

## Efecto del despulpado en seco y la adición de levaduras en la fermentación sobre la composición del aroma del café tostado

Roberto De León, Ana Luisa Mendizábal de Montenegro, Carlos Rolz

Centro de Ingeniería Bioquímica (CIB), Instituto de investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala  
carlosrolz@uvg.edu.gt

**RESUMEN:** Se llevaron a cabo experimentos con cinco muestras de café de las regiones de Fraijanes y Acatenango con el objetivo de introducir modificaciones en el beneficio de café y observar cambios en la composición química de los compuestos volátiles mayoritarios presentes en el aroma del café tostado. Las modificaciones introducidas al beneficio húmedo tradicional fueron dos: a) despulpado en seco y b) adición de levaduras al inicio de la fermentación del grano. El proceso de eliminación de la pulpa en seco conservó en el mucílago adherido al grano los azúcares solubles. Estos compuestos fueron transformados por la flora microbiana natural principalmente en etanol, ácidos orgánicos, CO<sub>2</sub> y agua. La sacarosa y la glucosa inicialmente presentes fueron transformadas totalmente, no así la fructosa la cual se degradó en forma parcial. Sin embargo, la adición de levaduras estimuló el consumo de la fructosa. La cantidad de etanol producida y detectada en las aguas de lavado no varió significativamente entre las cinco muestras de café, ni tampoco en aquellas fermentaciones en donde se adicionaron levaduras al inicio de la fermentación, por lo que indirectamente se comprobó la presencia de levaduras en la flora microbiana natural. El análisis de multivariantes del aroma indicó que: a) las muestras de café podían colocarse en grupos diferentes, b) en ninguna muestra hubo diferencias significativas en el aroma entre la fermentación natural y las dos fermentaciones a las cuales se les había agregado levadura, y c) los furanos fueron los componentes mayoritarios del aroma en todas las muestras.

**PALABRAS CLAVE:** Café, beneficio húmedo, fermentación, aroma.

### Dry pulp removal and yeast addition during fermentation effect on the aroma composition of roasted coffee

**ABSTRACT:** Experiments were carried out with five coffee samples from Fraijanes and Acatenango with the purpose of determining if process changes could induce new aroma characteristics in roasted coffee. Two different operations were introduced in the wet process: a) dry pulp removal and b) yeast addition at the start of the fermentation step. Soluble sugars in the mucilage were not washed away during pulp removal and they were transformed in the fermentation step into ethanol, organic acids, CO<sub>2</sub> and water. Sucrose and glucose were totally consumed, fructose only partially. Yeast addition increased fructose consumption. Ethanol production did not vary significantly among coffee samples or in those cases where yeast was added, hence indirectly confirming the presence of natural yeast strains. Multivariate analysis of the aroma components indicated that: a) coffee samples could be separated into different groups; b) no difference was detected in natural or yeast added fermentations and c) furans were the most abundant aroma chemical compounds.

**KEYWORDS:** Coffee, wet processing, fermentation, aroma.

## Introducción

El café producido en el país se prepara en beneficios que operan empleando el llamado proceso húmedo. Este proceso es empleado desde México hasta Venezuela, zona que constituye al grupo de productores de los cafés suaves lavados.

El beneficio húmedo de café, en forma breve, consiste en: recepción del fruto maduro, o café cereza, en tanques de agua, en donde se separan los granos que flotan del resto. Luego se efectúa la separación de la pulpa o cáscara en molinos o pulperos diseñados para el efecto, los cuales, en su mayoría, funcionan con la adición de agua. Continúa la fermentación natural del mucílago que rodea al grano, la cual se lleva a cabo en tanques abiertos en donde al café despulpado se amontona. Transcurridos varios días se realiza el lavado del grano fermentado en canales con agua circulando. El café es secado al sol en patios, en secadoras con aire caliente, o empleando consecutivamente ambas técnicas, dependiendo de las condiciones del clima. Luego se traslada el café seco en pergamino a los beneficios denominados secos, en donde se elimina el pergamino en molinos diseñados para tal fin. El café verde resultante, o en oro, se comercializa en sacos tanto en el exterior como en el interior del país. Empresas centralizadas lo adquieren, lo tuestan, lo muelen y lo empacan para la venta y el consumo.

Los beneficios tienen la experiencia adquirida por los años de operación para evitar sabores desagradables de la bebida por poca o un exceso de fermentación, mal lavado, alta temperaturas en el secado, un almacenamiento en condiciones inapropiadas y excesos de tiempo y temperatura en el tostado. El café producido en Guatemala tiene una alta estima de calidad en ese sentido.

Sin embargo, el proceso requiere una proporción substancial de agua, la cual generalmente se descarga a las aguas superficiales, tanto de corriente, como los ríos, o a las estancadas, como los lagos. Dicha agua conlleva una carga orgánica significativa. Aunque existen instancias de un mejor manejo y reciclaje de la pulpa separada del fruto, la pulpa acumulada en los beneficios es también objeto de contaminación.

La Asociación Nacional del Café (ANACAFÉ) tiene un programa para sus asociados que persigue el eficiente uso del agua en el beneficio húmedo<sup>1</sup>. En dicha referencia se estima que el gasto de agua por quintal de café pergamino seco producido es de aproximadamente 1,900 litros; cifra que puede disminuir a 850 litros, si se efectúa un reciclaje parcial del agua durante las operaciones. Suponiendo una producción promedio sostenida

de 5 millones de quintales de café pergamino seco por cosecha, la industria cafetalera emplea entre 4,250 a 9,500 millones de litros agua. Las aguas del despulpado pueden llegar a contener de 7 a 16 g/L de sólidos totales y las aguas del lavado del café fermentado o aguas mieles, de 5 a 13 g/L (Espinoza et al. 1976). Estos sólidos se originan como resultado de la remoción y degradación del mucílago que envuelve al grano de café cereza y que contiene alrededor de 7% de carbohidratos solubles (Menchú y Rolz, 1973). De las cifras anteriores se estima que se descargan por cosecha en la operación de los aproximadamente 36,000 beneficios húmedos existentes entre 25,000 a 56,000 toneladas de materia orgánica en las aguas de beneficio. Invertir en procesos aeróbicos clásicos de tratamiento de aguas, o también llamados sistemas de lodos activados, es oneroso para la mayoría de los beneficios en el país, especialmente en esta época de precios bajos y demanda mundial sobre ofertada. Es necesario un enfoque global de procesamiento limpio para introducir cambios que, por un lado, no afecten la calidad del grano del café producido, pero por el otro conviertan el beneficio en una operación más productiva. Debe recordarse que cada vez con más frecuencia compradores de café, principalmente en Europa, exigen en su demanda, que se cumplan con las disposiciones globales de sostenibilidad.

