012).

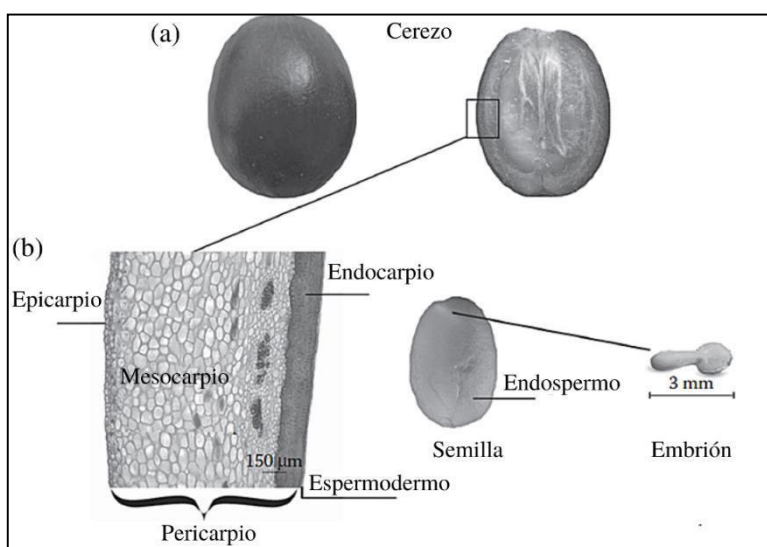
#### 3.1.2 Variedades de café



Existen probablemente 25 especies de las cuales las más importantes son *Coffea arábica* (Café Arábica) y *Coffea canephora* (Café Robusta). La especie Arábica es un arbusto grande con frutos ovalados, susceptible a plagas y cultivado en todo Latinoamérica, África central y oriental, India e Indonesia (International Coffee Organization, 2021). Representa el 70% de la producción mundial.

**Figura 1**

*Cerezo de café*



*Nota:* Adaptado de Schwan y Fleet, 2014

### 3.1.2.1 Variedad Colombia

La variedad Colombia es parte de la especie *Coffea arábica*, es además multilínea y se originó del cruce de las variedades Caturra e híbrido de Timor CIFC 1343 en el país Colombia (Asociación Nacional del Café, 2019). Se comenzó a cultivar en 1980 después de que la plaga

conocida como roya (*Hemileia vastatrix*) infestara los países cafeteros debido a que es una variedad resistente a esta plaga. Posee características fenotípicas y genotípicas similares a las variedades Caturra y Costa Rica (Julca et al., 2018).

El tamaño del grano es relativamente grande teniendo un promedio de 83% siendo mayor que la variedad Típica que tiene un 75% (Alvarado & Puerta, 2002). La variedad Colombia logra sobresalir por su acidez, intensidad y cuerpo; siendo considerada como un café especial, además tiene un alto rendimiento en frutos/planta, la relación de conversión de café cerezo a café pergamino no es muy alta comparada con variedades como Costa Rica y Catimor (Alvarado et al., 2018).

### **Figura 2**

*Café var. Colombia*



#### **3.1.3 Composición fisicoquímica del mucílago**

El mucílago es también llamado mesocarpio interno (Hameed et al., 2018). La capa mucilaginosa del cerezo de café es rica en agua entre 81 y 91 por ciento (Puerta & Ríos, 2011) carbohidratos, proteínas y minerales (Murthy & Madhava, 2012)

**Tabla 1***Composición química del café*

<b>Parámetros (%)</b>	<b>Pulpa de café</b>	<b>Cáscara de café</b>	<b>Pergamino</b>	<b>Desecho de café</b>
Hemicelulosa	2.3 ± 1.0	7.0 ± 3.0	13.1 ± 9.0	36.7 ± 5.0
Proteína	11.5 ± 2.0	8.0 ± 5.0	18.6 ± 4.0	13.6 ± 3.8
Grasa	2.0 ± 2.6	0.5 ± 5.0	2.2 ± 1.9	ND
Fibra total	60.5 ± 2.9	24 ± 5.9	62.4 ± 2.5	ND
Polifenoles totales	1.5 ± 1.5	0.8 ± 5.0	1.0 ± 2.0	1.5 ± 1.0
Azúcares totales	14.4 ± 0.9	58.0 ± 20.0	6.65 ± 1.0	8.5 ± 1.2
Pectina	6.5 ± 1.0	1.6 ± 1.2	0.02 ± 1.0	0.01 ± 0.005
Lignina	17.5 ± 2.2	9.0 ± 1.6	1.0 ± 2.0	0.05 ± 0.05
Taninos	3.0 ± 5.0	5.0 ± 2.0	0.02 ± 0.1	0.02 ± 0.1
Ácido clorogénico	2.4 ± 1.0	2.5 ± 0.6	3.0 ± 0.5	2.3 ± 1.0
Cafeína	1.5 ± 1.0	1.0 ± 0.5	0.03 ± 0.6	0.02 ± 0.1

*Nota:* De Mussatto et al. (2011b), Franca et al. (2009) y Murthy y Madhava Naidu (2010). Recuperado de (Murthy & Madhava Naidu, 2012)

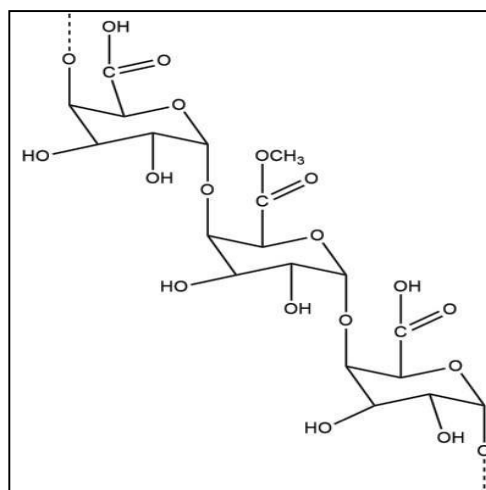
### 3.1.3.1 Pectina

La pectina es un heteropolisacárido compuesto por monómeros del ácido D-galacturónico (AGal) los cuales están unidos por enlaces galacturónicos  $\alpha$  - (1→4), una parte de los grupos carboxílicos del AGal están esterificados con grupos metoxilos (Figura 3), el porcentaje de esterificación de los grupos carboxilos determinará el grado de esterificación. Se considera pectina de alto metoxilo (HMP) si el grado de esterificación es mayor a 50% y pectina de bajo metoxilo (LMP) si es menor a 50%, las características de la pectina varían de acuerdo a su grado de esterificación, por lo cual la HMP necesita mayor cantidad de azúcares para gelificar y es muy sensible a medios ácidos, mientras que la LMP puede formar geles suaves en la presencia de iones como el calcio (Chamyuang et al.,2021)

La pectina del mucílago del café es de alto metoxilo (Avallone et al., 2000), esta pectina es posiblemente formada por pequeñas homogalacturosas con sustituciones de xilogalacturanos o ramnogalacturonanos y es posible su uso para la formación de películas y revestimientos (Valdespino et al., 2021)

**Figura 3**

*Estructura de la pectina*



*Nota:* Tomado de Chamyuang et al., 2021

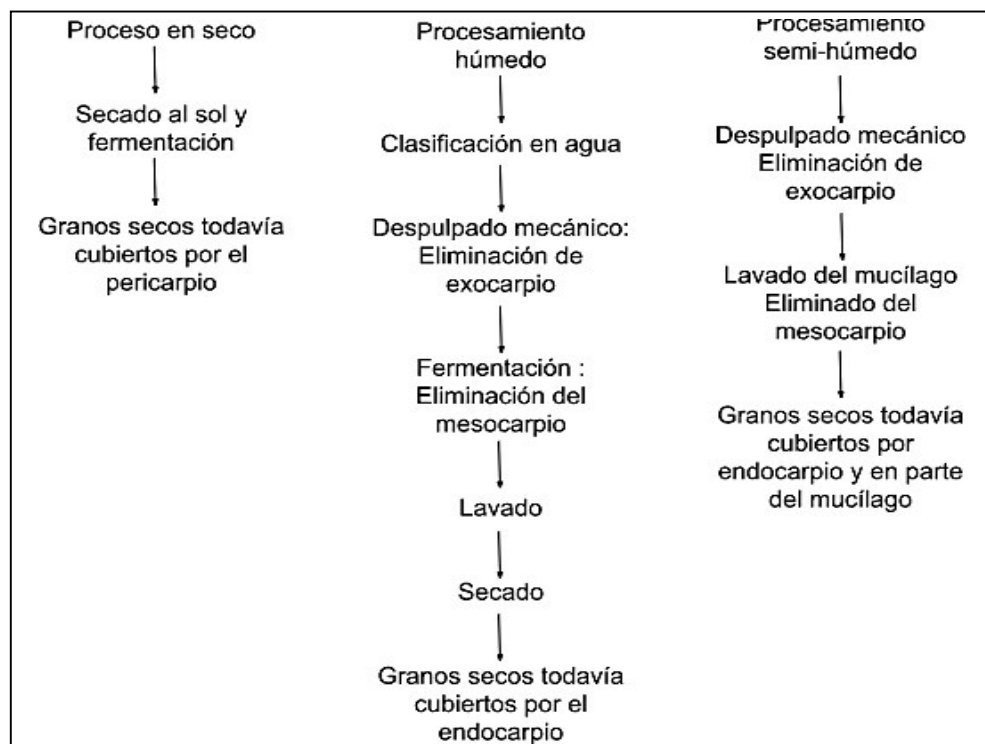
### **3.1.4 Procesamiento de café**

En el proceso de café, los granos pueden ser clasificados entre verdes, inmaduros y maduros. Esta selección se hace para mejorar la calidad sensorial de la bebida final. La presencia de granos inmaduros durante el procesamiento puede reducir la calidad.

El café tiene como parte de su procesamiento la cosecha, la eliminación de la pulpa, luego el secado y tueste. El procedimiento puede hacerse de 3 maneras diferentes (seco, semi seco o húmedo) para obtener las semillas (Figura 4). No solo existe una diferencia de rendimiento en los tres métodos de procesamiento, sino también en los productos resultantes (granos de pergamino con o sin resto de mucílago o granos aún cubiertos por el pericarpio completo).

**Figura 4**

*Tipos de procesamientos en la producción de café*



*Nota:* Tomado de Huch & Franz, 2015

El procesamiento del café Arábica usando el método húmedo se realiza en Brasil, Colombia, Perú, América central y Hawái.

Después del secado se retira el pergamino lignificado para obtener granos verdes de café. La calidad del café no está influenciada solamente por la presencia de granos inmaduros sino también por la presencia de otros granos defectuosos como marrones o negros, que son demasiados maduros y arrugados, agrios o dañados por insectos y por la presencia de material extraño (Huch & Franz, 2015).

## 3.2 Levaduras

### 3.2.1 Generalidades

La palabra levadura proviene de las palabras “espumoso” y “levantar” y está relacionado al proceso de fermentación. Las levaduras son organismos eucariotas que podemos encontrar en distintos lugares como aire, suelo, en la superficie de las plantas y forman parte del proceso de fermentación (Estela Escalante, 2018); son hongos unicelulares y según su filogenia pueden ser ascomicetos y basidiomicetos (Navarro, 2015), por esa razón las levaduras son parte del reino *Fungi* que se reproducen asexualmente por gemación o fisión y no forman sus estados sexuales dentro o en el esporocarpio (Kurtsman et al., 2011).

Las levaduras son organismos quimioorganotróficos ya que asimilan monosacáridos, disacáridos y trisacáridos, obtienen el nitrógeno de fuentes orgánicas e inorgánicas. Requieren minerales (P, Mg), microelementos (K, Ca, Si, S, Fe, Zn, etc.) y vitaminas (tiamina, biotina, ácido pantoténico) (Navarro, 2015), no son muy demandantes nutricionalmente como las bacterias (Estela, 2018).

Las dimensiones de las levaduras pueden oscilar entre 1-9  $\mu\text{m}$  de ancho y de 2 a más  $\mu\text{m}$  de longitud estos dependen de la especie, nutrición, edad y otros factores (Bejarano et al., 2007). Las levaduras resisten temperaturas entre 35 y 43  $^{\circ}\text{C}$ , cuando la temperatura es mayor a 35 $^{\circ}\text{C}$  el poder fermentativo disminuye.

### 3.2.2 Fases de crecimiento de levadura

La levadura atraviesa distintas etapas durante su ciclo de vida (Figura 5) y se mencionan a continuación:

**Fase de latencia:** Fase de adaptación de la levadura. Hay una intensa actividad metabólica, pero sin crecimiento debido a que las levaduras están enfocadas a adaptarse al nuevo medio.

**Fase de crecimiento:** Comienza la reproducción asexual por gemación o fisión, esta etapa es larga.

**Fase exponencial:** Se registra el crecimiento máximo. El tiempo de generación es constante. Se puede calcular el crecimiento mediante esta ecuación:

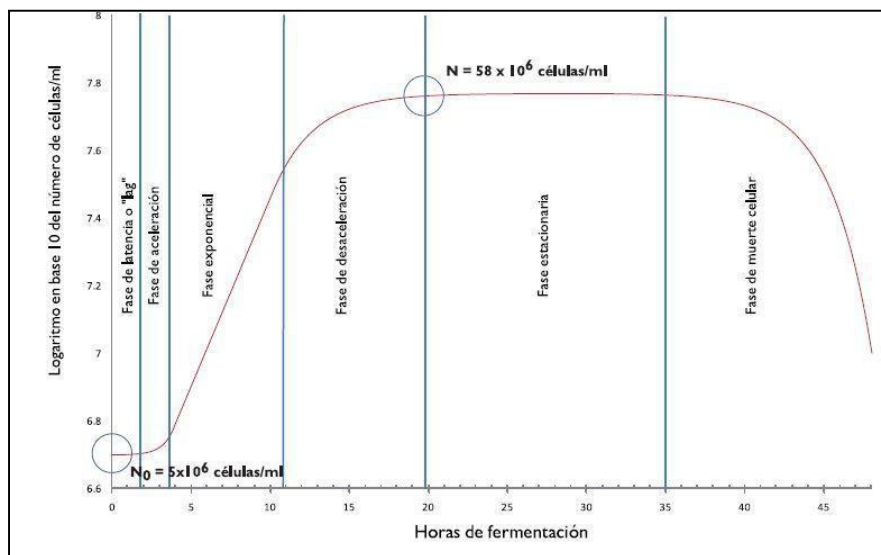
$$N=N_02^g$$

N=número de células en un tiempo dado;  $N_0$ =número de células al inicio de la fase exponencial; g=tiempo de generación =t/z (t=tiempo, z=número de generaciones)

**Fase de desaceleración de crecimiento:** Las fuentes de energía y nutrientes comienzan a agotarse y la generación de metabolitos tóxicos impiden el crecimiento máximo. El tiempo de generación se incrementa, produciendo una disminución del crecimiento.

**Fase estacionaria:** La tasa de muerte celular iguala al crecimiento celular, las células pueden sobrevivir períodos prolongados en esa condición, a la vez se exponen más a la toxicidad de los metabolitos que han generado (alcohol, ácidos orgánicos, etc.)

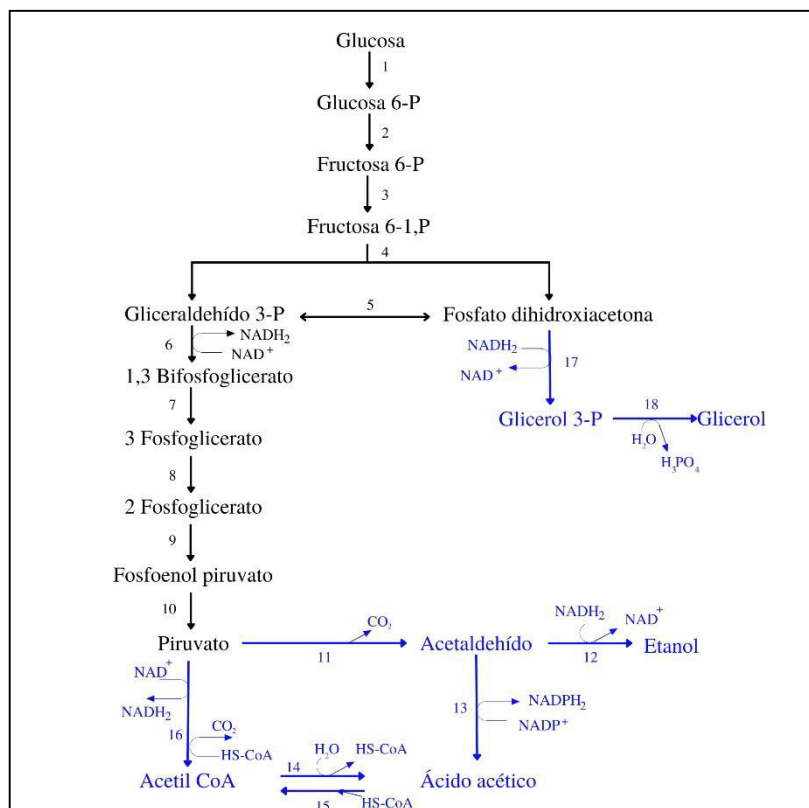
**Fase de muerte celular:** La tasa de mortalidad supera a la de crecimiento y disminuyen la cantidad de células vivas (Navarro, 2015)

**Figura 5***Curva de crecimiento de levaduras**Nota: Tomado de Navarro, 2015*

### 3.2.3 Rutas metabólicas

Para todas las levaduras las rutas fermentativas comienzan con la glucólisis o *Embden-Meyerhof* (Figura 6), siendo el principal producto de esta vía los 2 piruvatos formados. Esta ruta es indispensable en cualquier condición ya sea que las levaduras se encuentren en un medio aeróbico o anaeróbico. En condiciones aeróbicas hay una oxidación completa de la glucosa y podemos obtener 36 moles netos de ATP por glucosa en fosforilación oxidativa; pero en condiciones anaeróbicas el piruvato es convertido a acetaldehído y luego a etanol produciendo dos ATP. En condiciones anaeróbicas la célula invierte la poca energía obtenida en su crecimiento, como consecuencia de la cantidad de etanol producida por la propia levadura, esta comienza a inhibirse (Estela Escalante, 2018)



**Figura 6***Metabolismo fermentativo de glucosa por las levaduras*

*Nota:* Adaptado de Estela, 2018

### 3.2.4 Características morfológicas

Las levaduras pueden ser redondas, ovoides o cilíndricas, el tamaño de las levaduras se ve afectado por la especie (Tabla 2) y las condiciones de crecimiento de 1-10 $\mu$ m. También pueden influir en el tamaño las etapas del ciclo celular y la edad de las células individuales.

La gran mayoría de las levaduras tienen brotes multilaterales, aunque algunas otras tienen brotes de los poros y generan morfología tipo limón (Nuñez, 2015).

