

**Investigación Original****Identificación de levaduras nativas en café Geisha (*Coffea arabica*) y su efecto como cultivo iniciador en las características sensoriales y químicas de café lavado**Gisselle Aimeth Castillo Avilés [gisselle.castillo.2023@alumni.zamorano.edu](mailto:gisselle.castillo.2023@alumni.zamorano.edu)

Estudiante de pregrado  
Departamento de Agroindustria Alimentaria  
Escuela Agrícola Panamericana Zamorano  
Honduras

Tina Antje Hofmann [tina.hofmann@unachi.ac.pa](mailto:tina.hofmann@unachi.ac.pa)

Investigadora  
Centro de Investigaciones Micológicas (CIMi)  
Herbario UCH, Universidad Autónoma de Chiriquí (UNACHI)  
Panamá

Jorge Cardona [jcardona@zamorano.edu](mailto:jcardona@zamorano.edu)

Profesor Asociado  
Departamento de Agroindustria Alimentaria  
Escuela Agrícola Panamericana Zamorano  
Honduras

Historial del artículo:

Recibido noviembre 3, 2023. Aceptado febrero 8, 2023. Publicado junio 30, 2024.

Cómo citar: Castillo Avilés, G. A., Hofmann, T. A., Cardona, J. 2024. Identificación de levaduras nativas en café Geisha (*Coffea arabica*) y su efecto como cultivo iniciador en las características sensoriales y químicas de café lavado. Ceiba, 57(1),29-50. doi: 10.5377/ceiba.v57i1.18140

**Resumen.** La calidad especial del café Geisha ha llevado a investigar y mejorar sus atributos sensoriales a través de fermentación. El objetivo de este estudio fue identificar levaduras nativas en café Geisha, aislarlas y evaluar su potencial para mejorar calidad sensorial y química en procesos de fermentación asistida. El estudio se desarrolló en tres fases, identificando levaduras (1); aislamiento y utilización en procesos de fermentación en comparación con inóculo comercial (2); y evaluación de la composición química y capacidad antioxidante del café resultante (3). Las levaduras se identificaron mediante observaciones macro y microscópicas, con mediciones de pH y grados Brix y se seleccionaron dos levaduras para compararlas con una levadura comercial. Además, se llevaron a cabo evaluaciones sensoriales y análisis químicos. Se identificaron 13 morfoespecies de levaduras en el café Geisha pertenecientes a seis géneros (*Pichia*, *Candida*, *Sporobolomyces*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces* y *Rhodotorula*), siendo el género *Pichia* sp. el más abundante. Luego, se seleccionaron dos levaduras nativas del café Geisha (*Pichia* y *Saccharomyces*) para su cultivo e inoculación en café lavado Geisha en comparación con un inóculo control (cepa optimizada de *Saccharomyces cerevisiae*). El análisis sensorial reveló que todas las muestras eran consideradas de

especialidad (>90 puntos) con las puntuaciones más altas para inóculo control e inóculo nativo 1 (*Pichia spp*). Algunos atributos sensoriales incluyeron notas cítricas y afrutadas. A pesar de no ser inoculado, *Candida sp.* se observó en el café lavado Geisha evaluado. Finalmente, no se demostraron diferencias en contenido de flavonoides, polifenoles totales y actividad antioxidante.

**Palabras Clave:** caracterización macroscópica, catación, fermentación, inoculación

## Identification of native yeasts in Geisha coffee (*Coffea arabica*) and their effect as starter culture on the sensory and chemical characteristics of washed coffee

**Abstract.** The special quality of Geisha coffee has led to research and improvement of its sensory attributes through fermentation. The aim of this study was to identify native yeasts in Geisha coffee, isolate them, and assess their potential to enhance sensory and chemical quality in assisted fermentation processes. The study was conducted in three phases: identification of yeast species (1); isolation and use in fermentation processes compared to commercial inoculum (2); and evaluation of the chemical composition and antioxidant capacity of the resulting coffee (3). Yeasts were identified through macro and microscopic observations, pH and Brix measurements, and two yeasts were selected for comparison with commercial yeast. Sensory evaluations and chemical analyses were also conducted. Thirteen yeast morphospecies were identified in Geisha coffee belonging to six genera (*Pichia*, *Candida*, *Sporobolomyces*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, and *Rhodotorula*), with the genus *Pichia sp.* being the most abundant. Subsequently, two native yeasts from Geisha coffee (*Pichia* and *Saccharomyces*) were selected for cultivation and inoculation in washed Geisha coffee, comparing them with a control inoculum (optimized strain of *Saccharomyces cerevisiae*). Sensory analysis revealed that all samples were considered specialty grade (>90 points), with the highest scores for the control inoculum and native inoculum 1. Some sensory attributes included citrusy and fruity notes. The *Candida sp.* was observed in the evaluated washed Geisha coffee despite not being inoculated. Finally, no differences were demonstrated in flavonoid content, total polyphenols, and antioxidant activity.

**Keywords:** macroscopic characterization, cupping, fermentation, inoculation

---

### Introducción

El café ocupa el segundo lugar dentro de la lista de los productos más vendidos en el mundo (Tucker, 2018). Es por esto que, en busca de la diferenciación, la industria ha introducido la producción de cafés especiales siendo un ejemplo de ello, el café Geisha (Guimarães et al., 2016). Esta variedad de café es comúnmente producida en Panamá, en donde se ha vuelto una variedad de alto valor para el ámbito de la exportación.