La fermentación de café ha sido recientemente estudiada por varios investigadores en diferentes países enfocando las mismas en los aspectos siguientes: a) caracterización de la diversidad microbiana presente en el proceso, b) definición de la participación de los microorganismos en la degradación y eliminación del mucílago, y c) efectos de la adición de microorganismos a los tanques de fermentación sobre la fermentación y la calidad de la bebida resultante.

Como se explicó con anterioridad el mucílago es una de las envolturas del grano de café que debe eliminarse en el beneficio húmedo. La distribución y caracterización de los polímeros del mucílago, o sustancias insolubles en etanol, ha sido llevada a cabo (Avallone et al. 2000) y se encontró un 30 % de pectina, un 8 % de celulosa y un 18 % de polisacáridos neutros no celulósicos. La pectina tenía un peso molecular bajo, de 12 a 29 kDa, alta metilación, 62 %, moderada acetilación, 5 %, y no gelificó en presencia de sacarosa o en un medio ácido. Sin embargo la estructura de la pectina parece ser que depende de la variedad del café, la zona ecológica de la plantación y las prácticas agrícolas y de beneficio. Por ejemplo, pectina de café de Guatemala mostró siempre un bajo peso molecular, 37-48 kDa pero menor grado de metoxilación, entre 1.9 a 2.3 %, de nuevo sin poder de gelificación (García et al. 1990). La pectina

<sup>1</sup> Santos Salazar, Daniel (2005) *Uso eficiente del agua en el beneficio húmedo del café* Revista ANACAFÉ [http://anacafe.org/glifos/index.php/Uso\\_eficiente\\_agua\\_BeneficioHumedo](http://anacafe.org/glifos/index.php/Uso_eficiente_agua_BeneficioHumedo)

es un polímero del ácido galacturónico que tiene una diversidad de estructuras y grupos químicos adicionales de acuerdo con su origen (Richard y Hilditch, 2009). La degradación enzimática de la pectina se debe a un conjunto de enzimas que actúa sobre el polímero hasta obtener el monómero que es el ácido galacturónico (Bonnin et al. 2014). Por lo tanto, los microorganismos presentes en los tanques de fermentación de café deben de tener la información genética para producir las enzimas necesarias anteriormente citadas y emplear el ácido galacturónico como fuente de carbono. Tanto bacterias como levaduras y hongos pueden crecer empleando el ácido galacturónico como fuente de carbono (Richard y Hilditch, 2009).

La diversidad de microorganismos en la fermentación ha sido estudiada en los tres procesos comerciales y diferentes del beneficio: a) el húmedo (separación de pulpa, fermentación y secado del grano), b) el seco (fermentación de la cereza entera y secado) y c) el semi-seco (separación de pulpa y fermentación y secado simultánea del grano despulpado). Las investigaciones sobre la diversidad de microorganismos se han llevado a cabo en pruebas a escala de laboratorio. En el beneficio húmedo, Agate y Bhat (1996) en India reportaron la presencia de las levaduras de los géneros *Saccharomyces* y *Schizosaccharomyces* sp. Avallone et al. (2001a) con muestras de Xalapa, Veracruz reportaron que la diversidad variaba conforme transcurría la fermentación, identificando bacterias del género *Klebsiella* y *Erwinia*, bacterias lácticas del género *Leuconostoc* y *Lactobacillus* y levaduras del género *Kloeckera*, *Candida*, y *Cryptococcus*. Pereira et al. (2014) encontraron los siguientes géneros de levadura predominantes, *Pichia*, *Candida*, y *Hanseniaspora*. Silva et al (2000, 2008) en Brasil estudiaron la diversidad microbiana en el proceso seco, la cual consistió en una gran cantidad de bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Entre las bacterias que predominaron en la parte inicial de la fermentación estaban los géneros *Bacillus*, *Serratia*, *Enterobacter* y *Acetivibrio*. Entre las levaduras, que representaron un 22 % de los aislados, se encontraron los géneros, *Debaromyces*, *Pichia* y *Candida*, las cuales predominaron al final del proceso. Vilela et al. (2010) en Brasil, por su parte, estudiaron la diversidad en el proceso semi-seco. De nuevo encontraron una gran cantidad de bacterias, levaduras y hongos filamentosos; entre las bacterias, *Bacillus*, *Klebsiella*, y *Enterobacter*; y entre las levaduras *Pichia*, *Torulospira*, y *Rhodotorula*. De lo anterior se deduce que no existe un género de bacterias o levaduras que predomine durante la fermentación del grano. La población microbiana es una mezcla heterogénea que dependerá del lugar de origen y del proceso de fermentación empleado.

Ahora bien, el papel que juega la gran diversidad de microorganismos en la eliminación del mucílago continua siendo controversial y en discusión. Por un lado Avallone et al. (2001b; 2002) proponen la tesis de que el rol microbiano es mínimo y que la acidez desarrollada en el proceso hincha el mucílago de

manera que es posible removerlo en el lavado. Parten de dos opiniones, la primera es que existen bacterias que producen ácidos y que de un pH inicial de alrededor de 5.3 disminuye hasta valores de 3.5 al final. La segunda se basa en que encontraron en el líquido de lavado pectina no degradada y pectina soluble la cual presentaba una ligera reducción de viscosidad, peso molecular y una parcial demetilación. Por otro lado (Avallone et al. 2001a) mostraron la utilización microbiana de los azúcares originalmente presentes en el mucílago para crecer y producir etanol y ácidos orgánicos. La glucosa era mejor consumida que la fructosa. La cantidad producida de etanol, fue menor que 2 % con respecto a la masa seca de mucílago original, la cantidad de ácido acético, alrededor de 7 %, y ácido láctico, alrededor de 5 % en la misma base anterior.

Sin embargo informes recientes también apuestan por un rol importante de los microorganismos en la degradación del mucílago. Se ha resumido la información experimental que confirma la producción de enzimas pectinolíticas por levaduras, las cuales poseen un pH óptimo entre 3.5 y 5.5 (Blanco et al. 1999). Lo anterior coincide con el pH ácido en los tanques de fermentación de café. Más recientemente se han identificado en la fermentación del café, por un lado, bacterias que producen la enzima pectato liasa (Sakayima et al. 2001) y ácidos orgánicos (De Bruyne et al. 2007) y por el otro, cepas de levaduras con actividad de poligalacturonasa en medios ácidos desde 3.0 hasta 5.5 y con un óptimo de temperatura de alrededor de los 40-55 °C (Serrat et al, 2001; Masoud y Jespersen, 2006). Finalmente se encontraron bacterias y levaduras productoras de poligalacturonasa y pectato liasa (Silva et al. 2013) entre las cuales estaban *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Candida parapsilosis*, *Pichia caribbica*, *Pichia guilliermondii* y *Saccharomyces cerevisiae*. Las levaduras mostraron mayor actividad pectinolítica que las bacterias.