**Tabla 2***Diversidad morfológica en levaduras*

<b>Tipo de morfología</b>	<b>Descripción</b>	<b>Género típico</b>
Elipsoidal	Ovalada, forma de balón de Rugby	<i>Saccharomyces</i>
Esférica	Esferas completas	<i>Debaryomyces</i>
Cilíndrica	Cilindros con extremos semiesféricos	<i>Schizosaccharomyces</i>
Apiculada	En forma de limón	<i>Hanseniaspora, Saccharomycodes</i>
Ojival	Alargada y redondeada en un extremo	<i>Dekkera, Brettanomyces</i>
Filamentosa	Presentan hifas o pseudohifas	<i>Candida albicans, Yarrowia lipolytica</i>
Triangular	Los brotes están restringidos a 3 ápices	<i>Trigonopsis</i>
Curvada	Con forma de media luna	<i>Cryptococcus cereanus Sterigmatomyces</i>

*Nota:* Tomado de Núñez, 2015

### **3.2.5 Actividad pectinolítica**

Los microorganismos (levaduras, bacterias, y *fungi*) juegan un papel importante en la degradación de compuestos debido a la presencia de enzimas (Haile & Kang, 2019a). Las enzimas pectinolíticas pertenecen a un grupo heterogéneo de enzimas que hidrolizan la parte péctica de los tejidos de la planta. Las pectinasas tienen una amplia aplicación en los procesos fermentativos (Graham, 2008). Son el 25% del mercado de las enzimas, además, son amigables con el medio ambiente y son de gran importancia en la industria de café, té, cacao, extracción de aceite, clarificación de jugos y vinos.

Las principales enzimas en la fermentación de café son poligalacturonasa, pectin liasa y pectinmetilesterasa (Haile & Kang, 2019a)

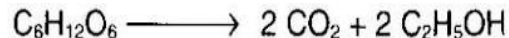
### 3.2.6 Producción de etanol

Las levaduras como la mayoría de los hongos son organismos que tienen una respiración aeróbica pero que en condiciones de ausencia de oxígeno fermentan los hidratos de carbono a etanol y dióxido de carbono (Figura 7).

La fermentación de glucosa a etanol consta de 2 etapas, primero la descarboxilación del piruvato por la piruvato-descarboxilasa (1) con participación de la enzima tiamina pirofosfato, formándose acetaldehído; este se reduce a etanol  $\text{NADH}_2$  mediante la alcohol-deshidrogenasa (Schlegel, 1997)

**Figura 7**

*Fermentación alcohólica*



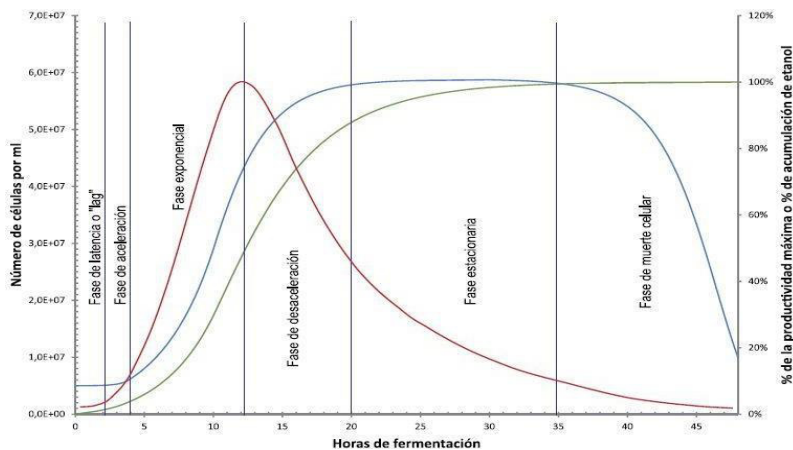
*Nota:* Tomado de Schlegel, 1997

La acumulación de etanol durante la fermentación es un factor de estrés para la célula y ocasiona la muerte celular (Figura 8). La concentración de etanol es determinante para la supervivencia o muerte de la levadura (Navarro, 2015)

La velocidad de producción de etanol no es constante en todas las etapas de fermentación.

Figura 8

*Curva de crecimiento celular y etanol*



*Nota:* Curva de crecimiento (línea azul), curva de productividad de alcohol (línea roja) y acumulación de etanol (línea verde). Tomado de Navarro,2015

### 3.2.7 Levaduras *Saccharomyces*

El género *Saccharomyces* incluye varias levaduras que tienen en común la fácil fermentación de azúcares y la incapacidad de sintetizar nitratos, entre ellas tenemos: *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae*, etc.

#### 3.2.7.1 *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* es una levadura ascomiceta que es usada en procesos fermentativos para la producción de productos alimenticios como: pan, cerveza, vino, etc.

Es, además, anaerobia facultativa y *crabtree* positiva; es el microorganismo más asociado al progreso y bienestar de la humanidad debido a los distintos usos que se le ha dado; su nombre

proviene de *Saccharo* (azúcar), *myces* (hongo) y *cerevisiae* (cerveza). Es heterótrofa y tiene una alta capacidad fermentativa, se encuentra distribuida ampliamente y es fácil de ser aislada (Suárez et al., 2016)

### **3.2.8 Levaduras No *Saccharomyces***

Las levaduras *No Saccharomyces* desde hace muchos años han sido descritas como contaminantes en bebidas fermentadas (Jolly et al., 2014), pero en las últimas décadas se han venido realizando estudios donde se ha resaltado la importancia de las levaduras *No Saccharomyces* en procesos fermentativos ya que estas aportan buen perfil sensorial al producto terminado (Fleet, 2003).

Estas levaduras se encuentran distribuidas en diferentes frutas (MAMBUSCAY et al., 2013) Las características resaltantes de este tipo de levaduras incluye un aumento en el contenido de glicerol y acidez total, la secreción de enzimas y producción de metabolitos secundarios que mejoran el perfil sensorial (Drumonde-Neves et al., 2021).

#### **3.2.8.1 *Pichia kluyveri***

*Pichia kluyveri* es una levadura *No Saccharomyces* perteneciente a la familia *Pichiaceae* y descubierta por Bedford en 1942 (Bensch, 2021) que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y es comúnmente aislada de frutas y de las partes pulposas de las plantas en productos que incluyen un proceso de fermentación como: vino, café, etc.

Esta levadura es capaz de potenciar los sabores a frutas debido a que usa más eficientemente los precursores aromáticos que se encuentran en su medio (FROOTZEN®).

Es también conocida como *Hansenula kluyveri* (Bensch, 2021) es reconocida por su actividad *killer* y por producir un *biofilm* en su desarrollo al ser cultivado en medio líquido (Vicente et al., 2021)

### 3.2.8.2 *Pichia kudriavzevii*

*Pichia kudriavzevii* pertenece a la familia *Pichiaceae* y descubierto en Boidin, Pignal & Besson en 1965 (Bensch, 2021) y es ampliamente usada en la industria alimentaria en procesos fermentativos, se encuentra de manera natural en la fermentación de cacao (Lagos Narváez, 2017) y café (Haile & Kang, 2019b; Pérez Escalante, 2019)

Es conocida por tener distintos nombres como: *Candida glicerínógenes*, *Issatchenkia orientalis*, *Candida krusei* y *Pichia kudriavzevii* (Douglass et al., 2018)

## 3.3 Fermentación de alimentos

La fermentación es una manera para conservar los alimentos desde las antiguas civilizaciones, este proceso es bioquímicamente complejo en el cual los protagonistas son las levaduras, aunque también hay interacción con las bacterias y otros microorganismos (Torija Martinez, 2002)

### 3.3.1 Fermentación espontánea

Son aquellas fermentaciones que se desarrollan de manera natural, al azar con las levaduras que se encuentran en el fruto sin ningún tipo de inoculación externa. Las levaduras que llevan a cabo esta fermentación son de distintas cepas y especies, por lo tanto, la producción de componentes aromáticos y alcohol son irrepetibles y bastante aleatorios (Raynal et al., 2011)

Los cerezos de café desencadenan un proceso de fermentación anabólicos y catabólicos que se lleva a cabo debido a su composición química y a la actividad de los microorganismos (Pereira Louzada & Rizzo Moreira, 2021). Las enzimas producidas por los microorganismos como levaduras y bacterias degradan y transforman los azúcares, ácidos, proteínas y lípidos en compuestos como cetonas, ésteres, alcoholes y ácidos que van a cambiar la estructura química de la matriz, generando olores, cambios en el pH, en el color, etc (Puerta-Quintero & Echeverry-Molina, 2015)

### ***3.3.2 Fermentación controlada***

Es aquella fermentación que toma en cuenta parámetros como porcentaje de agua, temperatura, pH final, aireación, agitación y tiempo de fermentación.

Este tipo de fermentación contribuye a optimizar las operaciones de campo, el tiempo del proceso y la calidad del producto final; pudiendo contar con una calidad de taza final del café alta. Además, permite también tener un mejor control de los residuos de la cadena de producción y tener un producto estandarizado (Puerta-Quintero & Echeverry-Molina, 2015).

#### ***3.3.2.1 Tipos de fermentación de café***

Durante la fermentación del café los microorganismos producen diversos metabolitos. La actividad microbiana y el tiempo de fermentación determinan la cantidad de azúcares y aminoácidos libres que se encuentran en el grano y que contribuyen a la formación de compuestos volátiles en la reacción de Maillard durante el proceso de tostado (De María et al., 1996).

La fermentación es un proceso crucial no solo para remover el mucílago del café sino para generar características sensoriales de calidad, solo si la fermentación ha sido llevada a cabo de la manera correcta (Haile & Kang, 2019a)

- ***Fermentación seca***

La fermentación seca es la forma más antigua y fácil de fermentar, nos da como resultado un café sin lavar. Este método es usado en países como Brasil, Etiopía, Haití, Indonesia y Paraguay, que cuentan con largos periodos de sol y tienen menor frecuencia de precipitaciones. Este proceso se usa generalmente para el café Robusta.

En el proceso en seco, los granos cosechados son a menudo en su etapa madura, para luego ser secados al sol a un nivel de humedad de aproximadamente 10-11%. La fermentación y el secado duran aproximadamente entre 10-25 días dependiendo de las condiciones climáticas. Como resultado se tiene un grano todavía cubierto por el pericarpio, que luego pueden ser pelados mecánicamente.

El método seco se usa para producir marcas de café más baratas. Este procesamiento tiene su propia diversidad de microorganismos, ecología, estructura y naturaleza comunitaria en comparación del método húmedo y semiseco. Esta característica otorga una diferenciada calidad de taza final (Hameed et al., 2018).



- ***Fermentación semi seca***

La fermentación semi seca es una variación de la fermentación húmeda y es también conocida como el proceso de pulpeado natural, el proceso de fermentación ocurre de manera directa bajo el sol sobre una plataforma (Schwan et al., 2012).

En el proceso semiseco, el exocarpio y la mayor parte del mesocarpio son eliminados en el proceso de lavado (como en el proceso húmedo), y los granos se secan al sol o aire hasta que su contenido de humedad alcanza 11%. El mucílago permanece adherido al exterior del pergamino durante el secado o puede retirarse mecánicamente.

La calidad en la taza con este proceso depende bastante de la decisión de erradicar o mantener el mucílago restante (Hameed et al., 2018).

- ***Fermentación húmeda***

En el método húmedo, la cáscara y la pulpa son eliminados mecánicamente para eliminar el exocarpio, dejando el mesocarpio (mucílago) presente y adherido en el grano. Estos granos con mucílago son llevados a tanques de agua donde se dejan fermentar durante 6 a 72 h (dependiendo de la temperatura del medio), en donde el mucílago presente se degrada y solubiliza.

Después de la fermentación, los granos se retiran del estanque y son secados al sol. Al finalizar la eliminación del mucílago se obtienen tres tipos de café: (i) grano de café pelado, obtenido después del pelado y secado; (ii) café completamente lavado, obtenido después del pelado y posterior eliminación del mucílago por fermentación; y (iii) café en el cual el mucílago se elimina específicamente por medios mecánicos.

La pulpa y el mucílago ricos en nutrientes son la causa de una buena población de microorganismos durante todo este proceso.

Los atributos de taza en este proceso se deben principalmente a dos razones, los cuales son el uso de granos maduros para este proceso y el adecuado control del proceso (Hameed et al., 2018)

## CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA

Para una mejor organización de la investigación, esta se dividirá en cuatro etapas:

### **ETAPA I. Recolección y acondicionamiento de la muestra**

Los cerezos de café fueron recolectados del distrito Chirinos, provincia de San Ignacio, departamento de Cajamarca. La cosecha fue selectiva se escogió solo los cerezos maduros, se transportaron a Lima en baldes limpios con orificios para asegurar la llegada de los cerezos en estado óptimo.

Se realizó un despulpado (retiro del epicarpio) manual de los cerezos de café y se guardó en bolsas Ziploc de 500g y se puso en congelación hasta su uso en la última etapa.

### **ETAPA II. Evaluación de la capacidad fermentativa de azúcares por levaduras aisladas de las heces de coatí para su potencial uso en procesos de fermentación de café**

Las levaduras usadas para esta investigación fueron *Saccharomyces cerevisiae* LBTF 21.3, No.CP\_033481.1; *Pichia Kluyveri* LBTF.Lev3, No.NG\_055122.1 y *Pichia kudriavzevii* LBTF 21.4, No. KX\_538801.1 obtenidas del Laboratorio de Bioprocesos y Tecnologías de Fermentación. Estas levaduras fueron aisladas de las heces del coatí identificadas con el KIT API y corroboradas en los laboratorios de MACROGEN®.

#### **4.2.1 Evaluación microscópica de la morfología**

La evaluación microscópica de las levaduras estudiadas se realizó de manera cualitativa describiendo la morfología celular. Las características que se tomaron en cuenta fueron: tipo de gemación, la forma de las células, el color y la textura. Para esto, se propagaron las levaduras

usando como medio extracto de levadura 5 g/L y glucosa 20 g/L para luego ponerlos en un agitador orbital a una velocidad constante de 180 RPM por 2 días a temperatura ambiente.

Se tomó una alícuota de lo propagado, se colocó en un portaobjetos se añadió una gota de agua destilada estéril, se emulsificó y se realizó una tinción simple con cristal violeta; finalmente, se observó en un microscopio, con un objetivo de 100X al cual se añadió una gota de aceite de inmersión (Lagos Narváez, 2017).

#### ***4.2.2 Evaluación macroscópica de la morfología***

Para describir la morfología de las colonias de levaduras, se tomó una asada de las levaduras que se encontraban en medios de tubos inclinados y se realizó el sembrado por agotamiento y punto en placas Petri las cuales contenían medio agar oxitetraciclina-glucosa extracto de levadura (OGYE) y se incubó a 30°C x 1 día.

Los parámetros a tomarse en cuenta para la descripción fueron: forma del margen, superficie, brillo, textura y color.

#### ***4.2.3 Evaluación de la capacidad fermentativa de las levaduras en diferentes fuentes de carbono***

En esta etapa se evaluó la fermentación en 5 tipos de azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, galactosa). Se determinó el poder fermentativo en cada tipo de azúcar. Para evaluar la fermentación de azúcares se emplearon los tubos Durham.

En cuatro tubos de ensayo se colocó un medio sintético formulado con extracto de levadura 10 g/L, Mg (SO<sub>4</sub>) 1g/L, Mn (SO<sub>4</sub>) 1g/L y la fuente de carbono a emplear 20 g/L. Cada tubo llevó un azúcar diferente: glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, galactosa, manteniendo los demás componentes en igual proporción para llevarlos a un pH de 5.5. Se colocaron los tubos Durham

esterilizados. Se inoculó en cada uno de los tubos la cepa de *S.cerevisiae*, *P. kluyveri*, *P.kudriavzevii* los cuales fueron previamente propagados por 2 días a temperatura ambiente y con agitación constante 180 RPM en extracto de levadura 5g/L y glucosa 20 g/L. Luego se depositaron en falcón estériles los cuales fueron centrifugados a 2100 RPM x 15 min, se retiró el sobrenadante en la cabina de flujo laminar, se agregó agua estéril se homogeneizó con uso del Vortex y luego se centrifugaron, repitiendo este procedimiento 2 veces. Finalmente se tomó 100 ml de muestra y se leyó en el espectrofotómetro a 600 nm y se inoculó 300 ml de la misma en los tubos a evaluar.

Se procedió a incubar a 30 °C y se evaluó cada 12 horas la producción de CO<sub>2</sub> y formación de película, a través de una escala de intensidades. Finalmente se presentó el mayor poder fermentativo de la levadura frente a los azúcares utilizando una escala de intensidad que van de 1 a 3, siendo 3 la mayor intensidad y 1 el mínimo para cada azúcar.

### **ETAPA III. Evaluación de la actividad pectinolítica de las levaduras y la capacidad de producción de etanol para su potencial uso en la fermentación de café**

#### ***4.3.1 Evaluación de la actividad pectinolítica de las levaduras aisladas de las heces del coatí***

Se realizó en medio sintético que estuvo compuesto por: Agar 15 g/L, pectina cítrica 5 g/L de la marca Elymar, (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2 g/L, almidón 1 g/L, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.02 g/L, MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0.02 g/L, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.002 g/L (Jacob et al., 2008). El medio se ajustó a pH de 5.5, una vez estéril, se vertió el medio, aproximadamente 10 ml, en placas Petri, luego de enfriar se dividió la parte externa inferior de la placa en 4 secciones con tinta indeleble.

Se sembró por agotamiento y por punto las levaduras *S. cerevisiae*, *P. kluyveri*, *P.kudriavzevii* en cada sección. Finalmente se incubaron a 30°C y se realizó un seguimiento cada 24 horas, en el tercer día se tomó la foto en un fondo oscuro para poder apreciar el halo formado por el consumo de pectina.

#### **4.3.2 Evaluación de la producción de etanol en levaduras aisladas de las heces del coatí**

Para los ensayos de producción de etanol se evaluaron dos medios: Medio extracto de malta a 12,7 °Brix y pH de 4,86 y jugo de manzana comercial de la marca MOTT 'S (libre de azúcares añadidos pero suplementado con ácido ascórbico 120%) con 11,7°Brix y pH de 3,67; el indicador de finalización en el tiempo de fermentación fue el agotamiento de azúcares al tener 2 medidas de °Brix repetidas. El inóculo se propagó en medios de extracto de malta y jugo de manzana luego se centrifugaron a 3000 min<sup>-1</sup> por 8 min y lavaron con agua estéril; se repitió el proceso dos veces, se inoculó aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/ml a los matraces esterilizados (121°C, 15 min) con los respectivos medios y se colocaron *airlocks* que fueron previamente desinfectados en alcohol de 70° x 3h, se agregó agua a los *airlocks* para asegurar la salida del CO<sub>2</sub> sin contaminación y los frascos se pusieron a fermentar a temperatura ambiente, sin agitación y en un lugar limpio y seco.

La determinación de etanol se realizó mediante el uso de la INEN 2322 (Rueda et al., 2002) con el método del picnómetro para el cual se elaboró el sistema (ANEXO 4).

### **ETAPA IV. Evaluación del comportamiento fermentativo de levaduras en café despulpado de variedad Colombia mediante fermentación semi seca y húmeda**

#### ***4.4.1 Comportamiento fermentativo de levaduras en café despulpado de la variedad Colombia mediante fermentación semi seca***

En la fermentación semi seca se evaluó de acuerdo a la Tabla 3 el efecto de la temperatura ambiente (25°C), 27°C y 30°C las cuales fueron controladas en una incubadora y la concentración celular ( $10^5$ ,  $5.005 \times 10^7$  y  $10^8$  células/g) las cuales fueron obtenidas después de hacer un recuento celular en la cámara Neubaue las diluciones del inóculo de las levaduras a estudiar; luego fueron añadidas al café despulpado y comenzaron el proceso de fermentación durante 3 días.