La calidad de este café, depende en gran manera de un buen proceso postcosecha, es allí

donde surge la fermentación (Vaughan et al., 2015). Durante este proceso, el café adquiere su perfil sensorial distintivo, además de que se produce la degradación del mucílago del café (Haile y Kang, 2019c). Esto gracias a las levaduras que, en conjunto con otros microorganismos, trabajan para producir metabolitos de relevancia en la obtención de estos aspectos sensoriales.

Actualmente, la industria utiliza levaduras comerciales, como es el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, que ha sido optimizada para su uso en el procesamiento del café. Por otro lado, existen ocasiones en las que

se permite que ocurra la fermentación espontánea. Sin embargo, esto último, no permite la estandarización del producto debido a una falta de identificación de microorganismos claves (Haile y Kang, 2019b; Elhalis et al., 2021). Es por ello que, la búsqueda de levaduras específicas se ha vuelto un foco importante para la calidad del café y su valor comercial.

Este proceso se realiza comúnmente estudiando la microbiota natural del café, esto a través del aislamiento de los microorganismos presentes ya sea en el propio fruto recién cosechado, o muestreando el líquido producido durante la fermentación. Para caracterizar las levaduras, normalmente, se realiza secuenciación genética (Pereira et al., 2022), también análisis morfológicos (colonia, células, formación de la spora) y bioquímicos (fermentación de diferentes fuentes de carbono) (Vilela et al., 2010). Debido a que el proceso natural del café es un método reciente de aplicación en la industria, no existen estudios reportados sobre el aislamiento de levaduras durante el mismo. Sin embargo, se han realizado aislamientos en Brasil desde el café despulpado (lavado) haciendo muestreos cada 8 horas del líquido que se genera en la parte media del tanque durante la fermentación aeróbica (Pereira G et al., 2014).

De acuerdo con estudios previos, se ha demostrado que el uso de levaduras como *Candida* y *Torulospira* como cultivos iniciadores brindan puntajes altos en la taza (Pereira et al., 2018). Esto se refleja de igual manera con Elhalis et al. (2021) donde se demostró que estos microorganismos producían percepciones sensoriales distintas, como es el caso de aromas y sabores frutales. De igual forma, Haile y Kang (2019c) mencionan que levaduras como *Pichia fermentans*, *Candida parapsilosis* y *Saccharomyces* sp. tienen la capacidad de producir altos puntajes en percepciones frutales, vainilla, caramelo, herbales y aromas florales.

Por otro lado, los análisis de flavonoides, polifenoles totales y la actividad antioxidante, podrían tener un impacto en la inoculación de café. Esto debido a que su actividad podría indicar la presencia de ácidos orgánicos (ácido cítrico, málico, láctico) y clorogénicos que forman parte esencial en las distintas notas sensoriales obtenidas al final del procesamiento del café (Bressani et al., 2020).

## Propósito/Objetivos

Teniendo como importancia la innovación y optimización de los procesos postcosecha, buscando beneficios económicos de un producto de agrado para el mercado meta, se tienen como objetivos aislar e identificar las levaduras con mayor presencia en el proceso natural del café Geisha, además, evaluar el comportamiento de las levaduras nativas como cultivo iniciador en el procesamiento del café lavado Geisha y su efecto en las características sensoriales. Y, por último, determinar cambios químicos que puedan generar las levaduras nativas en el café Geisha.

## Métodos

### Área del estudio

El proyecto fue realizado en Hacienda La Esmeralda, Palmira, Boquete, Panamá. Los análisis microbiológicos se realizaron en la Universidad Autónoma de Chiriquí (UNACHI) localizada en David, Chiriquí, Panamá. Además, se realizaron análisis químicos en el Laboratorio de Análisis de Alimentos (LAAZ), del Departamento de Agroindustria Alimentaria en la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano en Honduras.

### Fase I. Aislamiento e identificación de levaduras

*Obtención de muestras.* Se utilizó café arábico, variedad Geisha, ubicado a una altura de 1600 msnm en las siguientes coordenadas

8°47'03"N 82°25'05"W provenientes de Hacienda La Esmeralda S.A. El café fue cosechado en su plena etapa de madurez y se seleccionaron los frutos viables. Luego, estos se llevaron directamente a fermentación mediante el proceso natural anaeróbico, en un tanque de acero inoxidable, durante tres días a una temperatura ambiente promedio de 25 °C. Para obtener datos sobre la población micológica en el fruto recién cosechado, siguiendo la metodología de Elhali, Cox, Frank y Zhao (2020) con ligeros cambios. Se diluyeron 25 g de café uva con 225 ml de agua peptonada manteniendo la relación 1:10 para diluciones. Se recolectaron muestras de mosto del día 1, día 2 y día 3 de la fermentación, las cuales fueron transportadas en hielera al laboratorio. Asimismo, se tomaron muestras durante las primeras 61 horas de secado, para determinar la sobrevivencia de estas en todo el proceso.