A la fecha no se han introducido cambios substanciales en el proceso del beneficio húmedo ni se ha propuesto una reingeniería que permita visualizar un aprovechamiento de los subproductos con el objetivo de aumentar la rentabilidad de la operación. Debe recalarse que cualquier modificación introducida en el proceso no debe incidir en la calidad de la bebida final. Si así lo hiciera dicha modificación no podría ponerse en práctica.

La calidad de una taza de café con frecuencia se asocia al resultado de un análisis organoléptico, aroma y sabor, como características principales, realizado por expertos catadores.

El aroma del café tostado resulta ser una mezcla compleja de más de 800 diferentes compuestos químicos, algunos originalmente presentes en el café verde y una gran mayoría generados durante el proceso térmico del tostado.

Los resultados de los experimentos presentados en este trabajo, de carácter preliminar debido a la reducida cantidad de muestras procesadas, se realizaron con el objetivo de introducir algunas modificaciones en el beneficio de café y observar cambios en la composición química de los compuestos volátiles mayoritarios presentes en el aroma del café tostado. Las modificaciones introducidas al beneficio húmedo tradicional fueron dos: a) despulpado en seco con el objeto de reducir el consumo de agua y b) adición de levaduras durante la fermentación del grano con el objeto de producir un aroma con diferencias a la medida. El despulpado en seco se practica comercialmente en algunos países productores y están disponibles pulperos diseñados para tal fin, de manera que no existen obstáculos técnicos para una implementación más amplia. La adición de levaduras, sin embargo, presenta una situación especial, ya que, si se justificara su uso, una empresa tendría que producir la biomasa de levaduras y distribuirla. La empresa podría constituirse por la gremial de productores.

## Materiales y métodos

### Muestras de café

Se obtuvieron muestras de dos de las ocho regiones productoras en el país. Las muestras fueron San Vicente Pacaya (SVP), Nueva Era (NE), y Nuevo Sendero (NS) de la región de la meseta de Fraijanes, Acatenango (AC) de la región de Acatenango, y Villa Canales (VC) de un beneficio que normalmente procesa café de tres regiones distintas. Como es práctica común en el país las muestras eran mezclas de diferentes variedades de café, *Catuai*, *Caturra*, *Pache* y *Bourbon*. Las muestras de café cereza, aproximadamente 20 Kg sin clasificación previa, se recibieron en un saco de fibra, el cual se almacenó aproximadamente por 18 h a 10 °C antes de procesarse.

### Levaduras utilizadas

Se utilizaron dos levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, CBS-381 and CBS 459 (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands). Las levaduras se crecieron en caldo Sabouraud de 30 g/L de concentración (Merck, 2% glucosa, 0.5% peptona de origen animal, y 0.5% peptona de caseína) mas la adición de 1 % de sacarosa. A un frasco de 250 mL se le adicionaron 125 mL de caldo, se esterilizó a 121 °C por 20 min, se enfrió, se inoculó con la levadura y se colocó en un agitador operado a 250 rpm y 30 °C por 48 h (*Incubator Shaker Lab Companion Model SI-600*). La suspensión se centrifugó a 1600g por 5 min a 10 °C (*Eppendorf Table-top Refrigerated Centrifuge Model 5804R*). El sedimento se suspendió en agua deionizada y se repitió la centrifugación. Se volvió a suspender en agua deionizada



Gráfica 1. Fermentación de café en recipientes abiertos colocados en la cámara de humedad y temperatura controlada.

y se ajustó la densidad óptica a un valor cercano de 2.0 (UV-VIS Spectrophotometer Shimadzu mini 1240).

### Procesamiento del café

El café en cereza se colocó en un recipiente con agua, se agitó y se removieron manualmente los granos flotadores. Luego se despulpó en un pulpero manual sin adicionar agua. Se pesaron alrededor de 2 Kg de grano despulpado en un recipiente de plástico sin tapadera. Los recipientes se colocaron en una cámara (*Forma Environmental Chamber, Thermo Electron Corporation*) de humedad y temperatura controlada a 25 oC y 60 % de humedad relativa por 72 h. Ver Gráfica 1.

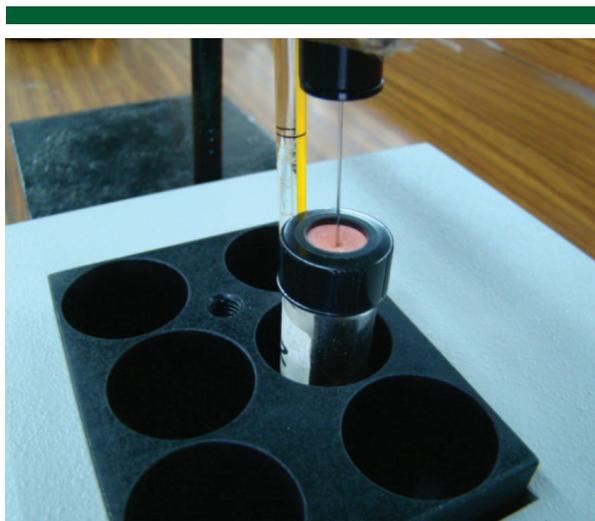
En uno de los recipientes el café fermentó en forma natural, de manera que se empleara como elemento comparativo. Los otros dos recipientes contenían grano despulpado, al cual se le había asperjado la suspensión de levadura correspondiente por medio de un atomizador de pulverización manual accionado con aire comprimido.

Luego de la fermentación los granos de café se lavaron tres veces con 500 mL de agua en un tanque provisto con un agitador mecánico y turbinas de tipo Rushton. El agua se separó en una malla y los granos se secaron expuestos al sol en bandejas de metal. La muestra de café con una humedad entre 10 y 12 % se enviaron al laboratorio de calidad de la Federación de Cooperativas de Café de Guatemala (*Fedecocagua*), en donde removieron el pergamino y tostaron el café a punto de exportación comercial.