Finalmente se evaluó la producción de etanol y ácido acético en el medio.

##### **4.4.1.1 Para la producción de etanol:**

La determinación cuantitativa del etanol se realizó mediante destilación con un sistema (ANEXO 4) de acuerdo con el método del picnómetro INEN 2322 (Rueda et al., 2002).

##### **4.4.1.2 Para la producción de ácido acético:**

La determinación cuantitativa del ácido acético se realizó usando 25 ml del aguamiel de las fermentaciones de las levaduras *S. cerevisiae*, *P. kluyveri*, *P. kudriavzevii*.

Se separó la biomasa del medio por centrifugación (3000 RPM x 8 min), se evaluó la acidez volátil después de destilar completamente la muestra y se obtuvo por titulación la cantidad de ácido acético siguiendo la metodología descrita en la INEN 341 (Valencia et al., 1976)

#### ***4.4.2 Comportamiento fermentativo de levaduras en café despulpado de la variedad Colombia mediante fermentación húmeda***

En la fermentación húmeda se evaluó de acuerdo a la Tabla 4, el efecto de la concentración celular ( $10^5$ ,  $5.005 \times 10^7$  y  $10^8$  células/g) las cuales fueron obtenidas después de hacer un recuento

celular en la cámara Neubaue de las diluciones del inóculo de las levaduras a estudiar y el porcentaje de agua añadido (10%, 20 y 30%) la temperatura se mantuvo constante (Temperatura ambiente).

Se inocularon las diferentes concentraciones en café despulpado y se controló la fermentación por tres días y luego se evaluó la producción de etanol y ácidos de acuerdo a lo descrito en el apartado anterior.

#### ***4.4.3 Diseño experimental***

Los datos obtenidos en cada etapa cuantitativa se analizaron estadísticamente a través del programa SPSS. Los resultados se presentaron con tabla ANOVA como promedios y error estándar en base a las repeticiones realizadas.

Una vez conocido el comportamiento fermentativo de las levaduras en cuanto a fermentación de azúcares, producción de etanol y actividad pectinolítica, se procedió a la fermentación a nivel de matraces. El diseño experimental se presentó para cada una de los tipos de fermentaciones a los que fueron sometidos los granos de café como se muestra a continuación:

##### **4.4.3.1 Fermentación semi seca**

Se evaluó las variables de temperatura y concentración de inóculo con granos despulpados de café. Se empleó la unidad de diseño factorial completo  $2^2$  con dos repeticiones donde se obtuvo un total de 12 ensayos experimentales. La distribución de datos se muestra a continuación en la tabla 3, los cuales fueron obtenidos del programa Design-Expert 11.



**Tabla 3***Diseño factorial para fermentación semi seca de café*

STD	Run	A: Concentración del inóculo cel/g	B: Temperatura °C	Producción de etanol (g/Kg de café)	Producción de ácido acético (g/Kg de café)
7	1	$1 \times 10^8$	30°C		
8	4	$1 \times 10^8$	30°C		
5	10	$1 \times 10^5$	30°C		
6	11	$1 \times 10^5$	30°C		
10	12	$5.005 \times 10^7$	27°C		
12	7	$5.005 \times 10^7$	27°C		
11	8	$5.005 \times 10^7$	27°C		
9	9	$5.005 \times 10^7$	27 °C		
1	2	$1 \times 10^5$	T° ambiente(25°C)		
2	5	$1 \times 10^5$	T° ambiente(25°C)		
3	6	$1 \times 10^8$	T° ambiente(25°C)		
4	3	$1 \times 10^8$	T° ambiente(25°C)		

**4.4.3.2 Fermentación húmeda**

Se usó la mejor temperatura obtenida como resultado de la etapa anterior. Se analizaron las variables porcentaje de agua y concentración de inóculo con granos despulpados de café. Se empleó un diseño factorial completo  $2^2$  con dos repeticiones donde se obtuvo un total de 12 ensayos experimentales. La distribución de datos se muestra a continuación en la Tabla 4 los cuales fueron obtenidos del programa Design-Expert 11.

**Tabla 4***Diseño factorial para la fermentación húmeda de café Colombia*

<b>STD</b>	<b>Run</b>	<b>A: Concentración del inóculo cel/g</b>	<b>B: Porcentaje de agua %</b>	<b>Producción de etanol (g/Kg de café)</b>	<b>Producción de ácido acético (g/Kg de café)</b>
5	1	$1 \times 10^5$	30		
6	11	$1 \times 10^5$	30		
7	4	$1 \times 10^8$	30		
8	9	$1 \times 10^8$	30		
9	8	$5.005 \times 10^7$	20		
12	6	$5.005 \times 10^7$	20		
10	2	$5.005 \times 10^7$	20		
11	3	$5.005 \times 10^7$	20		
2	5	$1 \times 10^5$	10		
1	12	$1 \times 10^5$	10		
3	10	$1 \times 10^8$	10		
4	7	$1 \times 10^8$	10		

## CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Evaluación de la capacidad fermentativa de azúcares por levaduras aisladas de las heces del coatí (*Nasua nasua*) para su potencial uso en procesos de fermentación de café

#### 5.1.1 Evaluación microscópica de la morfología de las levaduras aisladas de las heces del coatí

Las levaduras estudiadas presentaron diversas morfologías dependiendo del género y especie a la que pertenecen, además de la fase de crecimiento en la que se encontraron.

Las figuras que se muestran a continuación son de levaduras propagadas en extracto de levadura 5 g/L y glucosa 20 g/L fueron tomadas en el microscopio Scientific YJ-2016B usando una resolución de 100 X y con ayuda de aceite de inmersión.

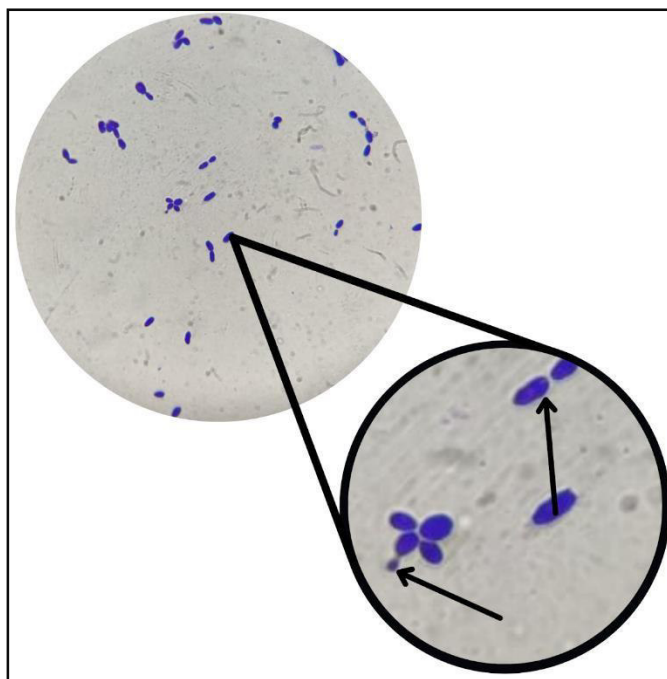
Seguidamente se procederá a describir de manera simple la morfología de las levaduras estudiadas.

##### 5.1.1.1 *Pichia kluyveri*

- Forma de la célula: Ovoide, alargada, apiculada
- Reproducción asexual: Polar

**Figura 9**

*Morfología de Pichia kluyveri en medio sintético*



*Pichia kluyveri* al inicio de la fermentación tuvo una forma ovalada y tamaño reducido, con el paso de los días su morfología fue tornándose elongada y su tamaño tendió a incrementarse ligeramente como también lo indica Kurtzman, (2011b) donde describió que después de 3 días de propagación el tamaño de *P. kluyveri* pasó de  $2 \times 4 \mu\text{m}$  a  $5,5 \times 11 \mu\text{m}$ .

La reproducción de esta especie fue asexual por gemación polar (Figura 9), ya que esta clasificación se da de acuerdo al lugar donde se realizó la aparición de la célula hija, si este se da en un solo polo es llamado gemación polar (Kurtzman et al., 2011)

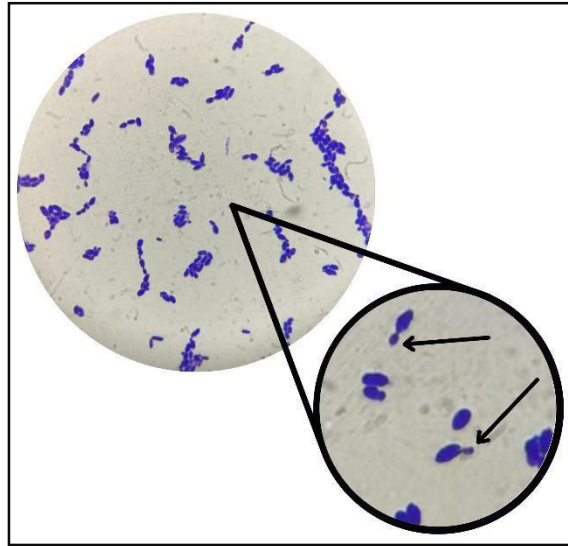
#### 5.1.1.2 *Pichia kudriavzevii*

- Forma de la célula: Ovoide alimonada

- Reproducción asexual: Polar

**Figura 10**

*Morfología de Pichia kudriavzevii en medio sintético*



*Pichia kudriavzevii* al inicio de la fermentación presentó una forma ovoide alimonada que con el pasar de los días comenzó a elongar, tuvo un máximo de tres días en propagación, además de presentar un mayor tamaño que la especie *P. kluyveri* lo mismo es descrito por Kurtzman (2011a) donde además indica que el tamaño se incrementó de  $1.3 \times 3.3 \mu\text{m}$  a  $6.0 \times 14 \mu\text{m}$ .

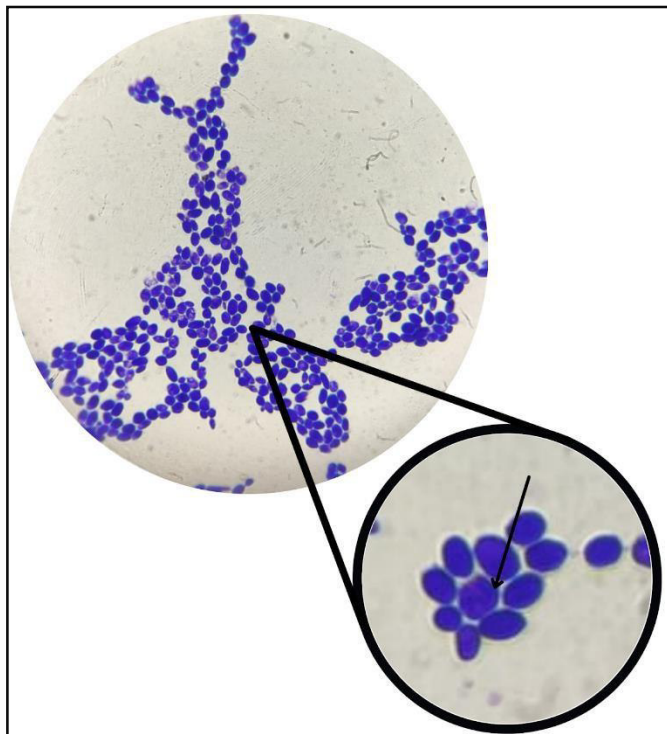
La reproducción de esta levadura fue asexual polar (Figura 10)

### 5.1.1.3 *Saccharomyces cerevisiae*

- Forma de la célula: Circular, esférica, globosa
- Reproducción asexual: Multipolar

**Figura 11**

*Morfología de Saccharomyces cerevisiae en medio sintético*



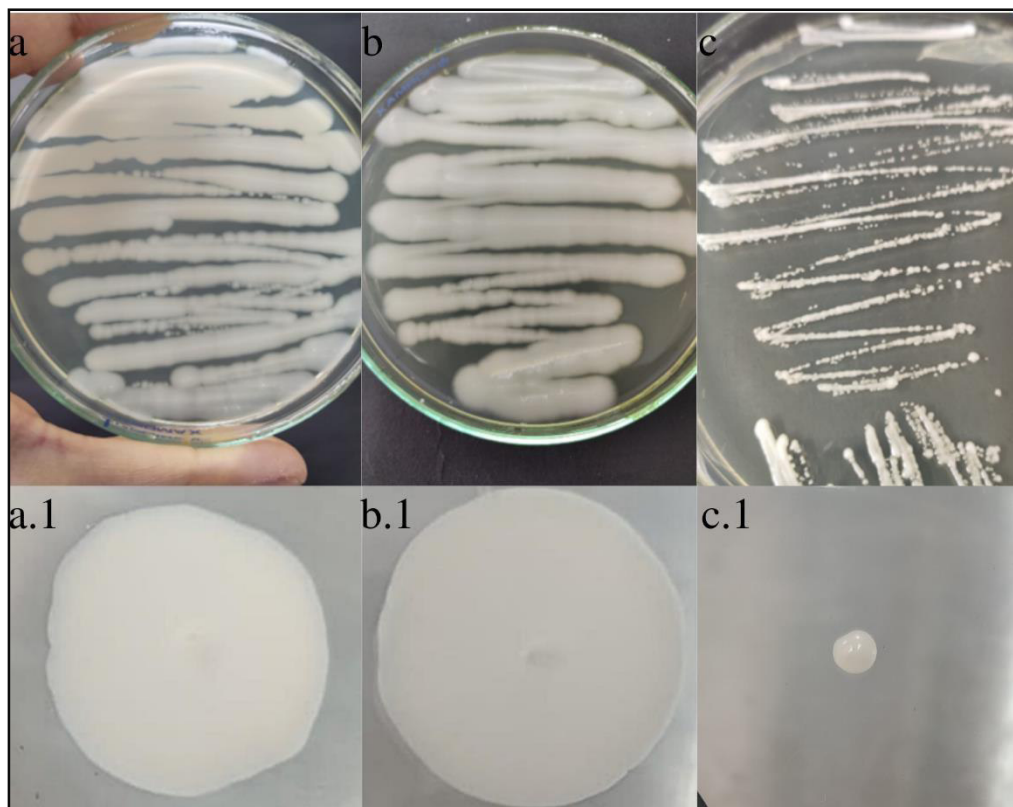
*Saccharomyces cerevisiae* presentó forma ovalada, globulosa y con gemación multilateral (Figura 11) después de haber sido propagada por tres días como también lo describe Vaughan-Martini & Martini (2011) mientras que esta descripción contrastó con lo encontrado por Lagos Narváez (2017) donde la *Saccharomyces cerevisiae* estudiada tuvo gemación monopolar.

### **5.1.2 Evaluación macroscópica de la morfología de las levaduras aisladas de las heces del coatí**

A nivel macroscópico luego de 3 días de incubación a 30° en medio OGYE se identificó una diferencia marcada entre los géneros *Pichia* y *Saccharomyces* para la morfología de las colonias tal como se muestra en la Tabla 5.

**Figura 12**

*Morfología macroscópica de las levaduras aisladas de las heces del coatí*



*a. Pichia kluyveri* en medio OGYE con sembrado en agotamiento, a.1. *Pichia kluyveri* en medio OGYE con sembrado en punto; *b. Pichia kudriavzevii* en medio OGYE con sembrado en agotamiento, b.1. *Pichia kudriavzevii* en medio OGYE con sembrado en punto y *c. Saccharomyces cerevisiae* en medio OGYE con sembrado en agotamiento, c.1. *Saccharomyces cerevisiae* en medio OGYE con sembrado en punto.

La descripción morfológica de estas levaduras (Figura 12) van de acuerdo a lo descrito por Kurtzman (2011a) quien visualizó después de incubar a 25 °C en placa Dalmau, algunas ramificaciones de pseudohifa, además describió a las colonias del género *Pichia* como

blanquiñosas, opacas y un poco polvorientas, con finas estrías que irradian desde el centro hacia el exterior, con márgenes enteros finamente aserrados, como se puede evidenciar en la Fig. 12; además se concordó con lo encontrado por Moon et al., (2014) quien describe a esta colonia como opaca y rugosa.

**Tabla 5**

*Morfología de las colonias de las levaduras aisladas de las heces del coatí*

<b>Especie</b>	<b>Margen</b>	<b>Elevación</b>	<b>Superficie</b>	<b>Brillo</b>	<b>Textura</b>	<b>Color</b>
<i>P. kluyveri</i>	Rizoide	Plana	Lisa	Opaca	Seca	crema con centro blanco
<i>P. kudriavzevii</i>	Rizoide	Plana	Lisa	Opaca	Seca	crema con centro blanco
<i>S. cerevisiae</i>	Circular	convexa	Lisa	Brillante	Butirosa	crema

El color blancuzco de estas levaduras, las cuales fueron aisladas de las heces de coatí (*Nasua nasua*), se pudo haber debido a la falta de exposición al sol de la muestra como también lo describen Gutiérrez (2007) y Jacobs & Sundin (2001).

### **5.1.3 Evaluación de la capacidad fermentativa de las levaduras en diferentes fuentes de carbono**

La evaluación de la fermentación se dio en 3 días basada en la generación de CO<sub>2</sub> (Tabla 6) donde se asignó el valor de +, si la campana estaba llena hasta un 1/3, ++, si la campana estaba llena 1/2 y +++, si la campana estaba completamente llena. Las levaduras *Pichia kudriavzevii* y *Saccharomyces cerevisiae* presentaron capacidad fermentativa para todos los azúcares estudiados; por otra parte, *Pichia Kluyveri* mostró ligera capacidad fermentativa para maltosa, pero sí para



los demás azúcares. La levadura *Pichia kudriavzevii* mostró menor eficiencia para degradar los azúcares en comparación de *Saccharomyces cerevisiae*.

Contrariamente con los resultados obtenidos en esta investigación Kurtzman (2011) describió que el género *Pichia* solamente fermenta glucosa ; mientras que otros autores como Mari et al., (2016) encontraron que 2 cepas de *P. kluyveri* aisladas de aceite de oliva tuvieron capacidad fermentativa para más azúcares como glucosa, sorbosa y xilosa dejando la posibilidad que de acuerdo al ecosistema de donde son aisladas el perfil de consumo de azúcares pueda variar, como también lo aseguró Phaff & Starmer (1987) quien describió que la utilización de azúcares por parte de las levaduras es altamente específica y es está relacionado con un nicho en específico.

En este experimento se evidenció formación de películas solamente por el género *Pichia* para todos los azúcares fermentables, concordando con lo encontrado por Vicente et al., (2021) quien describió que la formación de película es característico del género *Pichia* e incluso es indicador de una correcta inoculación de este microorganismo.