*Recuento e identificación morfológica de levaduras.* Se realizó un recuento de levaduras según los procedimientos o metodologías descritas por (FDA, 1998; Tournas et al., 1998; Salfinger y Tortorello, 2015; Andrews y Hammack, 2022) con ciertas variaciones, se utilizó como diluyente agua de peptona y el medio de cultivo fue agar extracto de levadura glucosa cloranfenicol (YGC). Se realizaron diluciones seriales desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$  y se realizó el conteo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994 de la Secretaría de Salud et al. (1994). Además, de las diluciones seriales, se tomaron  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  para realizar los aislamientos por triplicado. Los mismos fueron llevados a incubación a temperatura ambiente, con revisiones diarias. En búsqueda de identificar estas levaduras, se traspasaron todas las morfo especies que macroscópicamente parecían distintas a un nuevo plato Petri utilizando el método de estriado por cuadrante, tomando aspectos como forma, elevación, consistencia, borde, textura, color, transparencia y brillo, esto con el objetivo de obtener cepas puras en medios YGC para ser

caracterizados. Además, se realizaron análisis microscópicos para caracterizar las células por forma, tamaño, color, ornamentación, gemación y presencia de pseudohifas. De esta manera y consultando fuentes de literatura, las cepas fueron identificadas hasta nivel de géneros (Martins et al. 2022).

*Fase II. Comportamiento de las levaduras nativas como cultivo iniciador y su efecto sensorial*

*Reproducción de levaduras.* Se identificaron aquellas levaduras que posiblemente pudieran aportar a las características organolépticas del café siguiendo literatura previa (hidrólisis de pectina, producción de compuestos volátiles, aportes sensoriales positivos previos) (Evangelista S et al., 2013; Silva et al., 2013). Luego, se seleccionaron dos y se llevaron a reproducir siguiendo la metodología de Martínez et al. (2019), en la cual utilizaba medio líquido extracto de levadura peptona glucosa (YEPG). Para este caso, se eligieron dos de las levaduras nativas las cuales fueron reproducidas durante 48 h en matraces Erlenmeyer con 60 ml de YEPG líquido en un agitador orbital, luego se centrifugaron y, se suspendieron en agua destilada estéril en tubos de centrifugación de 15 ml, se llevaron a los baldes de fermentación para su inoculación según correspondía.

*Manejo del café.* Es importante aclarar que esta fase es distinta a la mencionada en la Fase I, debido que la empresa no utiliza levaduras comerciales en el café natural anaeróbico y para hacer las pruebas de las levaduras seleccionadas, se requería tener un control. Es decir que normalmente el café natural se encuentra en su estado puro, mientras que el lavado pasa por previa inoculación. Además, es relevante mencionar que en esta etapa existe un diseño experimental, por lo tanto, se requería cambiar el medio de fermentación (recipientes). Dicho esto, para esta fase se utilizó café arábica, variedad Geisha

ubicado a una altura de 1600 m s.n.m. en las siguientes coordenadas 8°45'44"N 82°29'24"W. Se preparó café lavado que pasó por la despulpadora de la marca Pinhalense® con zaranda, para llevar 1.7 kg de café a fermentación aeróbica en recipientes plásticos de 9.5 litros (nueve recipientes para nueve unidades experimentales), los cuales fueron situados en la sala de fermentación de la empresa. Listo el café en los recipientes, se inocularon 20 ml de células en agua destilada de cada una de las levaduras escogidas. Colocando un tratamiento control, el cual sería la levadura comercial fabricada en Canadá (Lalcafé ORO), utilizada por la empresa. La fermentación llevó un tiempo de tres días, con recuentos de levaduras al inicio y al final de la fermentación. Así mismo, se colocó el café en mezcladores de aproximadamente 50 cm x 50 cm para el secado (marco de madera con malla de metal) durante 10 días. Es importante señalar que, durante este proceso, el clima de la zona se encontraba lluvioso, por lo que se tomó la decisión de situar el café en la parte superior de las camas elevadas en invernadero que llegaba a una temperatura promedio de 40 °C, para un secado más rápido. En esta etapa, se tomó recuento de levaduras durante el quinto y octavo día.

*Diseño experimental.* Para este estudio se determinó que el género más predominante fue *Pichia* sp. La investigación se llevó a cabo con tres tratamientos, un tratamiento inoculado con levadura nativa 1, el segundo tratamiento con levadura nativa 2 y el control, el inóculo comercial. Adicionalmente se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento, obteniendo un total de nueve unidades experimentales. Se aplicó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con medidas repetidas en el tiempo. La toma de datos de cada una de las unidades experimentales se realizó durante cuatro días, en la fermentación (día 0 y 3) y el secado (día 5 y 8).

*Recuento y abundancia relativa de las levaduras.* Siguiendo la metodología explicada

en la Fase I: Aislamiento e identificación de levaduras, se realizó el recuento en placa de levaduras para cada día unidad experimental con el uso de un fondo cuadrículado y marcador. Además, con el fin de identificar la abundancia relativa de las poblaciones inoculadas durante los diferentes días de fermentación, se determinaron aspectos macroscópicos como la forma, elevación, consistencia, borde, textura, color, transparencia y brillo. Esto consistió en hacer el recuento total de las colonias, y una vez se diferenciaron los géneros presentes, se contaron las colonias por género y mediante la siguiente fórmula [1] se calculó el porcentaje de abundancia relativa:

$$[1] \text{ Abundancia Relativa (\%)} = \frac{\text{Número total de géneros individuales}}{\text{Número total de población de géneros}} * 100$$