Por otro lado, en las aguas de lavado de color pardo característico, se determinaron el pH, los sólidos solubles (Brix), los sólidos totales por evaporación, el etanol y los azúcares residuales. Los azúcares presentes en el café antes de fermentar se determinaron extrayendo con agua granos de café despulpado en la misma proporción café: agua anterior. Los azúcares fueron cuantificados en un cromatógrafo líquido de alta presión (*Agilent 1100 HPLC*) acoplado a un detector de índice refracción (*Agilent 1200*), una columna Hi Plex Ca de 300mm de largo y 7.7 mm de diámetro interno y agua como fase móvil. El etanol, por su parte, fue cuantificado empleando un cromatógrafo de fase gaseosa (*Agilent 6890N*) y una columna DB-624 de 60 m de largo y 0.25 mm de diámetro interno.

## Análisis del aroma

La muestra de café tostado y molido se adicionó a un vial, el cual se colocó en un calentador de bloque (*Talboys Dry Block Heater*) por 15 min a 50 °C. Se introdujo la jeringa conteniendo la fase sólida de adsorción (*Supelco DVB/CAR/PDMS Stableflex 2 cm*) en la fase gaseosa del vial y se dejó por 15 min. Ver Gráfica 2. Se retiró la jeringa y se acopló inmediatamente al puerto de inyección de un cromatógrafo de fase gaseosa *Agilent 6850*, con un detector de masas *Agilent 6975C*, una columna DB-WAX de 60 m de largo y 0.53 mm de diámetro interno, y se dejó por 3 min. Las condiciones de operación fueron: la temperatura inicial de 60°C por 2 min, seguido de un aumento a 3°C/min hasta llegar a 235°C permaneciendo a esa temperatura por 20 min, un flujo de gas de arrastre de 1 mL/min, 250°C en el inyector e interfase a 280°C y el modo *scan* en el detector de masas.



**Gráfica 2.** Adsorción a temperatura constante de los compuestos aromáticos presentes en la fase gaseosa en equilibrio con la bebida

## Análisis de los datos experimentales

El análisis de variancia fue realizado empleando *Stata Versión 9*. El dendograma se elaboró empleando *Systat 11* utilizando la formación de grupos jerárquicos en coordenadas polares unión simple y distancias euclidianas. El análisis de componentes principales se realizó empleando *MVSP Versión 3.1*.

## Resultados

### Fermentaciones

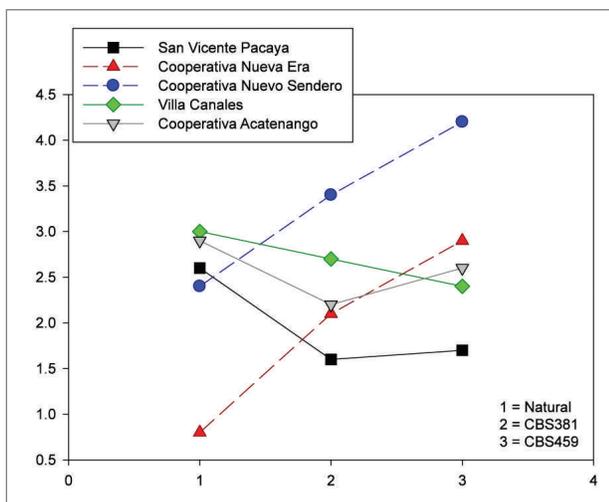
Se encontró que los sólidos totales, la cantidad de etanol producido, y el pH de los líquidos resultantes en las fermentaciones de los granos de café de las muestras no eran diferentes significativamente entre los tres tipos de fermentación realizados o entre las muestras de café. De tal manera que fue posible obtener un valor promedio de todos los ensayos de estos parámetros los cuales se encuentran en el Cuadro 1.

Por otro lado, el Brix (sólidos solubles) y la fructosa residual fueron diferentemente significativos entre las muestras de café ( $p: 0.0513$ ) pero no fueron significativos con respecto al tipo de fermentación ( $p: 0.0952$ ). Como se observa en la Gráfica 3 en dos de las muestras de café (*Cooperativas Nueva Era y Nuevo Sendero*) los sólidos solubles aumentaron cuando se fermentó con la adición de levaduras. Sin embargo, en las otras tres muestras este no fue el caso, de hecho se observó una leve tendencia a disminuir con la adición de levaduras.

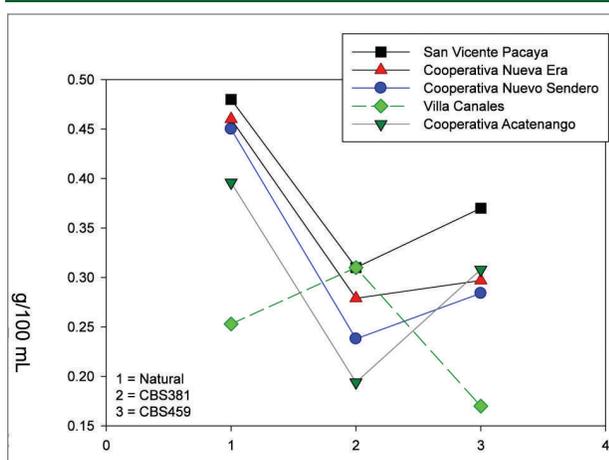
La concentración de fructosa residual fue significativamente diferente entre las muestras de café ( $p: 0.0547$ ), el tipo de fermentación ( $p: 0.0279$ ) pero no en la interacción de ambas ( $p: 0.0868$ ). Los cambios se muestran en la Gráfica 4 y en ella se observa que las fermentaciones con la adición de levaduras disminuyeron la concentración de fructosa residual en el agua de lavado. Es pertinente indicar que en dichas aguas no se

**Cuadro 1.** Valores promedio de los sólidos totales, etanol producido y pH de los líquidos resultantes de la fermentación

Tipo de fermentación	Sólidos totales g/100mL	Etanol g/100mL	pH
Natural	3.82 ± 0.76	0.33 ± 0.25	3.68 ± 0.37
CBS381	4.40 ± 1.32	0.38 ± 0.06	3.92 ± 0.14
CBS459	4.41 ± 1.39	0.32 ± 0.19	3.71 ± 0.31



Gráfica 3. Sólidos solubles en las aguas de lavado para cada variedad y tipo de fermentación.



Gráfica 4. Fructosa residual en las aguas de lavado para cada variedad y tipo de fermentación.

detectó la presencia de sacarosa o de glucosa. La cantidad inicial de estos azúcares al inicio de la fermentación eran: sacarosa  $0.325 \pm 0.09$ , glucosa  $0.216 \pm 0.03$  y fructosa  $0.368 \pm 0.12$ , g/100 mL.