## **5.2 Evaluación de la actividad pectinolítica de las levaduras y la capacidad de producción de etanol para su potencial uso en la fermentación de café**

### ***5.2.1 Evaluación de la actividad pectinolítica de las levaduras aisladas de las heces del coatí***

La pectina al ser un polisacárido necesita usar enzimas para su hidrólisis como son: poligalacturonasa (PG), pectin metil esterasa (PME) y pectin liasa (PL) (Schwan et al., 2014)

**Tabla 6**

*Generación de CO<sub>2</sub> y formación de película de las levaduras estudiadas*

Azúcares fermentables	12h			24h			36h			48h			60h			72h		
	<i>S.c</i>	<i>P.kl</i>	<i>P.ku</i>	<i>S.c</i>	<i>P.kl</i>	<i>P.ku</i>	<i>S.c</i>	<i>P.kl</i>	<i>P.ku</i>	<i>S.c</i>	<i>P.kl</i>	<i>P.ku</i>	<i>S.c</i>	<i>P.kl</i>	<i>P.ku</i>	<i>S.c</i>	<i>P.kl</i>	<i>P.ku</i>
Glucosa	+	-	-	+++	+	+	+++	+++ <sup>1</sup>	+++ <sup>1</sup>	+++	+++ <sup>3</sup>	+++ <sup>3</sup>	+++	+++ <sup>3</sup>	+++ <sup>3</sup>	+++	+++ <sup>3</sup>	+++ <sup>3</sup>
Fructosa	+	-	-	+++	+	+	+++	+++ <sup>1</sup>	+++ <sup>1</sup>	+++	+++ <sup>3</sup>	+++ <sup>3</sup>	+++	+++ <sup>3</sup>	+++ <sup>3</sup>	+++	+++ <sup>3</sup>	+++ <sup>3</sup>
Sacarosa	+	-	-	+++	-	-	+++	+	+	+++	+++ <sup>2</sup>	++ <sup>3</sup>	+++	+++ <sup>3</sup>	+++ <sup>3</sup>	+++	+++ <sup>3</sup>	+++ <sup>3</sup>
Maltosa	-	-	-	++	-	-	+++	-	-	+++	- <sup>2</sup>	+ <sup>2</sup>	+++	- <sup>2</sup>	+++ <sup>3</sup>	+++	- <sup>3</sup>	+++ <sup>3</sup>
Galactosa	-	-	-	+	-	-	+++	+	+	+++	++	++	+++	+++ <sup>3</sup>	+++ <sup>3</sup>	+++	+++ <sup>3</sup>	+++ <sup>3</sup>

*Nota:* Elaboración propia, fermentación en medio sintético a 28°C x 72h; (+) campana Durham llena 1/3, (++) campana Durham llena (1/2), (+++) campana Durham completamente llena; 1 poca formación de película, 2 mediana formación de película, 3 alta formación de película.

La importancia de la actividad pectinolítica en levaduras es acelerar la degradación del mucílago del café (Jayani et al., 2005) ya que el mucílago de café es rico en pectinas (Schwan & Fleet, 2015). A pesar de que los frutos de café tienen enzimas estas no son lo suficientemente eficientes para degradar el mucílago, las que degradan el mucílago son aquellas enzimas que provienen de los microorganismos nativos que se encuentran en la superficie del café (Agate & Bath, 1966; Maicas, 2020; Silva et al., 2013) aunque Elhalis et al., (2020) agregó el antifúngico denominado Natamicina al mucílago de café y concluyó que la degradación de la pectina es independiente de las levaduras.

**Tabla 7***Halo de degradación de pectina*

<b>Levaduras</b>	<b>Halo de degradación (mm)</b>
<i>Pichia kudriavzevii</i>	0,916 <sup>a</sup> ± 0,34
<i>Pichia kluyveri</i>	0,525 <sup>b</sup> ± 0,06
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,220 <sup>c</sup> ± 0,06

*Nota:* Los resultados son presentados al tercer día de inoculación como promedio desviación estándar (n=12), las medias que están denotadas con letras diferentes en cada columna son significativamente diferentes.

**Tabla 8***Análisis de varianza (ANOVA) para actividad pectinolítica*

<b>Variaciones</b>	<b>S.C</b>	<b>G.L</b>	<b>M.C</b>	<b>F</b>	<b>Prob</b>	<b>F de tabla</b>
Entre grupos	2.92	2	1.46	34.38	8.51x 10 <sup>-9</sup>	3.28
Dentro de los grupos	1.40	33	0.04			
Total	4.32	35				

Como es mostrado en la Tabla 7, la máxima degradación de pectina, después de 3 días a 30°C en medio sintético adicionado con pectina cítrica, se dio por *P. kudriavzevii*, mientras la menor se dio por *S. cerevisiae*.

Según lo observado en la Tabla 8 se mostró que hay diferencias significativas en el estudio realizado (F calculado > F crítico) por tal razón se efectuó la prueba de comparaciones múltiples Duncan (Tabla 9) para conocer si existen diferencias significativas entre cada una de las medias de los halos de degradación de las levaduras, donde se observó que existen diferencias significativas entre los halos de degradación de cada una de las levaduras estudiadas al 95% de

confiabilidad ya que las medias de cada levadura es diferente: *S. cerevisiae* 0,220; *P.kluyveri* 0,525 y *P.kudriavzevii* 0,916 y se encuentran localizadas en distintas columnas.

**Tabla 9**

*Prueba de rango múltiple de Duncan para actividad pectinolítica*

Levadura	N	1	2	3
<i>S. cerevisiae</i>	12	0,220		
<i>P. kluyveri</i>	12		0,525	
<i>P.kudriavzevii</i>	12			0,916
Sig		1	1	1

Nota: Prueba post hoc analizada con el software SPSS, alfa 0,05

La importancia de la actividad pectinolítica de las levaduras radica en que la hidrólisis de la pectina disminuye la viscosidad natural de la pectina y facilita la mezcla y penetración del aire que facilita el crecimiento de los microorganismos fermentativos (Schwan et al., 2014) por ende un menor tiempo de fermentación y la penetración de compuestos volátiles en el grano de café.

Para el género *Pichia* ambas levaduras mostraron actividad pectinolítica concordando con Moon et al., (2014) quien evaluó la producción de enzimas poligalacturonasas en levaduras aisladas de un alimento coreano llamado *kimchi* concluyendo que la levadura *P. kudriavzevii* tuvo una altísima producción de esta enzima incluso a 10°C comparada con *Kazachstania bulderi*; además tuvo aún mayor eficiencia a los 30°C.

*P. kluyveri* mostró actividad pectinolítica, concordando con lo descrito por Masoud & Jespersen (2006) quienes al analizar 4 cepas de *P. kluyveri* obtuvieron desde 10 mm hasta 30 mm de diámetro de halo después de incubar por 2 días en placas Petri a 25°C en medio sintético de

levadura ácida poligalacturónico (YPA), además *P. kluyveri* mostró una gran producción de la enzima poligalacturonasa.

En cuanto a *Saccharomyces cerevisiae* los valores bajos para actividad pectinolítica también fueron presentados por Haile & Kang (2019) quienes obtuvieron 120% y 118% de degradación de pectina después de incubar a 2 cepas de *S. cerevisiae*, por 5 días en medio sintético de levadura ácido poligalacturónico suplementado con pectina cítrica (YPDA). Siendo uno de los valores más bajos seguido de los obtenidos de las cepas de *P. kudriavzevii* las cuales obtuvieron 125% y 110%; en esa investigación el máximo porcentaje lo obtuvo *W. anomalus* con 160% de degradación. No obstante, de Melo Pereira et al., (2014) obtuvo que dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* obtuvieron los niveles más altos de secreción de poligalacturonasa.

Géneros como *Pichia* y *Debaryomyces* juegan un gran rol en la degradación del mucílago del café y además pueden inhibir el crecimiento de hongos micotoxigénicos como *Aspergillus* (Evangelista et al., 2015; Ramos et al., 2010) la adición de estas levaduras en la fermentación de productos como café, cacao, vino, etc podrían disminuir las contaminaciones por hongos, en especial *Aspergillus niger* el cual produce altas concentraciones de la enzima PME (daSilva et al., 2005), la cual es la responsable de hidrolizar el ácido galacturónico en pectatos y en metanol (Jayani et al., 2005), siendo este último un alcohol tóxico el cual puede causar desde ceguera hasta la muerte (Villegas et al., 2011).

Además, los productos (en especial los zumos de frutas) realizados con enzimas comerciales provenientes del género *Aspergillus* tienden a tener menor sabor, debido a la volatilización de los ésteres; mayor inestabilidad, debido a la precipitación de la pectina; y elevado contenido de metanol (Gàmez & Díaz, 2008). El metanol no es un producto de la fermentación y

su presencia en las bebidas alcohólicas es debido a la acción de la enzimática sobre la pectina presente en el sustrato.

En cuanto a la morfología de las levaduras estudiadas en medio enriquecido con pectina (ANEXO 3) el género *Pichia* presentó en ambos casos bordes irregulares y rizoides con aspecto opaco, por otra parte *Saccharomyces cerevisiae* presentó una colonia redonda, brillante, cremosa y con elevación además un tamaño menor de colonia comparado con el demostrado en la Figura 11, donde el sustrato era rico en glucosa, esto pudiendo explicarse como lo indicó Stewart (2009) debido a la deficiencia respiratoria y a las mutaciones espontáneas que en el caso de *Saccharomyces* es frecuente y toman el nombre de “*petite*” y es causado por un segmento en el ADN de la mitocondria que genera un genoma defectuoso, estas deficiencias mitocondriales conllevan la deficiencia por parte de la levadura para metabolizar fuentes de carbono como lactato, glicerol o etanol e incluso maltosa y maltotriosa, además los subproductos de este tipo de levaduras presentan altos niveles de diacetilo y alcoholes superiores.

## ***5.2.2 Producción de etanol de levaduras aisladas de las heces de coatí en dos medios***

### **5.2.2.1 Producción de etanol en medio jugo de manzana**

El jugo de manzana tiene como azúcares principales fructosa, glucosa y sacarosa; el ácido málico es el más abundante y para el caso de jugo de manzana de la marca Motts (ANEXO 7) contiene sodio, potasio, hierro y una sobresaliente cantidad de ácido ascórbico.

El tiempo de fermentación para las levaduras No *Saccharomyces* fue de aproximadamente 20 días y para *S.cerevisiae* casi 11 días (ANEXO 11)

La levadura con mayor producción de etanol en jugo de manzana fue *Pichia kluyveri* con 4.59 % v/v  $\pm$  0.71 (Tabla 10) teniendo ésta el punto más bajo de pH alcanzado en la cinética de fermentación llegando a 3.11 de pH (Figura 13), *P. kluyveri* inclusive superó la cantidad de etanol producida por *Saccharomyces cerevisiae* 3.30 % v/v  $\pm$  0.63 pero no es la primera vez que se registra un hecho como este, Amaya-Delgado et al., (2013) obtuvo mayor eficiencia en la producción de etanol en tequila con la levadura *P. kluyveri* (0.48 % v/v  $\pm$  0.03) comparada con *S. cerevisiae*.

**Tabla 10**

*Producción de etanol en jugo de manzana*

<b>Levaduras</b>	<b>Porcentaje de etanol (v/v)</b>
<i>Pichia kudriavzevii</i>	4.31 <sup>a</sup> $\pm$ 0,52
<i>Pichia kluyveri</i>	4.59 <sup>a</sup> $\pm$ 0,71
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.30 <sup>b</sup> $\pm$ 0,63

La levadura *P.kudriavzevii* presentó también mayor producción de etanol donde se obtuvo 4.31 % v/v  $\pm$  0.52 (Tabla 10), según los autores Sharma et al., (2012) una cepa de *P.kudriavzevii* mostró mejor obtención de etanol (13.5 % v/v) que levaduras comerciales en cuanto a producción de etanol en vinos Cabernet Sauvignon; mientras otra cepa de *P.kudriavzevii* obtuvo un bajo rendimiento de etanol, el tipo de cepa puede influenciar en el rendimiento de la fermentación esto se puede deber al hecho que son levaduras nativas, el bajo rendimiento de *S.cerevisiae* se pudo

deber a la falta de nutrientes requeridos por la levadura en ese medio ya que esto puede llevar a la reducción de producción de etanol como lo afirma Gschaedler et al., (2021), quien mejoró la producción de etanol añadiendo minerales como: Zn, Mg y N al jugo de manzana.

Similares resultados de porcentaje de la relación volumen-volumen de etanol fueron encontrados en fermentación de mosto de uvas ( $^{\circ}$ Brix iniciales 14.8) para *Pichia kudriavzevii* como lo señala D.-H. Kim et al., (2008) quien obtuvo 5.8 % v/v de etanol al término de la fermentación (15 días), mientras que *Saccharomyces cerevisiae* demostró un máximo de 7.8 % v/v al décimo día de fermentación.

Además, *Issatchenkia orientalis* que es la misma levadura que *Pichia kudriavzevii* es una levadura que degrada el ácido málico (Seo et al., 2007), siendo este ácido uno de los principales en el jugo de manzana, dándose a entender la razón por la cual esta levadura tuvo una gran producción de etanol.

La morfología de *Pichia kluyveri* y *Pichia kudriavzevii* cambió al final de la fermentación (ANEXO 8 y 9) pudiéndose tratar de dimorfismo por parte de estas levaduras debido al medio al que fue sometido, lo mismo fue encontrado por Fiori et al., (2012) para la levadura *Pichia fermentans* quien tuvo una morfología elongada al encontrarse en manzana. Contrariamente con *S.cerevisiae* quien tuvo una morfología redonda (ANEXO 10)

Aparentemente un medio con alto contenido en alcohol como lo es el feniletanol induce a cambios en la morfología de la levadura como lo describe Pu et al., (2014) quien analizó los cambios en *Kloeckera apiculata* en naranja Navel (*C. sinensis*) y comprobó que a medida que aumenta la concentración de este alcohol la morfología de la levadura cambia a un crecimiento filamentoso y alargado con producción de *biofilm* pudiendo ser la razón del cambio morfológico de la levadura al término de la fermentación.



Según lo observado en la Tabla 11 se mostró que hay diferencias significativas en el estudio realizado ( $F$  calculado  $>$   $F$  crítico) por tal razón se efectuó la prueba de comparaciones múltiples Duncan (Tabla 12) para conocer si existen diferencias significativas entre cada una de las medias de la producción de etanol de las levaduras en medio jugo de manzana, donde se observó que no existen diferencias significativas entre la producción de etanol de *Pichia kluyveri* y *Pichia kudriavzevii* ya que las medias de cada levadura presenta valores cercanos: *P. kluyveri* 4,59 y *P.kudriavzevii* 4,30 además se encuentran localizadas en la misma columna. Por otra parte *S. cerevisiae* sí presentó diferencias significativas ya que su media presenta el valor de 3,30 y se encuentra una columna diferente de las otras levaduras estudiadas; a un nivel de significancia del 95%.

En cuanto a las características de la fermentación al segundo día de fermentación las levaduras *Pichia kluyveri* y *Pichia kudriavzevii* formaron una fina película blanca en la superficie en ambas fermentaciones (ANEXO 5).

**Tabla 11**

*Análisis de varianza (ANOVA) para fermentación en jugo de manzana*

Variaciones	S.C	G. L	M.C	F	Prob	F de tabla
Entre grupos	6,87	2	3	8,515	0,003	3.59
Dentro de los grupos	6,86	17	0,404			
Total	13,72	19				

**Tabla 12**

*Prueba de rango múltiple de Duncan para fermentación en jugo de manzana*

<b>Levadura</b>	<b>N</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<i>S. cerevisiae</i>	8	3,3025	
<i>P. kluyveri</i>	7		4,5984
<i>P.kudriavzevii</i>	5		4,3080
<i>Sig</i>		1	0,424

*Nota:* Prueba post hoc analizada con el software SPSS, Alfa 0.05

Lo mismo describió Kim et al., (2019) en el producto coreano fermentado llamado *kimchi*, donde se identificó que en la película blanquecina que se formaba en la superficie del producto era debido principalmente a la acción de *Pichia kluyveri* y *Hanseniaspora uvarum*; corroborando la formación de película está también fue encontrada por Vicente et al., (2021) en mosto de uva al inicio de la fermentación alcohólica, por otro lado *P. kudriavzevii* también fue descrita como formadora de *biofilms* (Chi et al., 2015; Moon et al., 2014) mientras que *Saccharomyces cerevisiae* no presentó ninguna formación de película.

### **5.2.2.2 Producción de etanol en medio mosto de malta**

La composición del mosto de malta es de 90% azúcares, los cuales son sacarosa, fructosa, glucosa, maltosa y maltodextrinas, siendo la maltosa y la maltotriosa las que se encuentran en mayor cantidad (He et al., 2014).

El tiempo de fermentación para las levaduras *No Saccharomyces* fue de casi 12 días y para *S.cerevisiae* de casi 11 días (ANEXO 12)

Hubo una ligera mayor producción de etanol dada por *S.cerevisiae* en mosto de malta siendo no significativa con *P.kudriavzevii* (Tabla 13) al 95% de confianza; no sería la primera vez donde se reporte una alta producción de etanol por una levadura *No Saccharomyces* ya que Santos et al., (2022) luego de fermentar mosto de malta obtuvo que *S. cerevisiae* produjo 4.98% v/v de etanol mientras que *P. kudriavzevii* 5.07% v/v.

**Tabla 13**

*Porcentaje de producción de etanol en mosto de malta*

<b>Levaduras</b>	<b>Porcentaje de etanol v/v</b>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.51 <sup>ac</sup> ± 0.59
<i>Pichia kudriavzevii</i>	0.90 <sup>ab</sup> ± 0.81
<i>Pichia kluyveri</i>	0.15 <sup>bd</sup> ± 0.04

Para conocer si existen diferencias significativas entre cada una de las medias de la producción de etanol de las levaduras en medio mosto de malta, se sometieron los datos a la prueba de Duncan donde se observó que existen diferencias significativas entre la producción de etanol de *P. kluyveri* y *S. cerevisiae* ya que las medias de cada levadura presentan valores lejanos: *P. kluyveri* 0,15 y *S. cerevisiae* 1,51. Además, no existen diferencias significativas entre *P. kudriavzevii* y *S. cerevisiae* puesto que esos valores se encuentran localizadas en la misma columna ya que las medias de cada levadura presentan valores cercanos: *P. kudriavzevii* 0,90 y *S. cerevisiae* 1,51. Por otra parte *P. kudriavzevii* y *P. kluyveri* no presentaron diferencias significativas y se encuentran en una misma columna; a un nivel de significativa del 95%.

**Tabla 14**

*Análisis de varianza (ANOVA) para fermentación en mosto de malta*

Variaciones	S.C	G.L	M.C	F	Prob	F de tabla
Entre grupos	3,782	2	1,891	5,049	0,028	4,1
Dentro de los grupos	4,02	10	0,402			
Total	8,23	12				

**Tabla 15**

*Prueba de rango múltiple de Duncan para fermentación en mosto de malta*

Levadura	N	1	2
<i>P.kluyveri</i>	3	0.15	
<i>P.kudriavzevii</i>	4	0.91	0.91
<i>S.cerevisiae</i>	6		1.51
Sig		0.10	0.19

*Nota:* Prueba post hoc analizada con el software SPSS, Alfa 0.05.