*Análisis sensorial.* Las muestras se dejaron reposando dos semanas luego de su último día de secado y se llevaron a trillar en una descascaradora de muestras de café para laboratorio de la marca Pinhalense® modelo DRC fabricado en Espírito Santo do Pinhal, Brasil, esto para obtener 120 g de cada unidad experimental. Veinticuatro horas antes de la catación, en una tostadora de muestras Probat BRZ fabricada en Niedersedlitzer, Alemania, se colocaron 120 g de café oro y siguiendo el perfil de tostados para café especial, se tostó durante un promedio de 10 minutos cada muestra, con un temperatura de tostado inicial promedio de 277 °F (136 °C) y una temperatura final promedio de 419 °F (215 °C) con el objetivo de llevar el grano a 58 Agtrons según la escala del M-Basic Agtron, esto de acuerdo con las recomendaciones SCA para procesos de catación. Una vez realizado el tueste, se cubrieron las muestras para reducir la exposición al aire. Se tomó como referencia el protocolo del SCAA (2015) para ejecutar la catación, por ello, la puntuación fue realizada en una escala de 6 a 10 puntos, en donde cada incremento a favor de cierto atributo, se le sumaba 0.25 puntos. Además de que se evaluó

el aroma, sabor, regusto, acidez, cuerpo, balance, en frío y el puntaje final. Por motivos de privacidad de la empresa, solo hubo dos catadores Q-Grader certificados por el SCA, género masculino y femenino, ambos con más de 10 años de experiencia en el área.

### *Fase III. Efecto de las levaduras nativas en las características químicas del café*

*Análisis químicos.* Por motivo de logística se tomaron los dos tratamientos con mejores evaluaciones sensoriales. Para analizar flavonoides y polifenoles totales, se utilizó espectrofotometría UV/VIS. Debido a que estos análisis fueron realizados en la Escuela Agrícola Zamorano, Honduras, todos estos análisis se realizaron a partir del café tostado para evitar tener conflictos con aduana por el transporte aéreo del café verde desde Panamá a Honduras.

Con el uso de la metodología de Jeszka-Skowron et al. (2016) con ciertas modificaciones, para la preparación del extracto acuoso que sería utilizado para todos estos análisis, se molieron los granos tostados. Luego, se pesó un gramo del café en tubos cónicos de centrifugación y se añadieron 50 ml de agua destilada a 90 °C, manteniendo esta temperatura por 10 minutos con ayuda de baño maría. Luego, se centrifugó el extracto a 3500 rpm durante 5 minutos. Seguido de esto, el sobrenadante se filtró a través papel filtro de café Walton & Post, fabricado en Miami, Florida, Estados Unidos.

*Flavonoides totales.* Con la metodología de Zhishen et al. (1999) se prepararon dos soluciones: solución A conformada por 1.8 ml de nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ) al 5 % más 24 ml de agua desionizada y la solución B conformada por 12 ml de hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) a 1M más 14.4 ml de agua desionizada. Luego, se extrajeron 600  $\mu\text{L}$  del extracto acuoso de cada muestra de café tostado. Muestra a la cual se le añadió 2.58 ml de la solución A, dejándola

reposar 5 min y donde luego se le agregó 180  $\mu\text{L}$  de cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) al 10%. Tras un período de 1 min de reposo, se le adicionó 2.52 ml de la solución B. Muestras que, por último, se leyeron en el espectrofotómetro UV/VIS (Cary 8454, Agilent Technologies, EUA) a 415 nm. Los resultados de estos análisis fueron expresados en mg de equivalentes de catequina por gramo de café tostado. La curva estándar fue realizada con las concentraciones de 50, 200, 400, 600 y 1000 ppm ( $R^2=0.9996$ ), disueltos en agua desionizada.

*Polifenoles totales.* Con la metodología de Singleton et al. (1999) y Wolfe et al. (2003) se mezclaron 60  $\mu\text{L}$  de extracto acuoso con 3 ml de agua destilada y 250  $\mu\text{L}$  del reactivo Folin-Ciocalteu's (1 N) (Sigma-Aldrich, Co., MO, EE.UU.). Luego, se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente y se procedió a añadir 750  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 20% y 950  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Terminado este procedimiento, se dejó equilibrar por 30 min a temperatura ambiente y se procedió a realizar la lectura en un espectrofotómetro UV/VIS (Cary 8454, Agilent Technologies, EE.UU.) a 765 nm. Los resultados fueron expresados en mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de café tostado. La curva estándar fue realizada con concentraciones de 100, 200, 300, 400, 500, 700 y 1000 ppm disueltos en agua desionizada obteniendo un  $R^2=0.9954$ .

*Actividad antioxidante.* Con el fin de determinar la actividad antioxidante de los extractos de café se midió la reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Esto, a través de la adaptación del método utilizado por Trandafir et al. (2013) y Ricci et al. (2019). Se elaboró una solución de DPPH al 0.004 %. Luego, a 2.50 ml de solución metanólica de DPPH, se le adicionó 50  $\mu\text{L}$  del extracto acuoso de café y se diluyó con un factor de dilución de 250. Luego, se agitó vigorosamente, se dejó incubar por media hora a 27 °C y se llevó al espectrofotómetro UV/VIS a 517 nm. Además, se preparó una curva de

calibración de ácido gálico disuelto en agua desionizada de 10, 20, 30, 60, 90 ppm ( $R^2 = 0.9962$ ). Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de café. Para finalmente determinar la actividad antioxidante utilizando la siguiente fórmula [2].

$$[2] \text{ Porcentaje de inhibición} = \frac{(\text{Absorbancia inicial de DPPH 0 min} - \text{Absorbancia final a 30 min})}{\text{Absorbancia inicial de DPPH 0 min}} * 100$$

**Análisis estadístico.** Los resultados de los análisis microbiológicos y sensoriales se analizaron con el programa SAS OnDemand for Academics®. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) con  $p \leq 0.05$  y una separación de medias Ls-means. Por otro lado, los resultados de los parámetros químicos se analizaron con la media de los datos mediante la prueba T-Student correspondiente a los tratamientos mejores evaluados sensoriales para determinar las diferencias estadísticas ( $p \leq 0.05$ ).