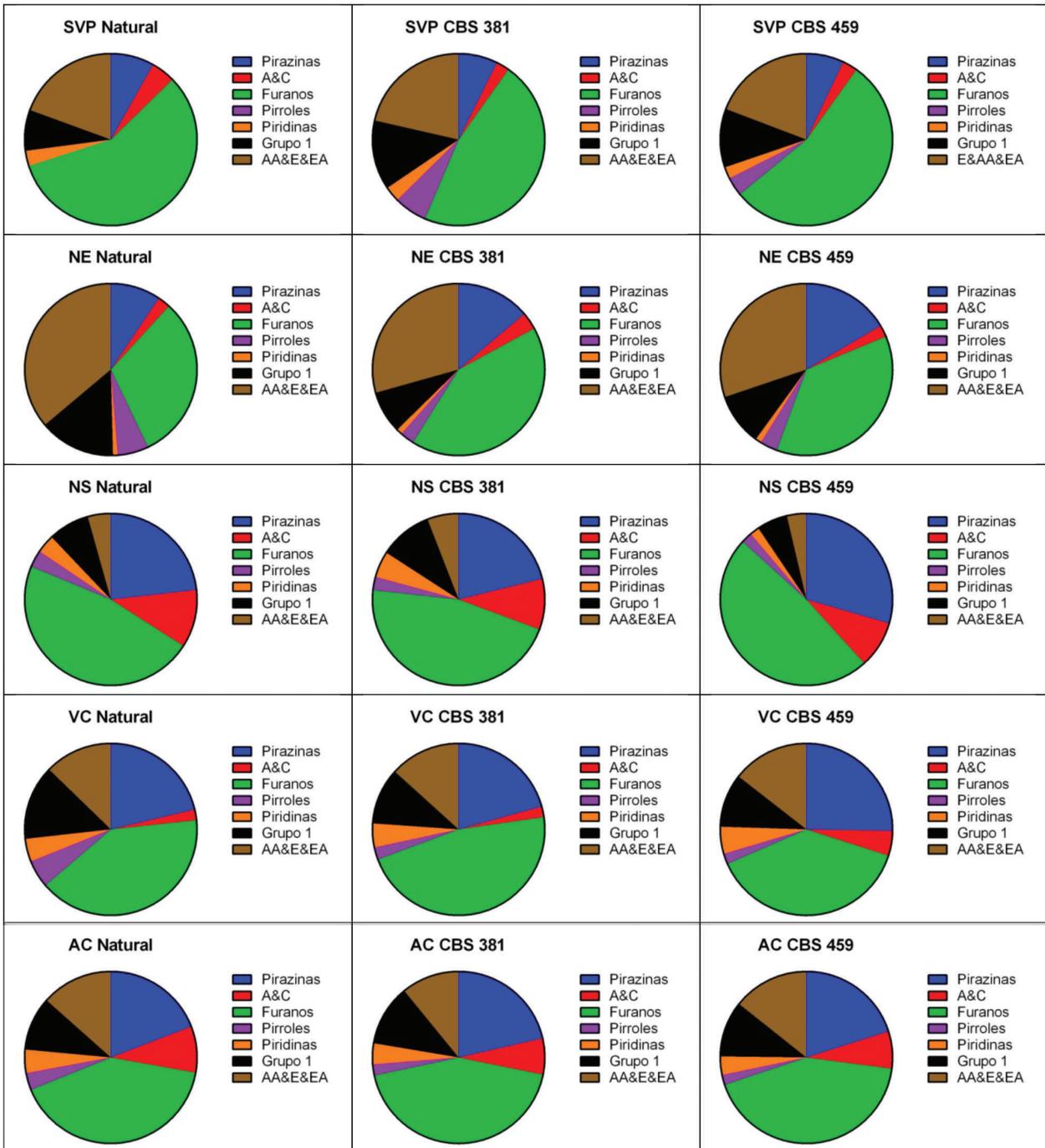
## Análisis del aroma

Los componentes del aroma identificados en todas las muestras fueron 34 los cuales se separaron en seis grupos de acuerdo a su estructura molecular. En el Cuadro 1 se listan los mismos.

Cuadro 1. Componentes del aroma clasificados en diferentes grupos

Grupo (cantidad)	Componentes
Furanos (seis)	Dehidro-2-metil-3(2H)-furanona
	Furfural
	1-(2-Furanil)-etanona
	2 Furan metanol acetato
	5-Metil-2-furancarboxialdehído
	2-Furan metanol
Pirazinas (ocho)	Metil pirazina
	2,5-Dimetil pirazina
	2,6-Dimetil pirazina
	Etil pirazina
	2,3-Dimetil pirazina
	2-Etil-6-metil pirazina
	2-Etil-5-metil pirazina
	3-Etil-2,5-dimetil pirazina
E&AA&EA (tres)	Etanol
	Ácido acético
	Etil acetato
Pirroles (cuatro)	1-Metil-1H-Pirrol-2-carboxialdehído
	1H-Pirrol-1-(2-furanilmetil)
	1-(1H-pirrol-2-etil)-etanona
	1H-Pirrol-2-carboxialdehído
Piridinas (uno)	Piridina
Grupo 1. Misceláneos (seis)	1,2-etanodiol diacetato
	Butirolactona
	3-Metil-acido butanoico
	Metoxi-fenil-oxima
	Maltol
	2-Metoxi-4-vinilfenol
Aldehídos y Cetonas (seis)	2-Metil butanal
	3-Metil butanal
	2,3 Pentanediona
	1-Hidroxi-2-propanona
	1-acetoxi-2-butanona
	2-Hidroxi-3-metil-2-ciclopent-1-ona

La Gráfica 5 muestra una comparación de la proporción de los seis grupos de compuestos del aroma en las cinco muestras de café fermentadas en forma natural y con la adición de levaduras. Esta representación gráfica permite una comparación cualitativa entre los diferentes cafés (filas) y entre los tres tipos de fermentación



Gráfica 5. Diagrama de sectores que muestra la proporción de los seis grupos de compuestos del aroma del café en las diferentes muestras

realizadas (columnas). Por ejemplo, con respecto a las muestras de café se observa que: a) la mayor cantidad de furanos la tuvo el café SVP (San Vicente Pacaya), y la menor el café NE (Nuevo Era), y b) las muestras NS (Nuevo Sendero), VC (Villa Canales) y AC (Acatenango) fueron más ricas en pirazinas que el resto.