En la fermentación de mosto de malta quien tuvo menor producción de etanol fue *Pichia kluyveri* la reducción de grados °Brix por parte de esta levadura también es menor comparada con *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 13), además también concuerda con el perfil de fermentación de levaduras que se realizó en la segunda etapa de esta tesis donde *P. kluyveri* dio poca fermentación para maltosa.

*P.kluyveri* es descrita por Saerens & Swiegers (2014) como una excelente opción para la creación de cervezas de bajo contenido en alcohol “*low alcohol beer*” y que además produce altas concentraciones de compuestos volátiles deseables,

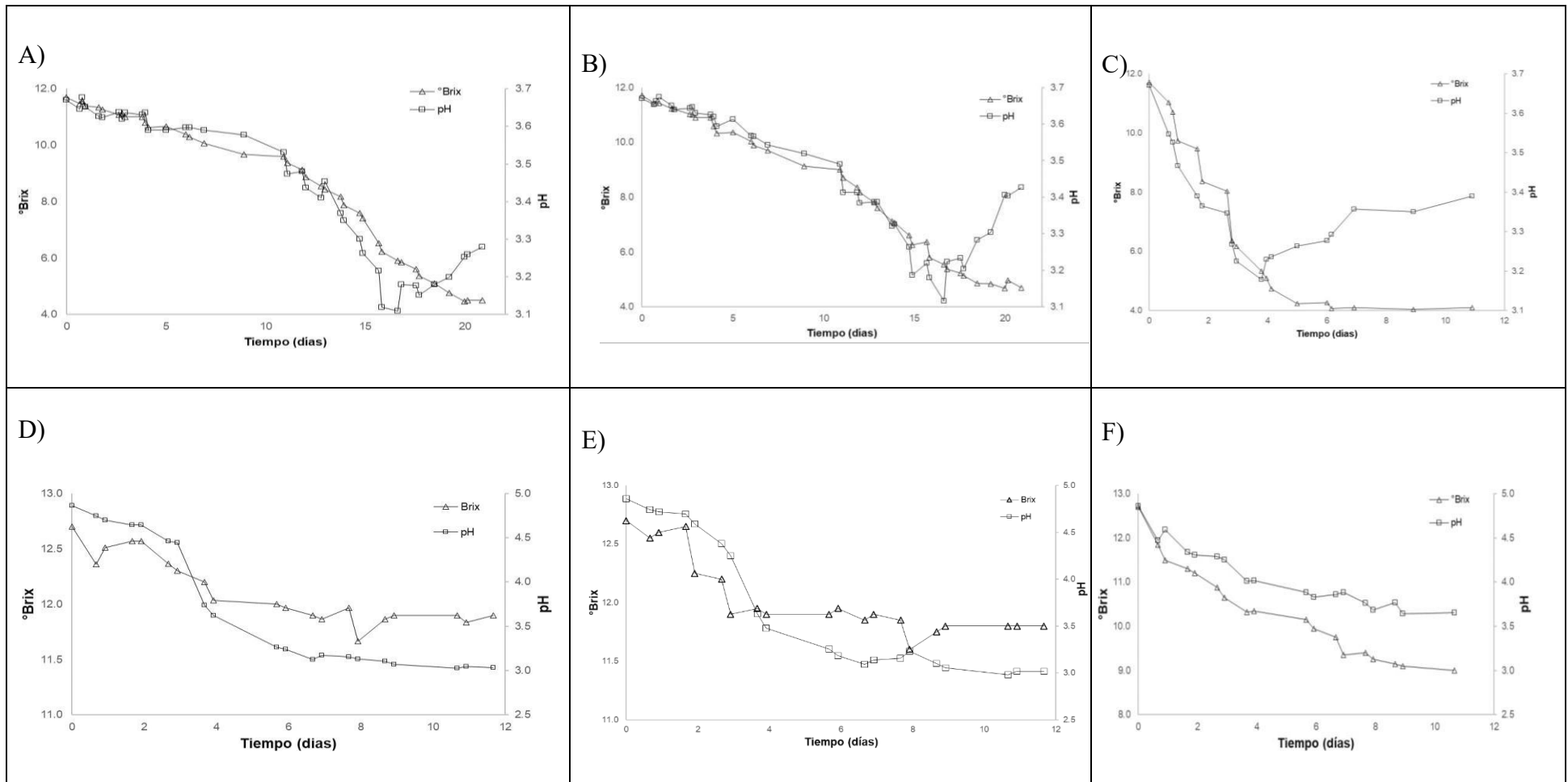
Generalmente las levaduras *No Saccharomyces* son usadas en la creación de productos bajos de etanol (Quirós et al., 2014)

Se evidenció la presencia de *biofilm* en la parte superior del mosto de malta por parte de las levaduras *No Saccharomyces* (ANEXO 6)

Al evaluar estas levaduras en medios distintos (jugo de manzana y mosto de malta) y corroborando su crecimiento y producción de etanol, podrían ser aprovechadas tanto para la producción de sidra como para la producción de cerveza con características sensoriales especiales y sobresalir en el mercado, además para otros productos fermentados como el mosto de uva , ya que tanto el mosto de uva como el de manzana presentan en su composición azúcares similares ambos contienen ácido málico (Rizzon & Sganzerla, 2007).

Figura 13

Cinética de Brix y pH en jugo de manzana y mosto de malta



Nota: Jugo de manzana, (A) *Pichia kluyveri*, (B) *Pichia kudriavzevii*, (C) *Saccharomyces cerevisiae*; mosto de malta, (D) *Pichia kluyveri*, (E) *Pichia kudriavzevii*, (F) *Saccharomyces cerevisiae*

### **5.3 Evaluación del comportamiento fermentativo de las levaduras aisladas de las heces de coatí en dos tipos de fermentación sobre café despulpado de la variedad Colombia.**

En esta investigación se trabajó con café despulpado, el cual estuvo almacenado en congelación desde agosto del 2021 (debido a que esa era la fecha de cosecha del fruto), antes de iniciar cada fermentación se procedió a descongelar el café luego se añadieron las levaduras antes estudiadas sobre el café despulpado de la variedad Colombia con el fin de evaluar sus respectivas capacidades fermentativas y la producción de etanol y el ácido acético.

El tiempo de fermentación para el café fue un estándar de 3 días (72h) debido a ser este el tiempo sugerido para acabar una fermentación además el pH y grados °Brix fueron evaluados durante el proceso para corroborar el término de la fermentación.

#### ***5.3.1 Comportamiento fermentativo de las levaduras en fermentación semi seca***

Durante la fermentación semi seca de café se evaluó la influencia de la temperatura y de la concentración de levaduras en la producción de etanol y el ácido acético, las temperaturas seleccionadas en este estudio fueron temperatura ambiente (25°C), 27°C y 30°C debido a que es conocido que las levaduras que se encuentran en el fruto del café son mesófilas (Puerta,2012).

Los cambios de pH y °Brix son importantes para evaluar el proceso de fermentación, en este estudio los valores de pH iniciales fueron en promedio de  $4,07 \pm 0,35$  siendo estos menores comparados con los finales (72 horas) los cuales fueron  $4,37 \pm 0,22$  , este comportamiento ha sido

también descrito en otros estudios relacionados con el café como en el caso de *Saccharomyces cerevisiae* el cual tuvo una reducción de pH a las 24 h después de la inoculación y a las 36 h mostró una ascendencia, para el caso de *Pichia guilliermondii* la reducción de pH fue dada a las 12 h después de la inoculación para luego comenzar a ascender hasta superar el pH inicial a las 36 h (Silva et al., 2013)

Todas las levaduras presentaron generación de alcohol y de ácido acético, ambas producto de la fermentación de café ocurrida a nivel de laboratorio.

A continuación, se presenta la tabla con valores obtenidos para cada una de las muestras evaluadas:

**Tabla 16**

*Resultados de la fermentación semi seca con las levaduras estudiadas*

L	STD	Run	A: Concentración del inóculo (cel/g)	B: Temperatura °C	Producción de etanol (g/Kg de café)	Producción de ácido acético (g/Kg de café)
P · k u d r i a v z e v i i	7	1	1 x 10 <sup>8</sup>	30°C	4.322	0.094
	8	4	1 x 10 <sup>8</sup>	30°C	4.356	0.098
	5	10	1 x 10 <sup>5</sup>	30°C	3.138	0.082
	6	11	1 x 10 <sup>5</sup>	30°C	3.204	0.089
	10	12	5.005 x 10 <sup>7</sup>	27°C	6.049	0.107
	12	7	5.005 x 10 <sup>7</sup>	27°C	6.019	0.103
	11	8	5.005 x 10 <sup>7</sup>	27°C	5.923	0.100
	9	9	5.005 x 10 <sup>7</sup>	27 °C	6.019	0.108
	1	2	1 x 10 <sup>5</sup>	T° ambiente(25°C)	6.588	0.115
	2	5	1 x 10 <sup>5</sup>	T° ambiente(25°C)	6.709	0.116
	3	6	1 x 10 <sup>8</sup>	T° ambiente(25°C)	7.433	0.126
	4	3	1 x 10 <sup>8</sup>	T° ambiente(25°C)	7.56	0.128
P · k l u y v	7	1	1 x 10 <sup>8</sup>	30°C	4.878	0.079
	8	4	1 x 10 <sup>8</sup>	30°C	4.835	0.089
	5	10	1 x 10 <sup>5</sup>	30°C	3.854	0.072
	6	11	1 x 10 <sup>5</sup>	30°C	3.862	0.075
	10	12	5.005 x 10 <sup>7</sup>	27°C	5.026	0.089
	12	7	5.005 x 10 <sup>7</sup>	27°C	5.012	0.095
	11	8	5.005 x 10 <sup>7</sup>	27°C	5.018	0.096
	9	9	5.005 x 10 <sup>7</sup>	27 °C	5.037	0.093
	1	2	1 x 10 <sup>5</sup>	T° ambiente(25°C)	5.796	0.114



e r i	2	5	$1 \times 10^5$	T° ambiente(25°C)	5.802	0.11
	3	6	$1 \times 10^8$	T° ambiente(25°C)	6.019	0.141
	4	3	$1 \times 10^8$	T° ambiente(25°C)	5.984	0.137
S . c e r e v i s i a e	7	1	$1 \times 10^8$	30°C	4.897	0.089
	8	4	$1 \times 10^8$	30°C	4.917	0.082
	5	10	$1 \times 10^5$	30°C	4.621	0.071
	6	11	$1 \times 10^5$	30°C	4.675	0.075
	10	12	$5.005 \times 10^7$	27°C	5.504	0.097
	12	7	$5.005 \times 10^7$	27°C	5.496	0.1
	11	8	$5.005 \times 10^7$	27°C	5.494	0.098
	9	9	$5.005 \times 10^7$	27 °C	5.497	0.104
	1	2	$1 \times 10^5$	T° ambiente(25°C)	5.739	0.115
	2	5	$1 \times 10^5$	T° ambiente(25°C)	5.879	0.122
3	6	$1 \times 10^8$	T° ambiente(25°C)	6.906	0.185	
4	3	$1 \times 10^8$	T° ambiente(25°C)	6.892	0.165	

En la fermentación semi seca para todas las levaduras estudiadas se concluyó que a menor temperatura (25°C) y a mayor concentración de levaduras se obtuvieron valores mayores tanto para ácido acético como para etanol. La levadura *P. kudriavzevii* obtuvo la mayor producción de etanol para la fermentación semi seca de café (Tabla 16) donde a menor temperatura (25°C) presentó mayor producción de etanol (7.56 ml de etanol/ Kgde café) (Figura 15) comparada con la temperatura de (30°C) donde obtuvo (3.138 ml de etanol/ Kgde café) y para la producción de ácido acético se obtuvo que a menor temperatura mayor cantidad de ácido acético siendo esta una cantidad menor comparada con la cantidad obtenida de etanol (Tabla 17) (0.126 g de ácido acético/Kg de café) como lo menciona también Elhais et al, (2020) quien evaluó la producción de etanol y ácido acético de *P.kudriavzevii* a 25°C por 36h de fermentación obteniendo para ácido acético una cantidad no significativa comparada con las demás levaduras estudiadas la cual fue de 458.3 µg/L pero tuvo uno de los más resaltantes resultados para la producción de etanol la cual fue 37347.5 µg/L y para alcoholes totales fue 57628.1 µg/L.

Las levaduras del género *Pichia* volvieron a presentar películas sobre los granos de café (ANEXO 13 y ANEXO 14) corroborando así los estudios realizados en las etapas anteriores,

contrariamente el género *Saccharomyces* no presentó generación de película en ninguna etapa del proceso fermentativo (ANEXO 15).

**Tabla 17**

*Análisis de varianza (ANOVA) de producción de etanol para P.kudriavzevii en fermentación semi seca*

Variaciones	S.C	G.L	M.C	F	Valor P	
<b>Modelo</b>	25.03	4	6.26	1567.58	<0.0001	significante
A-Concentración	2.03	1	2.03	509.02	<0.0001	
B-Temperatura	22.01	1	22.01	5513.59	<0.0001	
AB	0.0512	1	0.0512	12.82	0,0090	
A <sup>2</sup>	0.9377	1	0.9377	234.89	<0.0001	
<b>Error</b>	0.0279	7	0,0040			
<b>Total</b>	25.06	11				

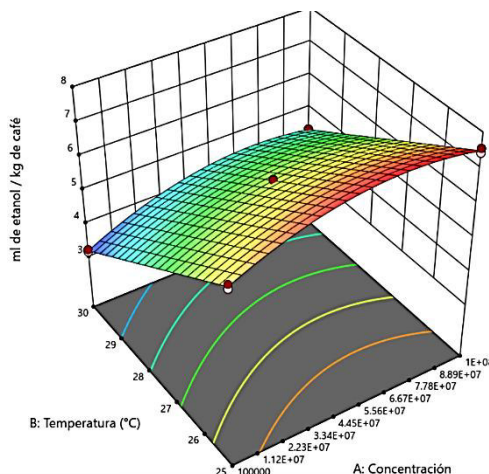
**Tabla 18**

*Análisis de varianza (ANOVA) de producción de ácido acético para P.kudriavzevii en fermentación semi seca*

Variaciones	SC	G.L	M.C	F	Valor P	
<b>Modelo</b>	0.0021	4	0.0005	83.44	< 0.0001	significante
A-Concentración	0.0002	1	0.0002	37.64	0.0005	
B-Temperatura	0.0019	1	0.0019	289.41	< 0.0001	
AB	5.000E-07	1	5.000E-07	0.0778	0.7884	
A <sup>2</sup>	0.0000	1	0.0000	6.64	0.0367	
<b>Error</b>	0.0000	7	6.429E-06			
<b>Total</b>	0.0022	11				

**Figura 14**

*Porcentaje de etanol (ml de etanol /Kg de café) obtenido por P.kudriavzevii en fermentación semi seca*



La producción de etanol en un medio complejo como el café es positivo ya que genera sabores dulces en el producto final (Gonzalez-Rios et al., 2007) caracterizados por alcohólicos y afrutados, además impacta en la viscosidad de la bebida. Puerta Quintero (2012) reportó que al fermentar café sin adición de levaduras obtuvo a las 120 h un máximo de 0.5% de etanol.

Por lo contrario, la producción de ácido acético en el café es negativo y afecta a la calidad sensorial del producto final al encontrarse en valores mayor a  $1 \text{ mg L}^{-1}$  ya que le brinda al café sabores similares al de la cebolla (Silva et al., 2013)

Para las levaduras *Pichia kluyveri* (ANEXO 16 y ANEXO 17) y *Saccharomyces cerevisiae* (ANEXO 18 y ANEXO 19) las diferencias entre los factores concentración y temperatura no fueron significativos en la cantidad de etanol y ácido acético producido

### **5.3.2 Comportamiento fermentativo de las levaduras en fermentación húmeda**

La mejor temperatura de fermentación de la etapa anterior fue temperatura ambiente (25°C), por lo cual la fermentación húmeda se realizó a esa temperatura constante para todas las repeticiones.

La cantidad de etanol producida por *P.kluyveri* fue significativa (Tabla 20) para las variables de concentración y porcentaje de agua añadida, donde a mayor porcentaje de agua menor cantidad de etanol en la solución y menor porcentaje de agua se obtuvo mayor concentración de ácido acético como es el caso de *P.kluyveri* la cual obtuvo 0.163 g de ácido acético/ Kg de café (Tabla 21) con una concentración de  $10^8$  y con 10% de agua añadida (Figura 16) en el proceso de fermentación; observándose el cambio al encontrarse a una concentración de  $10^5$  y con 30% de agua añadida donde obtuvo 0.040 g de ácido acético/ Kg de café; por su parte *P.kudriavzevii* también tuvo diferencia significativa en las variables estudiadas, como para la producción de etanol (Tabla 18) donde la cantidad máxima de etanol fue 8.055 ml de etanol/ Kg de café (Figura 15) por su parte Elhalis, et al., (2020) halló 37347.5 $\mu$ g/Kg de café. En la fermentación húmeda con *P.kudriavzevii* se obtuvo como máximo valor de ácido acético 0.281 g de ácido acético/ Kg de café a una concentración de  $10^8$  y con 10% de agua añadida (Tabla 19), según lo estudiado por Elhalis, et al., (2020). *P.kudriavzevii* en un medio sintético de café alcanzó al tercer día de fermentación 458.3  $\mu$ g de ácido acético /Kg de café. Para la levadura *S.cerevisiae* a mayor cantidad de agua en el medio menor cantidad de etanol (Figura 17), siendo significativo (Tabla 18) teniendo un valor mínimo de 3.734 ml de etanol/ Kg de café con 30% de agua y  $10^5$  de inóculo y en cuanto a la producción de ácido acético también fue significativo (Tabla 19) teniendo que a mayor cantidad de agua menor concentración de ácido acético.

La fermentación húmeda es considerada como la mejor forma de procesar el café (Schwan & Fleet, 2015), la fermentación húmeda destaca por los aromas pronunciados y las más altas calificaciones en taza (Puerta, 1999)

En las fermentaciones húmedas controladas de café también se presenció *biofilm* para las levaduras del género *Pichia*.