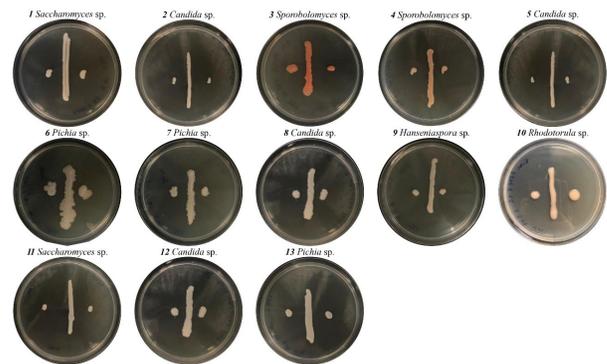
## Resultados/Discusión

### Fase I. Aislamiento e identificación de levaduras

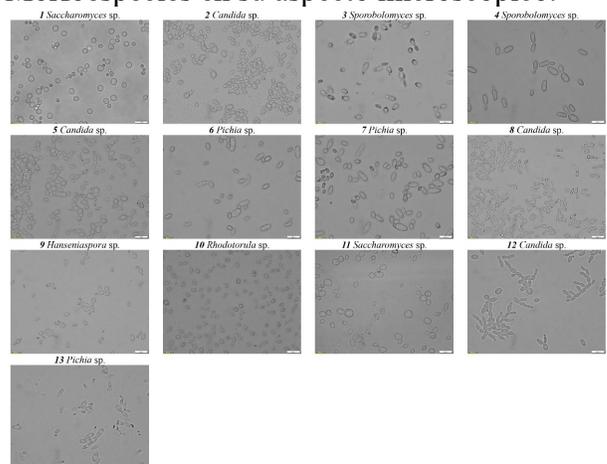
**Recuento e identificación morfológica de levaduras.** Esta etapa tomó aproximadamente un mes para su realización. Se evaluaron aspectos macro y microscópicos para determinar las diferencias entre cada género. La mayoría de las colonias, en cuanto al aspecto macroscópico, presentaron ser circulares de color crema a blanco hueso brillante, a excepción de las posibles colonias del género *Pichia* sp. que presentaban forma irregular y una elevación plana y nada brillante (Figura 1). Además de las colonias del género perteneciente a la *Rhodotorula* sp. y *Sporobolomyces* sp. que presentaron formas irregulares a circulares en diferentes tonalidades de salmónes. Para que estas colonias de características macroscópicas similares se lograran identificar de forma más clara, se

observaron las células (Figura 2). Y mediante el tamaño, la forma, tipo de gemación y la presencia de pseudohifas en la observación, se realizó revisión de literatura, en donde se presentaban las características e imágenes como complemento para lograr identificarlas de manera más acertada (Wulan et al. 2021; Martins et al. 2022; Ramos L et al. 2023).

**Figura 1**  
Morfoespecies en su aspecto macroscópico



**Figura 2**  
Morfoespecies en su aspecto microscópico.



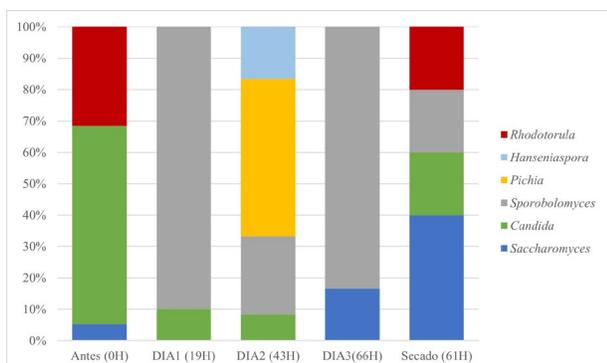
Durante todo el proceso de fermentación anaeróbica del café natural Geisha, se identificaron 13 morfoespecies distintas podrían corresponder a estos seis géneros de levaduras: *Candida* sp., *Hanseniaspora* sp., *Pichia* sp., *Rhodotorula* sp., *Sporobolomyces* sp., *Saccharomyces* sp. (Material suplementario 1). La mayoría de estas levaduras se encuentran en

el suelo, frutas y árboles, además de presentarse en mucosas, piel, genitales de mamíferos e intestinos (Deak, 2007). Esto explica los resultados de este estudio, además de que indica su similitud con otros estudios, en donde se menciona la presencia de estos géneros fermentativos (Evangelista et al., 2015; Carvalho Neto et al., 2017). El mucílago de café, además de otros compuestos, está formado por azúcares como la sacarosa que se invierte para formar glucosa y fructosa, sustratos importantes para el crecimiento de las levaduras (D'Amore et al., 1989; Puerta y Ríos, 2011).

Es interesante observar que en este estudio se identificaron *Saccharomyces* sp., *Candida* sp. y *Sporobolomyces* sp. durante la etapa donde se encontraba la menor concentración de población de levaduras para esta parte de la investigación (Figura 3). De acuerdo con Puerta et al. (2015) y Carvalho Neto et al. (2017) estos géneros tienen la habilidad de adaptarse a las condiciones ambientales antes y después de la fermentación, es decir que la calidad del mucílago no es determinante en su permanencia.

### Figura 3

Cambios en la abundancia relativa de levaduras nativas, durante y después (muestreo durante las primeras 61 horas de secado) de la fermentación anaeróbica del café natural Geisha.



*Nota.* Esta fase no lleva análisis estadístico, por lo tanto, no se presentan las barras de error.