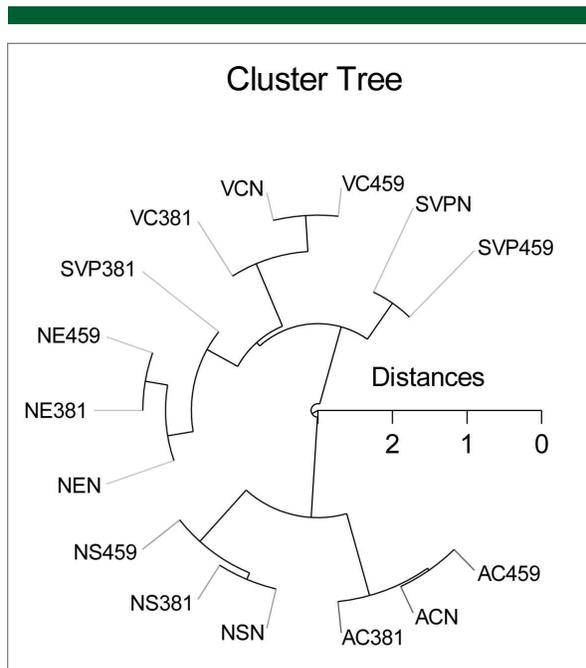
Por otro lado, las diferencias entre las fermentaciones con la adición de levadura y la muestra de fermentación natural, es preciso visualizarlas para cada muestra de café en lo individual. En el café SVP (San Vicente Pacaya), la adición de levaduras provocó la detección en el aroma de pirroles y una mayor

concentración de compuestos del Grupo 1. En el café NE (Nuevo Era), una mayor concentración de furanos y una menor concentración de compuestos del Grupo 1. En el café NS (Nuevo Sendero), una de las levaduras indujo una mayor concentración de pirazinas. En el café VC (Villa Canales), una menor concentración de compuestos del Grupo 1, y en la muestra de una de las levaduras se redujeron los furanos. En el café AC (Acatenango), no se detectaron mayores diferencias.

Las observaciones anteriores son de carácter cualitativo y de las mismas no se obtuvieron patrones de cambio definidos entre las diferentes muestras de café y metodologías empleadas en la fermentación. Es por eso que fue necesario realizar un análisis más extenso de las composiciones del aroma como se presenta a continuación.

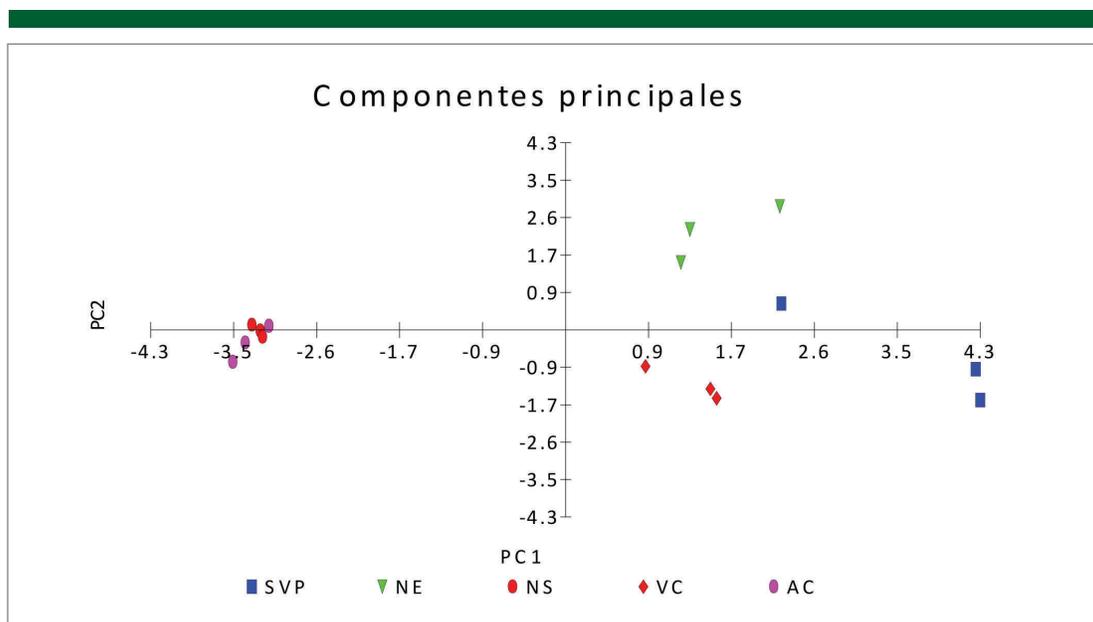
La Gráfica 6 ilustra el resultado gráfico de un análisis de multivariantes de grupos jerárquicos similares obtenido de la matriz de 34 proporciones relativas de los compuestos aromáticos de 15 muestras de café procesadas. La división (*distances*) más significativa originó la formación de dos grupos diferentes: el primero, contenía las muestras de café NS (Nuevo Sendero) y AC (Acatenango) y el segundo, las tres restantes. En una división (*distances*) menos significativa mostró que en ninguna muestra hubo diferencias entre la fermentación natural y las dos fermentaciones a las cuales se les había agregado levadura.

La Gráfica 7 presenta el resultado del análisis de multivariantes de componentes principales obtenido de la matriz de 34 proporciones relativas de los compuestos aromáticos de 15



Gráfica 6. Dendrograma (Cluster tree) obtenido por análisis multivariante de grupos jerárquicos de la matriz de 34 proporciones relativas de los compuestos aromáticos de 15 muestras de café procesadas.

muestras de café procesadas. Se observa lo siguiente: a) el primer componente principal (PC1 eje vertical) separa las muestras de café NS (Nuevo Sendero) y AC (Acatenango) de las demás y b) el segundo componente principal (PC2 eje horizontal) logra separar la muestra NE (Nueva era) de la muestra VC (Villa Canales).



Gráfica 7. Análisis de multivariantes de los dos primeros componentes principales obtenidos de la matriz de 34 proporciones relativas de los compuestos aromáticos de 15 muestras de café procesadas.

## Discusión

El procedimiento empleado en este trabajo en el cual la eliminación de la pulpa se llevó a cabo sin la adición de agua causó un cambio significativo para el proceso posterior de fermentación del grano, ya que la mayor parte del mucílago quedaba envolviendo al grano y retenía la mayoría de los azúcares solubles del mismo. En el proceso húmedo de beneficio tradicional, la eliminación de la pulpa con la adición de agua por el contrario, solubiliza azúcares y otros compuestos, quedando el mucílago asociado al grano compuesto esencialmente de polímeros estructurales.