A continuación, se presenta la tabla con valores obtenidos para cada una de las muestras evaluadas:

**Tabla 19**

*Resultados de la fermentación húmeda con las levaduras estudiadas*

L	STD	Run	A: Concentración del inóculo (cel/g)	B: % de agua	Producción de etanol (g/Kg de café)	Producción de ácido acético (g/Kg de café)
P · k u d r i a v z e v i i	7	1	$1 \times 10^8$	10	7.813	0.281
	8	4	$1 \times 10^8$	10	8.055	0.251
	5	10	$1 \times 10^5$	30	3.580	0.031
	6	11	$1 \times 10^5$	30	3.627	0.033
	10	12	$5.005 \times 10^7$	20	4.938	0.041
	12	7	$5.005 \times 10^7$	20	5.033	0.055
	11	8	$5.005 \times 10^7$	20	4.926	0.040
	9	9	$5.005 \times 10^7$	20	5.125	0.046
	1	2	$1 \times 10^5$	10	5.674	0.063
	2	5	$1 \times 10^5$	10	5.627	0.078
P · k l u y v e	3	6	$1 \times 10^8$	30	4.818	0.093
	4	3	$1 \times 10^8$	30	5.241	0.106
	7	1	$1 \times 10^8$	10	6.965	0.116
	8	4	$1 \times 10^8$	10	6.860	0.163
	5	10	$1 \times 10^5$	30	4.254	0.040
	6	11	$1 \times 10^5$	30	3.970	0.052
	10	12	$5.005 \times 10^7$	20	5.787	0.049
	12	7	$5.005 \times 10^7$	20	6.076	0.051
	11	8	$5.005 \times 10^7$	20	6.087	0.055
	9	9	$5.005 \times 10^7$	20	5.886	0.027
v e	1	2	$1 \times 10^5$	10	5.745	0.056
	2	5	$1 \times 10^5$	10	5.886	0.053

<b>r</b>	3	6	$1 \times 10^8$	30	5.727	0.045
	4	3	$1 \times 10^8$	30	5.546	0.060
<b>S</b> <b>.</b> <b>c</b> <b>e</b> <b>r</b> <b>e</b> <b>v</b> <b>i</b> <b>s</b> <b>i</b> <b>a</b> <b>e</b>	7	1	$1 \times 10^8$	10	4.329	0.192
	8	4	$1 \times 10^8$	10	4.016	0.173
	5	10	$1 \times 10^5$	30	3.734	0.069
	6	11	$1 \times 10^5$	30	3.983	0.071
	10	12	$5.005 \times 10^7$	20	6.988	0.107
	12	7	$5.005 \times 10^7$	20	7.040	0.099
	11	8	$5.005 \times 10^7$	20	7.024	0.101
	9	9	$5.005 \times 10^7$	20	6.973	0.102
	1	2	$1 \times 10^5$	10	6.376	0.120
	2	5	$1 \times 10^5$	10	6.114	0.110
	3	6	$1 \times 10^8$	30	7.266	0.082
4	3	$1 \times 10^8$	30	7.181	0.080	

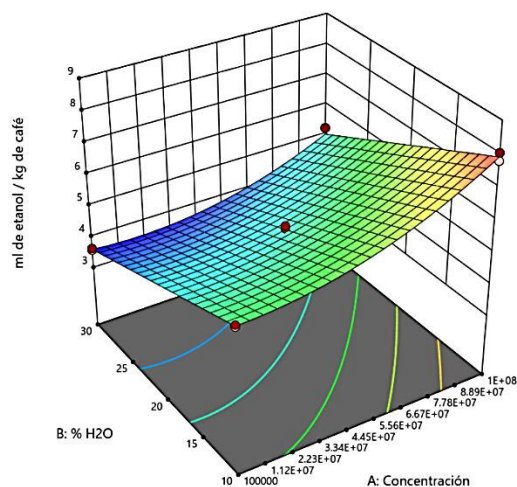
**Tabla 20**

*Análisis de varianza (ANOVA) de producción de etanol de P. kudriavzevii en fermentación húmeda*

Variaciones	S.C	G.L	M.C	F	Valor P	
<b>Modelo</b>	20.31	4	5.08	242.00	< 0.0001	significante
A-Concentración	6.88	1	6.88	327.92	< 0.0001	
B-% H2O	12.26	1	12.26	584.27	< 0.0001	
AB	0.3677	1	0.3677	17.52	0.0041	
A <sup>2</sup>	0.8034	1	0.8034	38.29	0.0005	
<b>Error</b>	0.1469	7	0.0210			
<b>Total</b>	20.46	11				

**Figura 15**

*Superficie 3D para producción de etanol (ml de etanol/kg de café) de P.kudriavzevii en fermentación húmeda*

**Tabla 21**

*Análisis de varianza (ANOVA) de producción de ácido acético de P.kudriavzevii en fermentación húmeda*

Variaciones	S.C	G.L	M.C	F	Valor p	
<b>Modelo</b>	0.0775	4	0.0194	175.44	< 0.0001	significante
A-Concentración	0.0345	1	0.0345	312.70	< 0.0001	
B-% H2O	0.0210	1	0.0210	190.49	< 0.0001	
AB	0.0082	1	0.0082	74.53	< 0.0001	
A <sup>2</sup>	0.0137	1	0.0137	124.03	< 0.0001	
<b>Error</b>	0.0008	7	0.0001			
<b>Total</b>	0.0783	11				

**Tabla 22**

*Análisis de varianza (ANOVA) de producción de etanol de P. kluyveri en fermentación húmeda*

<b>Variaciones</b>	<b>S.C</b>	<b>G.L</b>	<b>M.C</b>	<b>F</b>	<b>Valor p</b>	
<b>Modelo</b>	8.27	4	2.07	105.58	< 0.0001	significante
A-Concentración	3.44	1	3.44	175.38	< 0.0001	
B-% H2O	4.44	1	4.44	226.55	< 0.0001	
AB	0.0914	1	0.0914	4.66	0.0676	
A <sup>2</sup>	0.3080	1	0.3080	15.72	0.0054	
<b>Error</b>	0.1371	7	0.0196			
<b>Total</b>	8.41	11				

**Tabla 23**

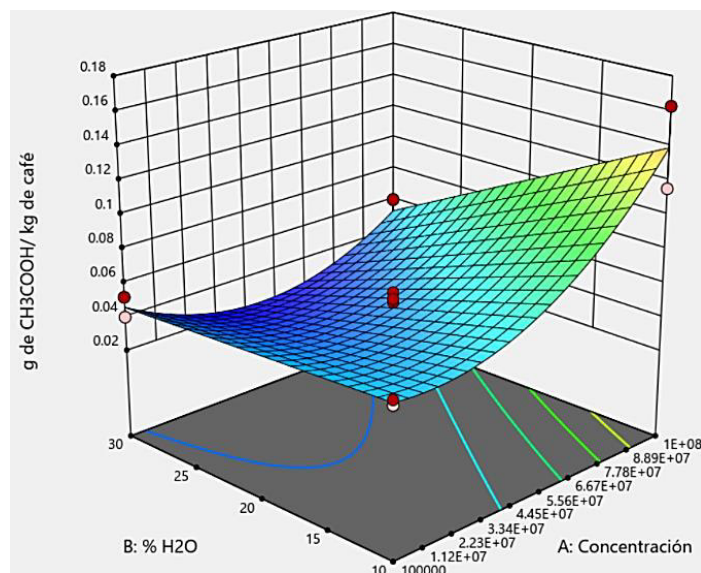
*Análisis de varianza (ANOVA) de producción de ácido acético de P.kluyveri en fermentación húmeda*

<b>Variaciones</b>	<b>S.C</b>	<b>G.L</b>	<b>M.C</b>	<b>F</b>	<b>Valor p</b>	
<b>Modelo</b>	0.0139	4	0.0035	13.72	0.0020	significante
A-Concentración	0.0042	1	0.0042	16.57	0.0047	
B-% H2O	0.0046	1	0.0046	18.05	0.0038	
AB	0.0031	1	0.0031	12.20	0.0101	
A <sup>2</sup>	0.0020	1	0.0020	8.06	0.0251	
<b>Error</b>	0.0018	7	0.0003			
<b>Total</b>	0.0156	11				



**Figura 16**

*Superficie 3D para producción de ácido acético (g de ácido acético /Kg de café) de P.kluyveri en fermentación húmeda*

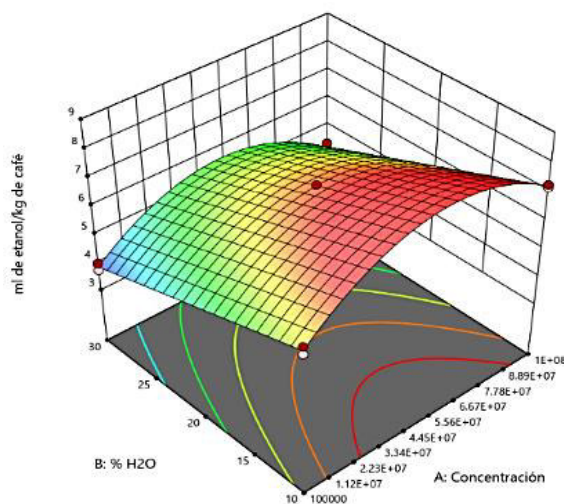
**Tabla 24**

*Análisis de varianza (ANOVA) de producción de etanol de S.cerevisiae en fermentación húmeda*

Variaciones	S.C	G.L	M.C	F	Valor p	
<b>Modelo</b>	22.94	4	5.73	332.24	< 0.0001	significante
A-Concentración	0.8353	1	0.8353	48.40	0.0002	
B-% H2O	14.78	1	14.78	856.56	< 0.0001	
AB	0.2208	1	0.2208	12.79	0.0090	
A <sup>2</sup>	7.10	1	7.10	411.21	< 0.0001	
<b>Error</b>	0.1208	7	0.0173			
<b>Total</b>	23.06	11				

**Figura 17**

*Superficie 3D para producción de etanol (ml de etanol /Kg de café) de S.cerevisiae en fermentación húmeda*

**Tabla 25**

*Análisis de varianza (ANOVA) de producción de ácido acético de S.cerevisiae en fermentación húmeda*

Variaciones	S.C	G.L	M.C	F	Prob	F de tabla
Modelo	0.021	4	0.0052	9.18	0.0159	significante
A-Concentración	0.004	1	0.004	6.99	0.0458	
B-%H <sub>2</sub> O	0.0027	1	0.0027	4.77	0.0806	
AB	0.0001	1	0.0001	0.0924	0.7734	
A <sup>2</sup>	0.0122	1	0.0122	21.43	0.0057	
Error	0.0029	5	0.0006			
Total	0.0238	9				

## CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

- La morfología microscópica fue diferente en las levaduras estudiadas, *P.kluyveri* y *P. kudriavzevii* presentaron forma ovoide, alargada y apiculada mientras que *S.cerevisiae* presentó forma circular y globosa.
- La reproducción asexual para el género *Pichia* fue gemación polar mientras que para *Saccharomyces* fue gemación multipolar.
- La morfología macroscópica de las colonias para el género *Pichia* fue de color blanquecino, opaco con márgenes rizoides, mientras que *Saccharomyces* fue blanquecino, brillante y margen circular.
- *P.kudriavzevii* y *S.cerevisiae* fermentaron en medio sintético glucosa, fructosa, sacarosa, galactosa y maltosa; mientras que *P.kluyveri* no fermentó eficientemente maltosa.
- Las levaduras presentaron actividad pectinolítica, siendo *P.kudriavzevii* la que tuvo mayor halo de inhibición ( $0,91 \pm 0,34$ ) y *S.cerevisiae* el menor halo ( $0,22 \pm 0,06$ ).
- Todas las levaduras estudiadas presentaron capacidad fermentativa en jugo de manzana y mosto de malta; siendo las levaduras resaltantes en producción de etanol *P.kluyveri* en jugo de manzana ( $4,59\% \text{ v/v} \pm 0,71$ ) y *S.cerevisiae* en mosto de malta ( $1,51\% \text{ v/v} \pm 0,59$ ).
- Al fermentar café despulpado de la variedad Colombia, las levaduras analizadas presentaron generación de etanol y ácido acético. En fermentación semi seca *P.kudriavzevii* a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ) tuvo mayor producción de etanol (7.56 ml de etanol/ Kg de café).

- En fermentación húmeda de café a menor contenido de agua, mayor concentración de ácido acético y etanol, la que tuvo la menor cantidad de ácido acético fue *P.kudriavzevii* la cual obtuvo 0.031 g de ácido acético/ Kg de café con una concentración de  $10^5$  y con 30% de agua.
- En fermentación húmeda de café la mayor concentración de etanol tuvo *P.kudriavzevii* con 10% de agua y  $10^8$  la cual obtuvo 15.3 ml de etanol/kg de café.

## CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES

- Evaluar la producción de etanol y ácido acético con equipos más sensibles para obtener mayor precisión en los resultados.
- Evaluar la producción de enzimas PL, PGL, PME por parte de las levaduras estudiadas.
- Despulpas el café en el menor tiempo posible para evitar fermentaciones espontáneas
- Evaluar la fermentación sobre café con intervalos mayores para el porcentaje de agua y temperatura.

## CAPÍTULO VIII: REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Agate, & Bath. (1966, marzo). Role of Pectinolytic Yeasts in the Degradation of Mucilage Layer of *Coffea robusta* Cherries. *Applied Microbiology*, 14(2), 5. <https://doi.org/10.1128/am.14.2.256-260.1966>

Alvarado Alvarado, G., & Puerta Quintero, G. I. (2002). *La variedad colombia y sus características de calidad física y en taza*. 3.

Amaya-Delgado, L., Herrera-López, E. J., Arrizon, J., Arellano-Plaza, M., & Gschaedler, A. (2013). Performance evaluation of *Pichia kluyveri*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in industrial tequila fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(5), 875-881. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1242-8>

Asociación Nacional del Café. (2019). *Guía de variedades Anacafé*. 2da edición, 48.

Avallone, S., Guiraud, J.-P., Guyot, B., Olguin, E., & Brillouet, J.-M. (2000). Polysaccharide Constituents of Coffee-Bean Mucilage. *Journal of Food Science*, 65(8), 1308-1311. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10602.x>

Bejarano, N., Gomez, S., Ancasi, G., & Benitez, M. (2007). *Manual de microbiología de los Alimentos*. <http://www.unsa.edu.ar/biblio/repositorio/malim2007/>

Bensch, K. (2021). *Mycobank* [Org]. Mycobank Database. <https://www.mycobank.org/page/Name%20details%20page/107918>

*Café Misha* | *HIGHLAND PRODUCTS*. (s. f.). Recuperado 25 de noviembre de 2021, de <https://www.highlandproducts.com.pe/cafe-misha.php>

Castro, P., Contreras, Y., Laca, D., & Nakamatsu, K. (2004). Café de especialidad: Alternativa para el sector cafetalero peruano. *The bi-annual academic publication of Universidad ESAN*, 9(17), 2004.

Chamyuang, S.; Owatworakit, A.; Intatha, U.; & Duangphet, S. (2021). Coffee pectin production: An alternative way for agricultural waste management in coffee farms. *Science Asia*, 47, 90-95. <https://doi.org/10.2306/SCIENCEASIA1513-1874.2021.S003>

Chi, M., Li, G., Liu, Y., Liu, G., Li, M., Zhang, X., Sun, Z., Sui, Y., & Liu, J. (2015). Increase in antioxidant enzyme activity, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Pichia kudriavzevii* with the transition from a yeast-like to biofilm morphology. *Biological Control*, 90, 113-119. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.06.006>

da Silva, Borges, Medina, Piccoli, & Schwan. (2005, marzo 30). Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. *FEMS Yeast Research*, 5, 859-865.

De Maria, C. A. B., Trugo, L. C., Neto, F. R. A., Moreira, R. F. A., & Alviano, C. S. (1996). Composition of green coffee water-soluble fractions and identification of volatiles formed during roasting. *Food Chemistry*, 55(3), 203-207. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00104-2](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)00104-2)

de Melo Pereira, G. V., Soccol, V. T., Pandey, A., Medeiros, A. B. P., Andrade Lara, J. M. R., Gollo, A. L., & Soccol, C. R. (2014). Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. *International Journal of Food Microbiology*, 188, 60-66. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.008>

Douglass, A. P., Offei, B., Braun-Galleani, S., Coughlan, A. Y., Martos, A. A. R., Ortiz-Merino, R. A., Byrne, K. P., & Wolfe, K. H. (2018). Population genomics shows no distinction between pathogenic *Candida krusei* and environmental *Pichia kudriavzevii*: One species, four names. *PLOS Pathogens*, 14(7), e1007138. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007138>

Drumonde-Neves, J., Fernandes, T., Lima, T., Pais, C., & Franco-Duarte, R. (2021). Learning from 80 years of studies: A comprehensive catalogue of non- *Saccharomyces* yeasts associated with viticulture and winemaking. *FEMS Yeast Research*, 21(3), foab017. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foab017>

Elhalis, H., Cox, J., Frank, D., & Zhao, J. (2020). The crucial role of yeasts in the wet fermentation of coffee beans and quality. *International Journal of Food Microbiology*, 333, 108796. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108796>

Elhalis, H., Cox, J., Frank, D., & Zhao, J. (2020). *Microbiological and biochemical performances of six yeast species as potential starter cultures for wet fermentation of coffee beans. LWT*, (), 110430–. doi:10.1016/j.lwt.2020.110430

Estela Escalante, W. D. (2018). Perspectives and Uses of Non-Saccharomyces Yeasts in Fermented Beverages. En *Frontiers and New Trends in the Science of Fermented Food and Beverages*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81868>

Evangelista, S. R., Miguel, M. G. da C. P., Silva, C. F., Pinheiro, A. C. M., & Schwan, R. F. (2015). Microbiological diversity associated with the spontaneous wet method of coffee fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 210, 102-112. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.008>

Fiori, S., Scherm, B., Liu, J., Farrell, R., Mannazzu, I., Budroni, M., Maserti, B. E., Wisniewski, M. E., & Migheli, Q. (2012). Identification of differentially expressed genes associated with changes in the morphology of *Pichia fermentans* on apple and peach fruit. *FEMS Yeast Research*, 12(7), 785-795. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2012.00829.x>

Fleet, G. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 11-22. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00245-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00245-9)



FROOTZEN®. (s. f.). *FROOTZEN®: La primerísima levadura de Pichia kluyveri*. CHR HANZEN improving food and health. Recuperado 13 de febrero de 2022, de <https://www.chr-hansen.com/es/food-cultures-and-enzymes/fermented-beverages/cards/product-cards/frootzen-first-ever-pichia-kluyveri-yeast>

Gàmez, O. R., & Díaz, M. S. (2008). *POLIGALACTURONASAS DE LEVADURAS: UN PRODUCTO BIOTECNOLÓGICO DE GRANDES POTENCIALIDADES*. 1, 12.

Gonzalez-Rios, O., Suarez-Quiroz, M. L., Boulanger, R., Barel, M., Guyot, B., Guiraud, J.-P., & Schorr-Galindo, S. (2007). Impact of “ecological” post-harvest processing on the volatile fraction of coffee beans: I. Green coffee. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3-4), 289-296. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.07.009>

Graham, F. (2008). *Wine yeast for the future*. [https://watermark.silverchair.com/](https://watermark.silverchair.com/Gschaedler, A., Iñiguez-Muñoz, L. E., Flores-Flores, N. Y., Kirchmayr, M., & Arellano-Plaza, M. (2021). Use of non-Saccharomyces yeasts in cider fermentation: Importance of the nutrients addition to obtain an efficient fermentation. International Journal of Food Microbiology, 347, 109169. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109169)  
Gschaedler, A., Iñiguez-Muñoz, L. E., Flores-Flores, N. Y., Kirchmayr, M., & Arellano-Plaza, M. (2021). Use of non-Saccharomyces yeasts in cider fermentation: Importance of the nutrients addition to obtain an efficient fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 347, 109169. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109169>

Gutiérrez, L. A. U. (2007). *CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LEVADURAS AISLADAS DE LA FILÓSFERA DE MORA*. 154.