Para el primer día de fermentación (19 h) se observa la aparición de *Pichia* sp. acompañada de *Candida* sp. (Figura 3). Pereira G et al. (2014) señala que durante las primeras 16 horas de fermentación se determinó que las levaduras con mayor presencia fueron especies de los posibles géneros encontrados en esta etapa. Al segundo día (43 h), se observó la presencia de *Hanseniaspora* sp. y *Rhodotorula* sp. Su aparición puede estar relacionada a cambios en las condiciones como lo es el pH y los grados Brix (Evangelista et al., 2014). En otras palabras, parámetros que se interrelacionan a la hidrólisis de pectina y el mucílago del café, debido al aumento en la acidez del medio, lo que indica una mayor producción de metabolitos como los ácidos orgánicos (Marques et al., 2010; Evangelista et al. 2014; Evangelista et al., 2015). Para el final de la fermentación (66 h), se mostró la presencia de *Saccharomyces* sp. y un alto porcentaje de *Pichia* sp. Una posible explicación para esto es que en estudios se indica que especies de *Saccharomyces* son altamente reproducibles en comparación con otras levaduras debido a su capacidad de sobrevivir en ambientes competitivos (Haile y Kang, 2019a). Además, ambas levaduras han demostrado ser resistentes al etanol y son capaces de sobrevivir hacia el final de la fermentación (Da Silva et al., 2019; Maicas, 2020).

Durante el secado se visualizó un aumento en el porcentaje de aparición de la *Saccharomyces* sp., la aparición de *Candida* sp. y *Sporobolomyces* sp., además de presentarse una gran disminución de *Pichia* sp. (Figura 3). La prevalencia de estas levaduras durante el secado, podría estar relacionado a que géneros pertenecientes a la *Candida* sp. pueden tolerar baja actividad de agua (Zhang et al., 2023). Para el caso de especies del género perteneciente a *Saccharomyces* sp. se ha demostrado que esta levadura tiene la capacidad de sobrevivir en periodos donde los nutrientes se encuentran escasos (Smets et al., 2010).

El hecho de que las levaduras aparezcan y desaparezcan durante la fermentación podría estar relacionada a su capacidad de encontrarse inactivas en el medio una vez las condiciones no son adecuadas para su crecimiento y que una vez sean adecuadas, tiendan a desaparecer (Alcázar, 2011). Esto podría concordar que las especies de las levaduras pudieran cambiar a medida pasara el tiempo.

El comportamiento de las levaduras estudiadas en esta investigación fue el esperado, en países como Brasil, Colombia, Tanzania y Australia, presentaron especies de los mismos géneros de microorganismos presentados en este estudio (Masoud et al., 2004; Pereira G et al., 2014; Elhalis, Cox y Zhao, 2020; Cruz-O'Byrne et al., 2021). De hecho, no solo en café se ha estimado esta conducta, en vino se ha determinado la presencia de levaduras similares a este estudio (Díaz et al., 2013). Este hallazgo sugiere que estas poblaciones micológicas forman parte esencial del desarrollo fermentativo de los alimentos. Aun así, Delgado et al. (2020) menciona la variabilidad en la existencia de las especies de levaduras, dependiendo de la zona geográfica donde se encuentre la muestra estudiada.

### *Fase II. Comportamiento de las levaduras nativas como cultivo iniciador y su efecto sensorial*

Luego de identificar morfológicamente las levaduras nativas del café natural Geisha de Hacienda La Esmeralda, proveniente del mosto de la fermentación anaeróbica y se seleccionaron dos levaduras a reproducir en laboratorio, las cuales fueron inoculadas a cada unidad experimental (apartado Diseño experimental). Se eligieron dos levaduras nativas (*Pichia* sp. y *Saccharomyces* sp.) las cuales han demostrado brindar buenas características sensoriales para el café (Evangelista S et al., 2013; Silva et al., 2013; Elhalis et al., 2021). En esta fase se inocularon estas levaduras nativas en café lavado Geisha de otro de los lotes de la empresa. De esta manera, se realizó la comparación con la levadura comercial utilizada comúnmente por ellos. Este estudio reportó por primera vez el uso de levaduras nativas de café Geisha natural anaeróbico en Panamá, como cultivo iniciador en la fermentación del café especial.

*Recuento de levaduras.* De acuerdo con el análisis estadístico, el modelo no presentó diferencias significativas entre tratamientos, sin embargo, para los valores entre distintos días, sí hubo diferencias ( $p \leq 0.05$ ) entre el primer y último día de fermentación. Además, el quinto día de secado presentó diferencias tanto para el tiempo de fermentación, como para el octavo día de secado. También, se culminó la toma de muestras de secado con un valor de carga microbiana similar a la inicial (Cuadro 1).

### **Cuadro 1**

Recuentos de levaduras (log UFC/g) del proceso de fermentación (DIA 0 y 3) y secado (DIA 5 y 8).