Es probable que el procedimiento empleado entonces, haya sido la razón de haber obtenido una mayor concentración de etanol en el agua de lavado. La producción de etanol promedio para todas las muestras de café fue de 1.33, 1.75 y 1.36 g/kg de café para el tipo de fermentación natural, con adición de CBS 381, y con adición de CBS459, respectivamente. Valores de producción de etanol de 0.64 a 1.19 g/L han sido reportados por Silva et al. (2013), los cuales son valores bajos comparados con los de este trabajo que estuvieron entre 1.1 a 6.1 g/L. Es importante recalcar que no hubo una mayor producción de etanol en las pruebas con adición de levaduras, lo cual indica que en la población nativa de microorganismos de las muestras de café había presencia de levaduras criollas. Por otro lado, es posible que la adición de levaduras haya acelerado la fermentación del mucílago, sin embargo entre los objetivos experimentales no se planificaron experimentos de esta índole.

El pH final promedio para todas las muestras de café fue de 3.68, 3.92 y 3.71 para el tipo de fermentación natural, con adición de CBS 381, y con adición de CBS459, respectivamente. Tales valores coinciden con las reportadas por otros investigadores Avallone et al. (2001a; 2001b; 2002). La producción de ácidos orgánicos resulta del crecimiento bacteriano y los principales ácidos que han sido identificados son el ácido láctico y el acético Avallone et al. (2001a).

Durante la fermentación se consumieron en su totalidad la sacarosa y la glucosa iniciales pero no la fructosa, coincidiendo con aquellos resultados previamente informados al respecto Avallone et al. (2001a). Sin embargo, se observó que las fermentaciones con la adición de levaduras disminuyeron la concentración de fructosa residual en el agua de lavado. Lo anterior significa que las levaduras criollas poseen sistemas de transporte de la fructosa limitados.

En este trabajo se midieron temperaturas a las 24 h en los tres tipos de fermentación empleados, obteniendo valores entre 28 y 30 °C. Estas estuvieron en el mismo rango a las reportadas por Correa et al. (2014) en recipientes de plástico conteniendo

aproximadamente 10 veces más café que el empleado en este trabajo. Sin embargo hicieron ver que la temperatura no solo descendía con respecto al tiempo de fermentación, sino que era consistentemente menor en el fondo del tanque.

Se han identificado alrededor de 900 compuestos orgánicos volátiles en el aroma del café tostado (Bufo y Cardelli-Freire, 2004; Yeretzian et al. 2004). Estos compuestos presentan una amplia diversidad de estructuras químicas y están presentes en pequeñas concentraciones. Sin embargo, únicamente una minoría de compuestos orgánicos volátiles son los principales responsables de impartirle al café el aroma único que lo acompaña. A estos compuestos se les denominó *fragancias clave* "key odorants" (Semmelroch et al. 1995; Semmelroch y Grosch, 1996).

El análisis de multivariantes empleando varias técnicas llevado a cabo con las concentraciones relativas de los compuestos aromáticos de las diferentes muestras de café indicó que: a) las muestras de café NS (Nuevo Sendero) y AC (Acatenango) eran diferentes a las tres restantes, b) en ninguna muestra hubo diferencias significativas entre la fermentación natural y las dos fermentaciones a las cuales se les había agregado levadura, c) los furanos fueron los componentes mayoritarios del aroma, y d) las muestras NS (Nuevo Sendero), VC (Villa Canales) y AC (Acatenango) fueron más ricas en pirazinas que el resto.

Debido a que las fragancias del café se originan durante el tostado del grano verde y se generan de los macro constituyentes del mismo era de esperar que hubiesen cambios en las fragancias generadas en las cinco muestras de café procesadas, las cuales eran de diferente origen y posiblemente de mezclas diferentes de variedades de café. También, esperábamos encontrar diferencias entre las muestras del aroma de las fermentadas naturalmente y aquellas a las que se les adicionaron levaduras. Sin embargo, no fue así, si hubo diferencias en las proporciones, fueron de menor cuantía y no se incrementaron substancialmente algunos grupos de compuestos como aldehídos, cetonas o ésteres. Esta observación no coincide con los datos de Pereira et al. (2014) quienes encontraron que al adicionar levaduras aisladas por ellos durante la fermentación del grano podían detectarse en la bebida mayores acentos en ciertas propiedades como por ejemplo un sabor dulce similar a frutas que correspondía a una mayor concentración en el aroma de aldehídos y ésteres. Los autores sugerían que de esta manera era posible producir tipos de café a la medida. Por lo tanto es una posibilidad comercialmente atractiva, pero la ciencia y la tecnología detrás de la misma apenas se está iniciando.

Las muestras procesadas de la Cooperativa Acatenango con adición de levaduras fueron catalogadas como *sanas* en cuanto a la apreciación organoléptica de la *taza*. Igual calificación obtuvo la muestra de Villa Canales con adición de la levadura

**Cuadro 2.** Presencia de fragancias clave (celda sombreada) en las diferentes muestras de café procesadas

Compuesto	Nueva Era	Nuevo Sendero	Villa Canales	Acatenango
2-Metil propanal				
2-metil-butanal				
3-Metil-butanal				
2,3 Pentanediona				
3-Etil-2,5-dimetil pirazina				
2,5-Dimetil-4-hidroxi-3(2H)-furanona				

CBS459 y la muestra de la Cooperativa Nueva Era en fermentación natural.

Las muestras de Acatenango fueron las que tuvieron mayor cantidad de fragancias claves en su aroma como se detalla en el Cuadro 2 por lo que se vislumbra una correlación cualitativa entre la mayor cantidad de fragancias clave y la evaluación organoléptica de una taza sana.