Haile, M., & Kang, W. H. (2019a). The Role of Microbes in Coffee Fermentation and Their Impact on Coffee Quality. *Journal of Food Quality*, 2019, e4836709. <https://doi.org/10.1155/2019/4836709>

Haile, M., & Kang, W. H. (2019b). Isolation, Identification, and Characterization of Pectinolytic Yeasts for Starter Culture in Coffee Fermentation. *Microorganisms*, 7(10), 401. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100401>

Hameed, A., Hussain, S. A., Ijaz, M. U., Ullah, S., Pasha, I., & Suleria, H. A. R. (2018). Farm to Consumer: Factors Affecting the Organoleptic Characteristics of Coffee. II: Postharvest Processing Factors. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(5), 1184-1237. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12365>

He, Y., Dong, J., Yin, H., Zhao, Y., Chen, R., Wan, X., Chen, P., Hou, X., Liu, J., & Chen, L. (2014). Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and esterformation of beer – a review. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(3), 157-163. <https://doi.org/10.1002/jib.145>

Huch, M., & Franz, C. M. A. P. (2015). Coffee. En *Advances in Fermented Foods and Beverages* (pp. 501-513). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-015-6.00021-9>

Inia, I. N. de I. A.-. (2012). Circuito tecnológico del café. *Instituto Nacional de Innovación Agraria*. <http://repositorio.inia.gob.pe/handle/20.500.12955/753>

International Coffee Organization. (2021, noviembre 12). *International Coffee Organization—Aspectos botánicos*. [https://www.ico.org/es/botanical\\_c.asp](https://www.ico.org/es/botanical_c.asp)

Jacob, N., Ashapoorna, C., & Prema, P. (2008). Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*. *Bioresource Technology*, 99(14), 6697-6701. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.002>

Jacobs, J. L., & Sundin, G. W. (2001). Effect of Solar UV-B Radiation on a Phyllosphere Bacterial Community. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12), 5488-5496. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5488-5496.2001>

Jayani, R. S., Saxena, S., & Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, 40(9), 2931-2944. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.026>

Jolly, N. P., Varela, C., & Pretorius, I. S. (2014). Not your ordinary yeast: Non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research*, *14*(2), 215-237. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12111>

Julca-Otiniano, A., Alarcón-Águila, G., Alvarado-Huamán, L., Borjas-Ventura, R., Castro-Cepero, V., Julca-Otiniano, A., Alarcón-Águila, G., Alvarado-Huamán, L., Borjas-Ventura, R., & Castro-Cepero, V. (2018). COMPORTAMIENTO DE TRES CULTIVARES DE CAFÉ (CATIMOR, COLOMBIA Y COSTA RICA 95) EN EL VALLE DE EL PERENÉ, JUNÍN, PERÚ. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, *34*(3), 205-215. <https://doi.org/10.4067/S0719-38902018005000504>

Kim, D.-H., Hong, Y.-A., & Park, H.-D. (2008). Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic acid content in wine. *Biotechnology Letters*, *30*(9), 1633-1638. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9726-1>

Kim, J. Y., Kim, J., Cha, I.-T., Jung, M. Y., Song, H. S., Kim, Y. B., Lee, C., Kang, S.-Y., Bae, J.-W., Choi, Y.-E., Kim, T.-W., & Roh, S. W. (2019). Community structures and genomic features of undesirable white colony-forming yeasts on fermented vegetables. *Journal of Microbiology*, *57*(1), 30-37. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-8487-y>

Kurtzman, K., Fell, J., & Boekhout, T. (2011). *Definition, Classification and Nomenclature of The Yeasts, A Taxonomic Study* | Elsevier Enhanced Reader. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00001-X>

Kurtzman, C. P. (2011a). *Pichia* E.C. En *The Yeasts* (pp. 685-707). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00057-4>

Kurtzman, C. P. (2011b). Chapter 57—*Pichia* E.C. Hansen (1904). En C. P. Kurtzman, J. W. Fell, & T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts (Fifth Edition)* (5ta ed., pp. 685-707). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00057-4>

Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T., & Robert, V. (2011). Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts. En *The Yeasts* (pp. 87-110). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00007-0>

Lagos Narváez, J. F. L. (2017). *Identificación y caracterización de levaduras fermentadoras de cacao (Theobroma cacao) provenientes de centros de acopio de dos localidades del Ecuador* [Pontificie Universidad Católica del Ecuador]. [http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/13991/JLagos%20Tesis\\_vfinal.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/13991/JLagos%20Tesis_vfinal.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Maicas, S. (2020). The Role of Yeasts in Fermentation Processes. *Microorganisms*, 8(8), 1142. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081142>

MAMBUSCAY, LÓPEZ, CUERVO, ARGOTE, & OSORIO. (2013). IDENTIFICACIÓN DE LAS LEVADURAS NATIVAS PRESENTES EN ZUMOS DE PIÑA, MORA Y UVA. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 2, 136-144.

Mari, E., Guerrini, S., Granchi, L., & Vincenzini, M. (2016). Enumeration and rapid identification of yeasts during extraction processes of extra virgin olive oil in Tuscany. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(6), 93. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2049-9>

Masoud, W., & Jespersen, L. (2006). Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. *International Journal of Food Microbiology*, 110(3), 291-296. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.030>

*MIDAGRI: Perú se consolida como octavo exportador mundial de café.* (2021, septiembre 16). <https://www.gob.pe/institucion/midagri/noticias/523046-midagri-peru-se-consolida-como-octavo-exportador-mundial-de-cafe>

*Minagri y el sector cafetalero impulsan estrategia para la promoción del consumo de café peruano.* (2020). <https://www.gob.pe/institucion/midagri/noticias/295326-minagri-y-el-sector-cafetalero-impulsan-estrategia-para-la-promocion-del-consumo-de-cafe-peruano>

Moon, S. H., Chang, M., Kim, H. Y., & Chang, H. C. (2014). *Pichia kudriavzevii* is the major yeast involved in film-formation, off-odor production, and texture-softening in over-ripened Kimchi. *Food Science and Biotechnology*, 23(2), 489-497. <https://doi.org/10.1007/s10068-014-0067-7>

Murthy, P. S., & Madhava Naidu, M. (2012). Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review. *Resources, Conservation and Recycling*, 66, 45-58. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2012.06.005>

Navarro, M. J. O. (2015). PROPIEDADES DE LEVADURAS *Saccharomyces* Y NO *Saccharomyces* AISLADAS DE AMBIENTES NATURALES [Universidad de Castilla-La Mancha]. <https://ruidera.uclm.es/xmlui/bitstream/handle/10578/7832/TESIS%20Ortiz%20Navarro.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Nuñez, G. (2015). *ESTUDIO DE CAMBIOS FISIOLÓGICOS DE *kluyveryces marxiaanus* PRODUCTORA DE FRUCTANASAS POR EL EFECTO DE TEMPERATURA Y MINERALES* [Centro de investigación y asistencia en tecnología y diseño del estado de Jalisco,A.C]. <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/486/1/Gema%20Nu%C3%B1ez.pdf>

Oestreich-Janzen, S. (2010). *Chemistry of Coffee*. 1087.

Oliveira, V. C. (2011). Estudio morfológico do sistema respiratório de quati (*Nasua nasua*). *Biotemas*, 25(1), 81-92. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2012v25n1p81>

Pereira Louzada, L., & Rizzo Moreira, T. (2021). *Quality determinants in Coffee Production*. Food Engineering Series. [file:///C:/Users/PERSONAL/Downloads/Pereira2021%20book%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/PERSONAL/Downloads/Pereira2021%20book%20(1).pdf)

Pérez Escalante, J. J. (2019). 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. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/11404>

Phaff, H. J., & Starmer, W. (1987). Yeasts associated with plants, insects and soil. En *Yeasts Associated with Plants, Insects and Soil* (pp. 123-179).

Pu, L., Jingfan, F., Kai, C., Chao-an, L., & Yunjiang, C. (2014). Phenylethanol promotes adhesion and biofilm formation of the antagonistic yeast *Kloeckera apiculata* for the control of blue mold on citrus. *FEMS Yeast Research*, 14(4), 536-546. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12139>

Puerta Quintero, G. I. (2012, agosto). Factores, procesos y controles en la fermentación del café. *CENICAFE*, 422. <https://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/327/1/avt0422.pdf>

Puerta-Quintero, G. I., & Echeverry-Molina, J. G. (2015, marzo 30). Fermentación controlada del café: Tecnología para agregar valor a la calidad. *ResearchGate*, 454, 12.

Puerta-Quintero, G. I., & Ríos-Arias, S. (2011). *COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL MUCÍLAGO DE CAFÉ, SEGÚN EL TIEMPO DE FERMENTACIÓN Y REFRIGERACIÓN*. 18.

Puerta Quintero, G. I. (1999, marzo). Influencia del proceso de beneficio en la calidad del café. CENICAFÉ, 88. <http://hdl.handle.net/10778/58>

Quirós, M., Rojas, V., Gonzalez, R., & Morales, P. (2014). Selection of non-Saccharomyces yeast strains for reducing alcohol levels in wine by sugar respiration. *International Journal of Food Microbiology*, 181, 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.024>

Ramos, D. M. B., Silva, C. F., Batista, L. R., & Schwan, R. F. (2010). Inibição in vitro de fungos toxigênicos por *Pichia* sp. E *Debaryomyces* sp. Isoladas de frutos de café (*Coffea arabica*). *Acta Scientiarum. Agronomy*, 32(3), 397-402. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v32i3.3361>

Raynal, C., Wardrop, F., Pillet, O., Languet, P., Heras, J. M., & Dumont, A. (2011). *Fermentación controlada mediante la inoculación secuencial de una levadura no-Saccharomyces y de una levadura Saccharomyces cerevisiae, una herramienta innovadora para el enólogo*. 428, 83-92.

Rizzon, L. A., & Sganzerla, V. M. A. (2007). Ácidos tartárico e málico no mosto de uva em Bento Gonçalves-RS. *Ciência Rural*, 37, 911-914.

Rodrigues, D. H. D., Boere, V., Cesario, C. S., Lopes, W. de P., Monteiro, A. B., & Silva, I. O. (2021). Potentially harmful materials in the feces of wild ring-tailed coatis (*Nasua nasua*) and health implications. *Ciência Rural*, 52. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20210108>

Rueda, J., Sanchez, J., Plua, G., Baquerizo, J., Calva, S., Chicaiza, G., Manzo, M., Rivadeneira, R., Saltos, M., Cuesta, M., Gualotuña, M., & Jara, C. (2002). *Norma Técnica Ecuatoriana 2322. Bebidas alcohólicas. Cerveza. Determinación de alcohol*. <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/2322.pdf>

Saerens, S., & Swiegers, J. H. (2014). *Production of low-alcohol or alcohol-free beer with pichia kluyveri yeast strains* (World Intellectual Property Organization Patent N.º WO2014135673A2). <https://patents.google.com/patent/WO2014135673A2/en>

Santos, S. T. dos, Paz, M. F. da, & Altemio, Â. D. C. (2022). Evaluation of two brazilian native yeast strains (*Pichia kudriavzevii*) in craft beer. *Research, Society and Development*, 11(1), e17311124783-e17311124783. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24783>

Schlegel, H. G. (1997). *Microbiologia general*. Omega. <http://biblioteca.utsem-morelos.edu.mx/files/asp/metodologias/microbiologia%20general-hans%20g-schlegel.pdf>

Schwan, R., & Fleet, G. (2015). *Cocoa and Coffee fermentations*. Taylor & Francis Group, LLC.

Schwan, R., Pereira, G., & Fleet, G. H. (2014). Microbial activities during cocoa fermentation. *Cocoa and Coffee Fermentations*, 129-192.

Schwan, R., Silva, C., & Batista, L. (2012). *Coffee Fermentation* (pp. 677-690). <https://doi.org/10.1201/b12055-49>

Seo, S.-H., Rhee, C.-H., & Park, H.-D. (2007). Degradation of Malic Acid by *Issatchenkia orientalis* KMBL 5774, an Acidophilic Yeast Strain Isolated from Korean Grape Wine Pomace. *Journal of Microbiology*, 45(6), 521-527.

Sharma, A. K., Singh, P. N., & Sawant, S. D. (2012). Evaluation of Fermentation Efficiency of Yeast Strains and their Effect on Quality of Young Wines. *Indian Journal of Microbiology*, 52(3), 495-499. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0226-y>

Silva, C. F., Vilela, D. M., de Souza Cordeiro, C., Duarte, W. F., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2013). Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation.



*World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(2), 235-247.  
<https://doi.org/10.1007/s11274-012-1175-2>

Stewart, G. G. (2009). The Horace Brown Medal Lecture: Forty Years of Brewing Research. *Journal of the Institute of Brewing*, 115(1), 3-29. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2009.tb00340.x>

Suarez, C., Garrido, N., & Guevara, C. (2016). *Levadura Saccharomyces cerevisiae y la produccion de alcohol. Revision bibliografica*. 50, 10.

Torija Martinez, M. J. (2002). *Ecología de levaduras: Selección y adaptación a fermentaciones vínicas* (DEPARTAMENT DE BIOQUIMICA I BIOTECNOLOGIA) [Doctorado, Universitat Rovira I Virgili].  
<https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/8643/Tesismjt.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Valdespino-León, M., Calderón-Domínguez, G., De La Paz Salgado-Cruz, Ma., Rentería-Ortega, M., Farrera-Rebollo, R. R., Morales-Sánchez, E., Gaona-Sánchez, V. A., & Terrazas-Valencia, F. (2021). Biodegradable Electrospayed Pectin Films: An Alternative to Valorize Coffee Mucilage. *Waste and Biomass Valorization*, 12(5), 2477-2494.  
<https://doi.org/10.1007/s12649-020-01194-z>

Valencia, C., Arboleda, R., Burgos, L., Mendoza, A., Betancourt, E., Abedrabo, R., Campaña, M., Jarrin, P., Vega, T., Rodriguez, I., Lupera, H., Kubes, G., Larrea, L., Santana, S., Amancha, V., Zapata, L., Alvarez, M., Orozco, L., Muñoz, J., ... Bustamante, E. (1976). *Norma Técnica Ecuatoriana 341.Bebidas alcoholicas. Determinacion de acidez*.  
[https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/NTE\\_INEN\\_341.pdf](https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/NTE_INEN_341.pdf)

Vaughan-Martini, A., & Martini, A. (2011). *Saccharomyces Meyen ex Reess (1870)*. En *The Yeasts* (pp. 733-746). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00061-6>

Vicente, J., Calderón, F., Santos, A., Marquina, D., & Benito, S. (2021). High Potential of *Pichia kluyveri* and Other *Pichia* Species in Wine Technology. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1196. <https://doi.org/10.3390/ijms22031196>

Villegas, Moreno, Cumplido, Lopez, & Valderrey. (2011). Coma y acidosis metabólica: Intoxicación por metanol. *Revista de Toxicología*, 28, 174-176.

## IX. ANEXOS

## ANEXO 1: Formación de película de las levaduras estudiadas



## ANEXO 2: Resultado del análisis de pectina de la empresa Elymar



## Certificate of Analysis

NO.: AP2007PERU-94

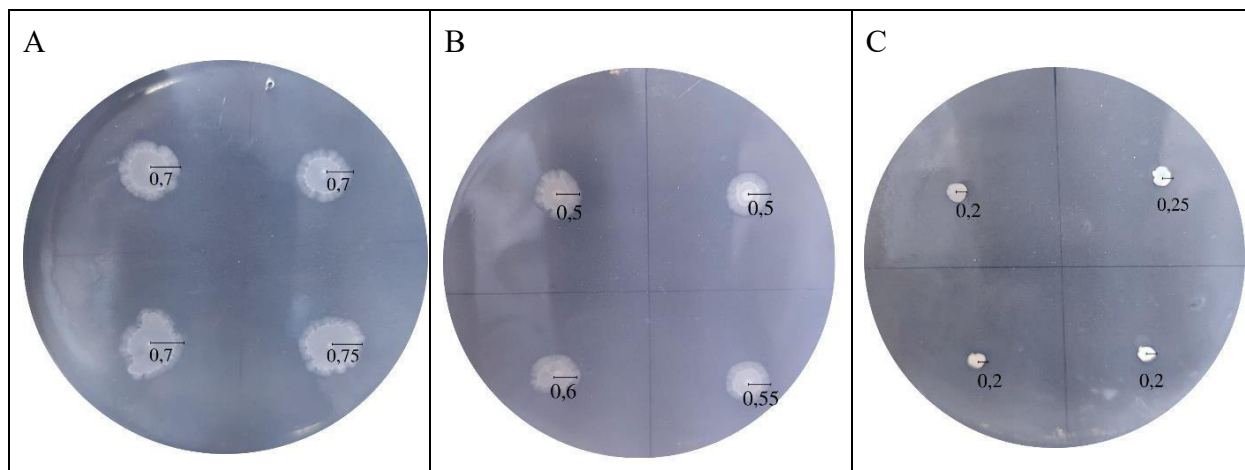
<b>Name:</b> HM Rapid Set Pectin		
<b>Type:</b> APC102		
<b>Batch</b>	<b>Production Date</b>	<b>Net Weight</b>
7801-01	07-29-2020	25kg/bag
<b>Shelf life:</b> 24Months		
<b>Test Items</b>	<b>Specification</b>	<b>Test Result</b>
USA-SAG, °	150±5	155
DE, % (Typically)	Max. 64	63.8
pH (1% Solution)	3.2-3.6	3.1
Setting Temperature, °C	82-92	90
Moisture, %	Max. 12	4.7
GA*, %	Min. 65	91.4
Lead, mg/kg	Max. 2	<2
Arsenic, mg/kg	Max. 3	<3
Cadmium, mg/kg	Max. 1	<1
Mercury, mg/kg	Max. 1	<1
Total Plate count, cfu/g	Max. 500	<500
Yeast and mould, cfu/g	Max. 100	<100
Coliforms	Absent in 1 g	Not Detected
E. coli	Absent in 1 g	Not Detected
S. Aureus	Absent in 1 g	Not Detected
Salmonella	Absent in 25g	Not Detected
<b>Filed by:</b> Li Man 08-13-2020		
<b>Authorized by:</b>		
※ This product complies with all criteria laid down by EU, FAO/WHO and FDA/FCC. ※ Date Format: MM-DD-YYYY		