Tratamiento	Fermentación		Secado	
	DIA0	DIA3	DIA5	DIA8
Inóculo nativo 1	3.6 ± 0.05 <sup>az</sup>	7.1 ± 0.03 <sup>ax</sup>	5.0 ± 0.32 <sup>ay</sup>	3.9 ± 0.15 <sup>az</sup>
Inóculo nativo 2	3.7 ± 0.06 <sup>az</sup>	7.3 ± 0.73 <sup>ax</sup>	5.2 ± 0.73 <sup>ay</sup>	4.0 ± 0.08 <sup>az</sup>
Inóculo control	3.7 ± 0.07 <sup>az</sup>	7.1 ± 0.05 <sup>ax</sup>	5.3 ± 0.50 <sup>ay</sup>	4.3 ± 0.43 <sup>az</sup>
C.V (%)	1.96	5.72	6.36	7.40

*Nota.* <sup>1</sup> cultivo iniciador para cada tratamiento. <sup>2</sup>Cada resultado representa el promedio y la desviación estándar de tres repeticiones. <sup>3</sup>Coefficiente de variación. <sup>a-d</sup> Valores seguidos de una letra diferente en cada columna representan diferencia estadística entre tratamiento ( $P \leq 0.05$ ). <sup>x-z</sup> Valores seguidos de una letra diferente en cada fila indica diferencia estadística entre medidas repetidas en el tiempo ( $p \leq 0.05$ ).

Por otra parte, se pudo apreciar que para todos los tratamientos hubo un aumento entre el día inicial hasta el día final de fermentación de 3.6 a 7.1 log UFC/g. Este comportamiento demuestra ser el esperado debido a que de acuerdo con Ribeiro et al. (2017) las poblaciones de levaduras aumentan durante todo el proceso de fermentación debido a la presencia de sacarosa como sustrato. En cambio, se pudo observar que, al iniciar el secado, se disminuyó esta población. En el proceso de secado, el café se expone al aire y a temperaturas elevadas, lo que puede crear un ambiente menos propicio para la proliferación de levaduras. Además, la reducción de la actividad de agua a medida que el café se seca también contribuye a esta disminución. Esto, según Vilela et al. (2010) se entiende como un comportamiento normal debido a que las levaduras tienden a descender al momento de que las condiciones de nutrientes, actividad de agua y temperatura, no son ideales para su crecimiento.

*Abundancia relativa de levaduras.* De acuerdo con el análisis estadístico, tanto entre tratamientos, como entre días, existen diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). Debido a que no se realizó una esterilización previa a la inoculación, los cultivos iniciadores fueron mezclados con la población nativa del café lavado en esta fase. Por tanto, luego de realizar la identificación macroscópica de los géneros durante el recuento de estos microorganismos, se determinó la presencia de los posibles género 1, género 2 y género 3 en todos los tratamientos. Este último género siendo el único el cual no había sido inoculado previamente.

Se pudo observar que, para el inicio de la fermentación, dentro del recuento promedio de 3.7 log UFC/g de levaduras, el inóculo nativo 1 obtuvo una abundancia relativa de 75% para *Pichia* sp., el inóculo nativo 2 con 78% para *Saccharomyces* sp. y el inóculo comercial con 79% para *Saccharomyces* sp. (Figura 4). Sin embargo, para el tercer día de fermentación en

un promedio de 7 log UFC/g de levaduras, se observó un decrecimiento gradual en el porcentaje de aparición para todos los cultivos inoculados y un aumento en lo que parecía ser la población nativa de *Candida*. Tomados juntos estos resultados concuerdan con Vilela et al. (2010) quién indicó que durante las primeras 24 horas de fermentación, la mayor población está dominada por bacterias y que luego de esto, la población de levaduras crece. Por lo tanto, se puede inferir que, durante este proceso, todas las levaduras presentes en cada tratamiento crecieron, incluso las que no fueron inoculadas. Es decir que proporcionalmente los cultivos iniciadores disminuyeron en su porcentaje de aparición para abrir espacio al aumento de la presencia del género 3 sin provocar la disminución del conteo de levaduras. Además, cabe mencionar que pudo haber un crecimiento de especies distintas al inóculo nativo 1 y 2.

La presencia de *Candida* durante todo la etapa de fermentación, puede estar relacionada a que se ha mencionado en estudios previos, donde especies de esta levadura pueden permanecer hasta 216 horas de fermentación, esto debido a su capacidad de sobrevivencia en el medio (Vilela et al., 2010; Oliveira et al., 2019).