## Conclusiones

El proceso de eliminación de la pulpa en seco conservó en el mucílago adherido al grano de café los azúcares solubles. Estos compuestos fueron transformados por la flora microbiana natural principalmente en etanol, ácidos orgánicos, CO<sub>2</sub> y agua. La sacarosa y la glucosa inicialmente presentes fueron transformadas totalmente, no así la fructosa la cual se degradó en forma parcial. Sin embargo, la adición de levaduras al inicio de la fermentación estimuló el consumo de la fructosa. La cantidad de etanol producida y detectada en las aguas de lavado no varió significativamente entre las cinco muestras de café, ni tampoco en aquellas fermentaciones en donde se adicionaron levaduras al inicio de la fermentación, por lo que indirectamente se comprobó la presencia de levaduras en la flora microbiana natural. El análisis de multivariantes del aroma empleando varias técnicas llevado a cabo con las concentraciones relativas de los compuestos aromáticos de las diferentes muestras de café indicó que: a) las muestras de café NS (Nuevo Sendero) y AC (Acatenango) formaban un grupo diferente a las tres restantes, b) en ninguna muestra hubo diferencias significativas entre la fermentación natural y las dos fermentaciones a las cuales se les había agregado levadura, c) los furanos fueron los componentes mayoritarios del aroma, y d) las muestras NS (Nuevo Sendero), VC (Villa Canales) y AC (Acatenango) fueron más ricas en pirazinas que el resto. Las muestras de Acatenango

fueron las que tuvieron mayor cantidad de fragancias claves en su aroma y fueron catalogadas como sanas en cuanto a la apreciación organoléptica de la taza.

## Agradecimiento

La experimentación descrita en el artículo fue parte del proyecto FODECYT 029-2013; se reconoce el financiamiento parcial otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONCYT y el apoyo administrativo de la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología, SENACYT.

## Bibliografía

- Agate, A.D., Bhat, J.V. (1996) Role of Pectinolytic Yeasts in the Degradation of Mucilage Layer of *Coffea robusta* Cherries Appl Microbiol 14: 256-260.
- Avallone, S., Guiraud, J.P., Guyot, B., Olguin, E., Brillouet, J.M. (2000) Polysaccharide constituents of coffee bean mucilage J Food Sci 65: 1308-1311.
- Avallone, S., Guyot, B., Brillouet, J.M., Olguin, E., Guiraud, J.P. (2001a) Microbiological and Biochemical Study of Coffee Fermentation Curr Microbiol 43: 252-256.
- Avallone, S., Guiraud, J.P., Guyot, B., Olguin, E., Brillouet, J.M. (2001b) Fate of mucilage cell wall polysaccharides during coffee fermentation J. Agr. Fod. Chem. 49: 5556-5559.
- Avallone, S., Brillouet, J., Guyot, B., Olguin, E., Guiraud, J.P. (2002) Involvement of pectolytic micro-organisms in coffee fermentation Internat J Fd Sci Technol 37: 191-198.
- Blanco, P., Steiro, C., Villa, T.G. Production of pectic enzymes in yeasts (1999) FEMS Microbiol Lett 175: 1-9.
- Buffo, R.A., Cardelli-Freire, C., (2004) Coffee flavour: an overview Flavour Fragr J 19: 99-104.

- Correa, E.C., Jiménez-Ariza, T., Díaz-Barcos, V., Barreiro, P., Diezma, B.R., Oteros, R., Echeverri, C., Arranz, F.J., Ruiz-Altisent, M. (2014) *Advanced Characterisation of a Coffee Fermenting Tank by Multi-distributed Wireless Sensors: Spatial Interpolation and Phase Space Graphs* *Fd Bioproc Technol* 7: 3176-3174.
- De Bruyne, K., Schillinger, U., Caroline, L., Boehringer, B., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., De Vuyst, L., Franz, C.M.A.P., Vandamme, P. (2007) *Leuconostoc holzapfelii* sp. nov., isolated from Ethiopian coffee fermentation and assessment of sequence analysis of housekeeping genes for delineation of *Leuconostoc* species *Internat J Syst Evolut Microbiol* 57: 2952-2959.
- Bonnin, E., Garnier, C., Rolet, M.C. (2014) *Pectin-modifying enzymes and pectin-derived materials: applications and impacts* *Appl Microbiol Biotechnol* 98:519-532.
- Espinosa, R., de Cabrera, S. Maldonado, O., Rolz, C., Menchú, J.F., Aguirre, F. (1976) *Protein from waste. Growing fungi on coffee waste* *Chem Tech* 6 (10): 636-642.
- García, R., Arriola, D., de Arriola, M.C., de Porres, E., Rolz, C. (1990) *Characterization of coffee pectin* *Lebensm Wiss u Technol* 24:125-129.
- Masoud, W., Jespersen, L. (2006) *Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of Coffea arabica in East Africa* *Int J Fd Microbiol* 110: 291-296.
- Menchú, J.F., Rolz, C. (1973) *Coffee fermentation technology* *Café, Cacao, The* 17 (1): 53-61.
- Pereira, G.V.M., Socol, V.T., Pandey, A., Medeiros, A.B.P., Lara, J.M.R.A., Gollo, A.L., Socol, C.R. (2014) *Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process* *Int J Fd Microbiol* 188: 60-66.
- Richard, P., Hilditch, S. (2009) *D-Galacturonic acid catabolism in microorganisms and its biotechnological relevance* *Appl Microbiol Biotechnol* 82: 597-604.
- Sakayima, C.C.H., Paula, E.M., Pereira, P.C., Borges, A.C., Silva, D.G. (2001) *Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries* *Lett Appl Microbiol* 33: 117-121.
- Semmelroch, P., Laskawy, G., Blank, I., Groscht, W. (1995) *Determination of Potent Odourants in Roasted Coffee by Stable Isotope Dilution Assays* *Flavour Fragr J* 10: 1-7.
- Semmelroch, P., Grosch, W. (1996) *Studies on Character Impact Odorants of Coffee Brews* *J Agric Food Chem* 44: 537-543.
- Serrat, M., Bermudez, R.C., Gonzales-Villa, T. (2002) *Production, Purification, and Characterization of a Polygalacturonase from a New Strain of Kluyveromyces marxianus Isolated from Coffee Wet-Processing Wastewater* *Appl Biochem Biotechnol* 97: 193-208.
- Silva, C.F., Schwan, R.F., Diaz, E.S., Wheals, A.E. (2000) *Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of Coffea arabica in Brazil* *Internat J Fd Microbiol* 60: 251-260.
- Silva, C.F., Batista, L.R., Abreu, L.M., Diaz, E.S., Schwan, R.F. (2008) *Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (Coffea arabica) fermentation* *Fd Microbiol* 25: 951-957.
- 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 J Microbiol Biotechnol* 29:235-247.
- Vilela, D.M., Pereira, G.V.M., Silva, C.F., Batista, L.R., Schwan, R.F. (2010) *Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (Coffea arabica L.)* *Fd Microbiol* 27: 1128-1135.
- Yeretizian, C., Jordan, A., Badoud, R., Lindinger, W. (2003) *From the green bean to the cup of coffee: investigating coffee roasting by on-line monitoring of volatiles* *Eur Food Res Technol* 214: 92-104.