烟台安德利果胶股份有限公司

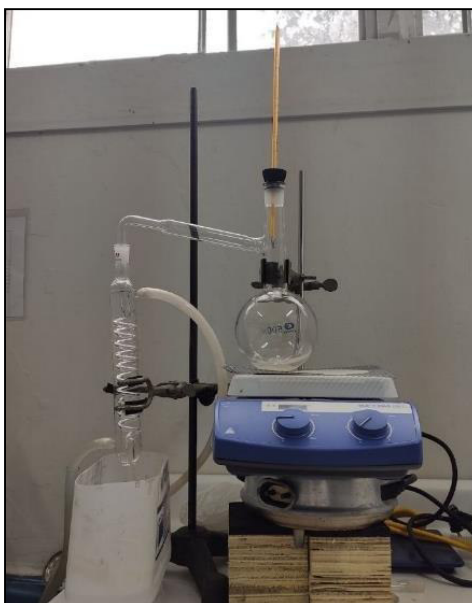
**Yantai Andre Pectin Co.,**

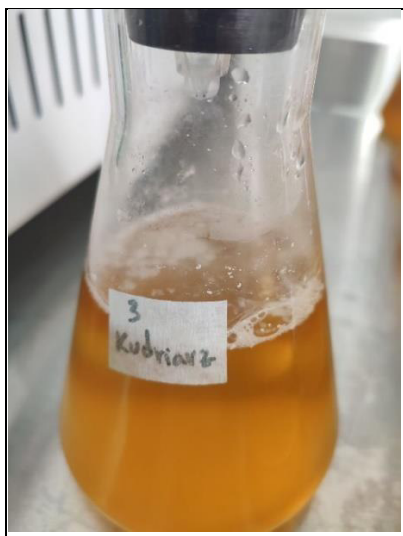
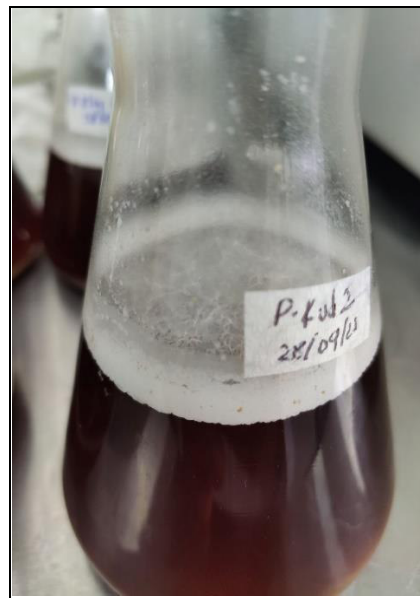
地址: 中国, 山东, 烟台市牟平区新城大街 889 号 邮编: 264100. Add: No. 889 Xincheng Street, Muping Economic Development Zone, Yantai, China  
 电话(Tel): (86)535-4282000 传真(Fax): (86)535-4282000 E-mail: info@andrepectin.com

**ANEXO 3:** Radio de halos de actividad pectinolítica para (A) *P.kudriavzevii*, (B) *P.kluyveri* y (C) *S.Cerevisiae*



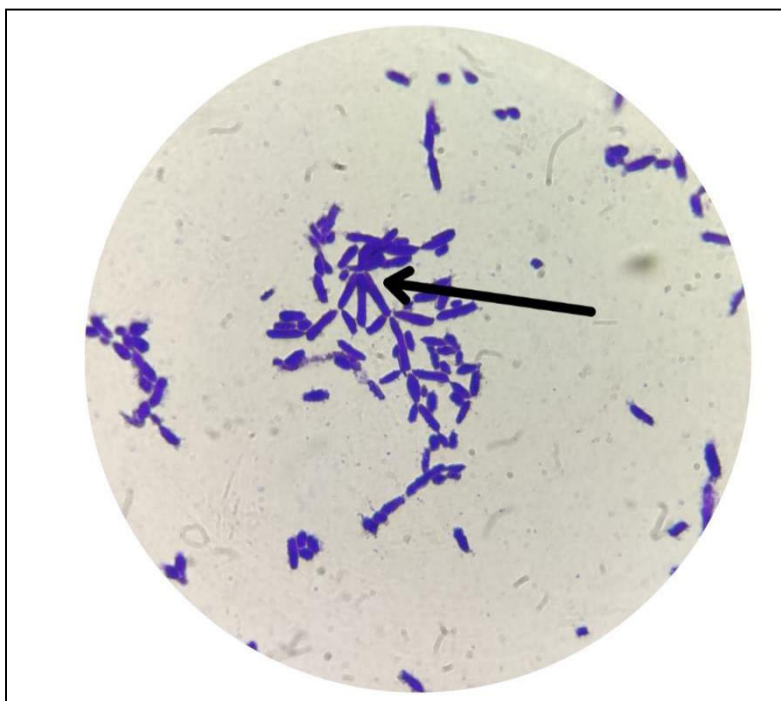
**ANEXO 4:** Sistema de destilación

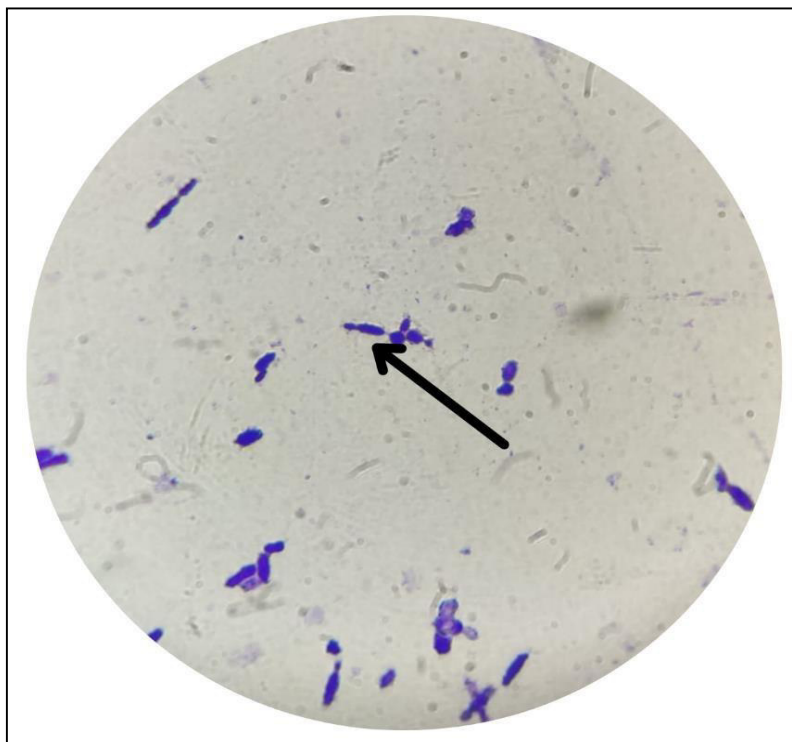
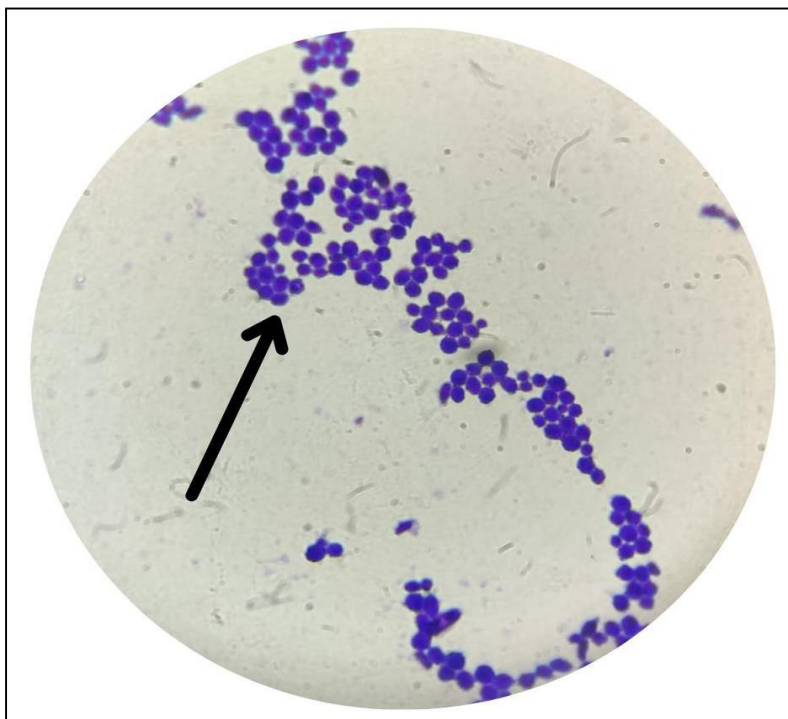


**ANEXO 5: Formación de película en jugo de manzana****ANEXO 6: Formación de película en mosto de malta**

## ANEXO 7: Tabla nutricional de jugo de manzana Motts ®

CALORIES	AMOUNT PER SERVING	%DV
<b>120</b>	Sodium 30 mg	1%
	Total Carbohydrates 29 g	10%
	Sugars 28 g	
SERVING SIZE	Vitamin C 108 mg	120%
<b>8 fl. oz.</b>	Iron 0.9 mg	6%
	Potassium 290 mg	6%

ANEXO 8: Morfología de *P. kudriavzevii* en jugo de manzana

**ANEXO 9:** Morfología de *P. kluyveri* en jugo de manzana**ANEXO 10:** Morfología de *S. saccharomyces* en jugo de manzana



## ANEXO 11: Datos experimentales de °Brix y pH en fermentación de jugo de manzana de

la marca Motts

Tiempo (días)	<i>P. kluyveri</i>				<i>P. kudriavzevii</i>				<i>S. cerevisiae</i>			
	BRIX	Desv estándar	PH	Desv estándar	BRIX	Desv estándar	PH	Desv estándar	BRIX	Desv estándar	PH	Desv estándar
0.0	11.70	0.00	3.67	0.000	11.70	0.00	3.67	0.000	11.70	0.00	3.67	0.00
0.7	11.47	0.05	3.65	0.067	11.43	0.06	3.65	0.021	11.03	0.06	3.55	0.01
0.8	11.57	0.21	3.68	0.012	11.43	0.06	3.66	0.012	10.70	0.26	3.53	0.03
1.0	11.40	0.00	3.65	0.225	11.43	0.06	3.67	0.006	9.73	0.72	3.47	0.03
1.6	11.33	0.05	3.63	0.006	11.23	0.06	3.65	0.010	9.47	0.87	3.39	0.09
1.8	11.27	0.12	3.62	0.006	11.22	0.03	3.64	0.010	8.37	0.84	3.37	0.06
2.6	11.07	0.05	3.64	0.008	11.03	0.06	3.64	0.012	8.03	1.07	3.35	0.04
2.8	11.13	0.05	3.62	0.000	11.00	0.10	3.65	0.006	6.37	0.32	3.27	0.02
3.0	11.00	0.00	3.64	0.006	10.90	0.10	3.63	0.017	6.17	0.45	3.23	0.03
3.8	11.00	0.00	3.63	0.008	10.90	0.10	3.63	0.013	5.33	0.67	3.18	0.06
4.0	10.79	0.02	3.64	0.007	10.59	0.27	3.62	0.027	5.10	0.56	3.23	0.07
4.1	10.63	0.12	3.59	0.010	10.33	0.32	3.59	0.032	4.73	0.47	3.24	0.10
5.0	10.67	0.05	3.59	0.010	10.37	0.46	3.61	0.029	4.23	0.15	3.26	0.04
6.0	10.38	0.08	3.60	0.023	10.03	0.40	3.57	0.047	4.27	0.15	3.28	0.04
6.2	10.28	0.15	3.60	0.028	9.88	0.32	3.57	0.064	4.07	0.23	3.29	0.06
6.9	10.07	0.15	3.59	0.044	9.70	0.35	3.54	0.040	4.10	0.17	3.36	0.08
8.9	9.67	0.31	3.58	0.040	9.13	0.76	3.52	0.070	4.03	0.15	3.35	0.07
10.9	9.60	0.30	3.53	0.075	9.00	0.78	3.49	0.072	4.10	0.10	3.39	0.04
11.1	9.37	0.45	3.47	0.085	8.70	0.89	3.41	0.121	-	-	-	-
11.8	9.13	0.60	3.48	0.082	8.37	1.03	3.41	0.101	-	-	-	-
12.0	8.86	0.66	3.44	0.083	8.17	1.16	3.38	0.091	-	-	-	-
12.8	8.55	0.80	3.41	0.105	7.80	1.21	3.39	0.085	-	-	-	-
13.0	8.43	0.70	3.45	0.075	7.60	1.25	3.39	0.095	-	-	-	-
13.8	8.17	0.97	3.37	0.118	7.13	1.50	3.32	0.090	-	-	-	-
13.9	7.87	0.95	3.35	0.135	7.07	1.55	3.33	0.121	-	-	-	-
14.7	7.60	1.15	3.30	0.115	6.60	1.60	3.26	0.086	-	-	-	-
14.9	7.40	1.08	3.26	0.101	6.27	1.80	3.19	0.081	-	-	-	-
15.7	6.53	1.42	3.22	0.136	6.37	0.91	3.22	0.056	-	-	-	-
15.8	6.23	1.48	3.12	0.125	5.80	1.21	3.18	0.044	-	-	-	-
16.6	5.90	1.37	3.11	0.053	5.53	1.04	3.12	0.070	-	-	-	-
16.8	5.85	1.29	3.18	0.113	5.37	1.03	3.22	0.015	-	-	-	-
17.5	5.60	1.11	3.18	0.055	5.23	0.68	3.23	0.075	-	-	-	-
17.7	5.37	1.00	3.15	0.071	5.13	0.58	3.21	0.100	-	-	-	-
18.5	5.10	0.75	3.18	0.044	4.67	0.46	3.28	0.136	-	-	-	-
19.2	4.77	0.47	3.20	0.046	4.83	0.21	3.30	0.111	-	-	-	-
20.0	4.47	0.50	3.25	0.032	4.68	0.16	3.41	0.124	-	-	-	-
20.1	4.50	0.25	3.26	0.017	4.97	0.47	3.40	0.119	-	-	-	-
20.9	4.50	0.25	3.28	0.020	4.70	0.17	3.43	0.106	-	-	-	-

## ANEXO 12: Datos experimentales de °Brix y pH en mosto de malta

Tiempo (días)	<i>P. kluyveri</i>				<i>P. kudriavzevii</i>				<i>S. cerevisiae</i>			
	°Brix	Desv estándar	PH	Desv estándar	°Brix	Desv estándar	PH	Desv estándar	°Brix	Desv estándar	PH	Desv estándar
0	12.70	0.00	4.86	0.000	12.70	0.00	4.86	0.000	12.7	0.00	4.86	0.000
0.67	12.36	0.17	4.75	0.008	12.55	0.05	4.74	0.002	11.85	0.25	4.47	0.010
0.92	12.51	0.13	4.70	0.014	12.60	0.00	4.72	0.016	11.5	0.30	4.59	0.120
1.67	12.57	0.40	4.64	0.021	12.65	0.05	4.70	0.035	11.3	0.40	4.335	0.025
1.92	12.57	0.42	4.64	0.060	12.25	0.35	4.59	0.010	11.2	0.40	4.31	0.010
2.67	12.37	0.49	4.46	0.036	12.20	0.10	4.38	0.030	10.875	0.43	4.29	0.020
2.92	12.30	0.35	4.44	0.030	11.90	0.20	4.25	0.150	10.65	0.35	4.255	0.005
3.67	12.20	0.36	3.74	0.026	11.95	0.05	3.63	0.110	10.325	0.52	4.01	0.000
3.92	12.03	0.21	3.62	0.044	11.90	0.10	3.48	0.075	10.35	0.55	4.02	0.010
5.67	12.00	0.26	3.27	0.046	11.90	0.10	3.26	0.055	10.15	0.65	3.885	0.015
5.92	11.97	0.32	3.24	0.015	11.95	0.05	3.19	0.045	9.95	0.55	3.83	0.010
6.67	11.90	0.36	3.13	0.021	11.85	0.05	3.09	0.030	9.75	0.75	3.86	0.050
6.92	11.87	0.32	3.17	0.025	11.90	0.00	3.14	0.030	9.35	0.95	3.885	0.025
7.67	11.97	0.35	3.16	0.015	11.85	0.05	3.16	0.015	9.4	0.80	3.765	0.005
7.92	11.67	0.15	3.13	0.026	11.60	0.10	3.23	0.020	9.25	0.95	3.685	0.015
8.67	11.87	0.15	3.11	0.012	11.75	0.05	3.10	0.020	9.15	0.95	3.77	0.210
8.92	11.90	0.36	3.07	0.010	11.80	0.10	3.06	0.045	9.1	0.90	3.64	0.070
10.67	11.90	0.26	3.03	0.006	11.80	0.10	2.98	0.050	9	0.90	3.655	0.055
10.92	11.83	0.21	3.04	0.006	11.80	0.10	3.02	0.035	-	-	-	-
11.67	11.90	0.20	3.03	0.015	11.80	0.10	3.02	0.035	-	-	-	-

**ANEXO 13:** Formación de película por *P. kluyveri* en fermentación de café



**ANEXO 14:** Formación de película por el género *Pichia* en fermentación de café



**ANEXO 15:** No formación de película por el género *Saccharomyces* en fermentación de café



**ANEXO 16:** Análisis de varianza (ANOVA) de producción de etanol por parte de *P.kluyveri* en fermentación semi seca

Variaciones	S.C	G.L	M.C	F	Valor p	
<b>Modelo</b>	5.83	4	1.46	5264.57	< 0.0001	significante
A-Concentración	0.7212	1	0.7212	2605.29	< 0.0001	
B-Temperatura	4.76	1	4.76	17201.33	< 0.0001	
AB	0.3168	1	0.3168	1144.45	< 0.0001	
A <sup>2</sup>	0.0297	1	0.0297	107.22	< 0.0001	
<b>Error</b>	0.0019	7	0.0003			
<b>Total</b>	5.83	11				

**ANEXO 17:** Análisis de varianza (ANOVA) de producción de ácido acético de*P.kluyveri* en fermentación semi seca

Variaciones	S.C	G.L	M.C	F	Valor p	
<b>Modelo</b>	0.0054	4	0.0014	95.57	< 0.0001	significante
A-Concentración	0.0007	1	0.0007	49.59	0.0002	
B-Temperatura	0.0044	1	0.0044	308.29	< 0.0001	
AB	0.0001	1	0.0001	9.60	0.0174	
A <sup>2</sup>	0.0002	1	0.0002	14.81	0.0063	
<b>Error</b>	0.0001	7	0.0000			
<b>Total</b>	0.0055	11				

**ANEXO 18:** Análisis de varianza (ANOVA) de producción de etanol de *S. cerevisiae* en

fermentación semi seca

Variaciones	S.C	G.L	M.C	F	Valor p	
<b>Modelo</b>	6.24	4	1.56	940.08	< 0.0001	significante
A-Concentración	0.9099	1	0.9099	548.48	< 0.0001	
B-Temperatura	4.97	1	4.97	2996.27	< 0.0001	
AB	0.3453	1	0.3453	208.13	< 0.0001	
A <sup>2</sup>	0.0123	1	0.0123	7.43	0.0295	
<b>Error</b>	0.0116	7	0.0017			
<b>Total</b>	6.25	11				

**ANEXO 19:** Análisis de varianza (ANOVA) de producción de ácido acético de *S.**cerevisiae* en fermentación semi seca

Variaciones	S.C	G.L	M.C	F	Valor p	
<b>Modelo</b>	0.0129	4	0.0032	79.18	< 0.0001	significante
A-Concentración	0.0024	1	0.0024	58.31	0.0001	
B-Temperatura	0.0091	1	0.0091	223.23	< 0.0001	
AB	0.0010	1	0.0010	23.71	0.0018	
A <sup>2</sup>	0.0005	1	0.0005	11.47	0.0117	

<b>Error</b>	0.0003	7	0.0000
<b>Total</b>	0.0132	11	