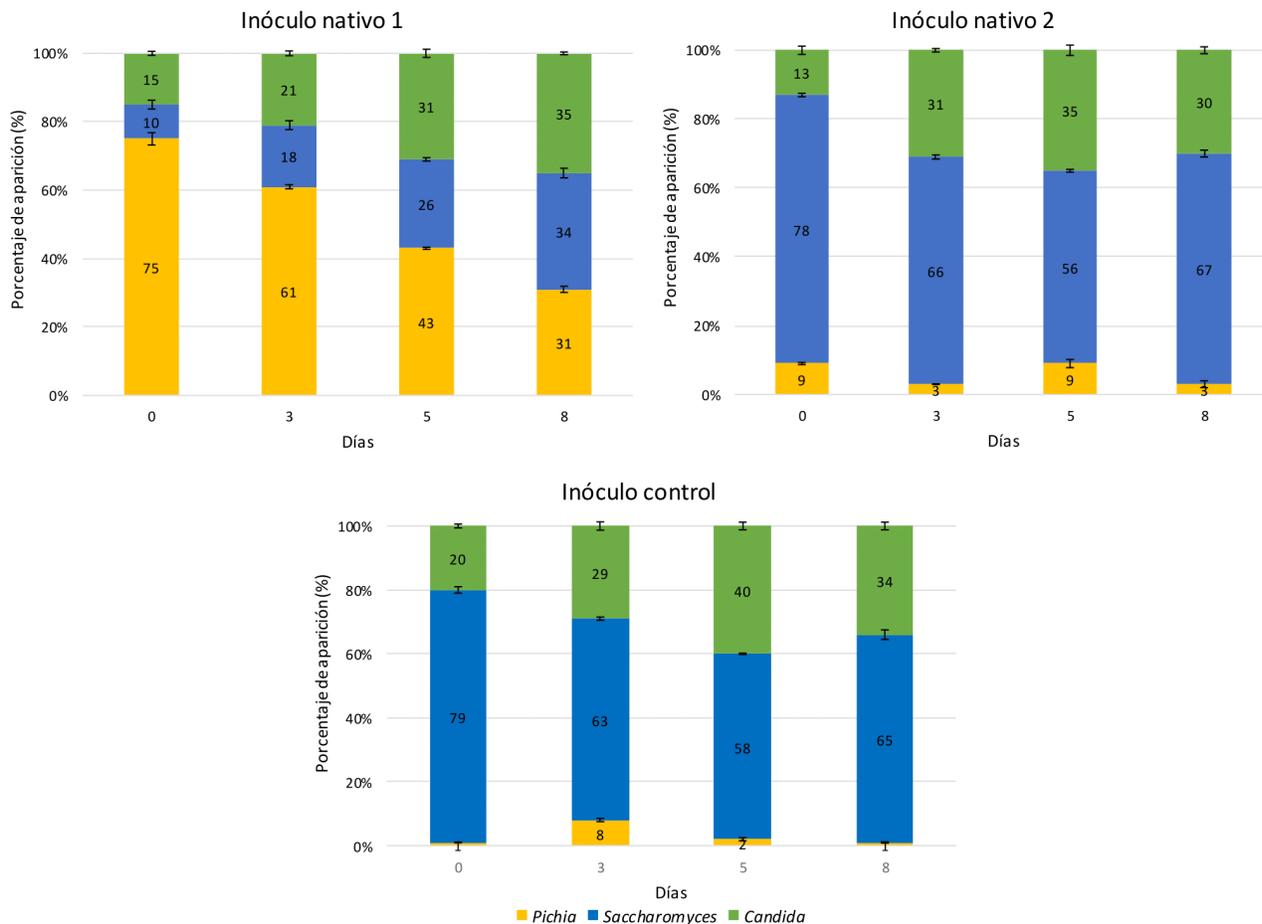
Los cambios más notables se obtuvieron en el secado, principalmente para el tratamiento con el inóculo nativo 1 (Figura 4). Se observó cómo esta levadura iba disminuyendo su porcentaje de aparición durante el desarrollo del procesamiento del café. Hay poca evidencia que soporte estos cambios en el café, pero se sugiere que pudo estar relacionada a la capacidad de tolerancia a una baja actividad agua. Como lo expresa Delgado et al. (2020) factores como los rayos UV y las altas temperaturas pueden ser parte de la supervivencia de ciertas levaduras durante esta etapa. Pereira et al. (2012) evaluó la habilidad de supervivencia a temperaturas altas en ciertas levaduras durante el proceso de fermentación espontánea, determinando que especies del inóculo nativo 2 son tolerantes a

estos cambios, en ese caso a 45 °C. Además, se indica la baja necesidad nutricional de la levadura mencionada anteriormente, lo que

explica la supervivencia en este estudio durante el secado.

**Figura 4**

Presencia de levaduras en porcentaje de aparición durante la fermentación (DIA 0 y 3) y secado (Dia 5 y 8)



Este hallazgo apoya la investigación previa de Meersman et al. (2016) quienes observaron en cacao que, luego de la inoculación, las cepas del género *Pichia sp.*, no alcanzaban tamaños de población altos y tendían a desaparecer en cierto punto. Mientras que, para el caso de especies de *Saccharomyces sp.*, se demostró que podía reprimir el crecimiento de las levaduras nativas en el cacao, volviéndose la levadura con dominancia debido a su posible tolerancia al ácido acético o láctico.

*Análisis sensorial.* El modelo estadístico indicó que al menos uno de los tratamientos presentó diferencias estadísticas ( $p \leq 0.05$ ). Se pudo determinar que entre el inóculo control, con un puntaje de 91.5 y el tratamiento inóculo nativo 1, con 91.3, no presentaron diferencias estadísticas entre sí y se consideraron los mejores tratamientos en esta investigación. El tratamiento inóculo nativo 2 obtuvo el puntaje más bajo en este estudio, pero aun así considerándose un café especial de alta categoría (90.5). De acuerdo con los atributos calificados durante la catación (Cuadro 2), se

determinó que el mejor tratamiento en cuanto aroma y acidez fue el inóculo control con un puntaje de 9.0. En cuanto al sabor no se encontraron diferencias estadísticas entre el inóculo control y el inóculo nativo 1, ambos obtuvieron un puntaje de 8.8. En cambio, para el atributo de regusto, el tratamiento inóculo nativo 1 representó el mejor tratamiento

estadísticamente con un puntaje promedio de 8.8. Para el atributo de cuerpo no se encontraron diferencias estadísticas entre los tres tratamientos. En cuanto al balance, inóculo nativo 1 representó el mayor puntaje con 8.6. Por último, el atributo general obtuvo el mejor puntaje el inóculo control y el tratamiento inóculo nativo 2 con 8.6.

## Cuadro 2

Resultados del análisis sensorial.

Atributos	Tratamientos			C.V (%)
	Inóculo nativo 1	Inóculo nativo 2	Inóculo control	
Fragancia	9.9 ± 0.13 <sup>b</sup>	10 ± 0.00 <sup>a</sup>	9.9 ± 0.26 <sup>b</sup>	1.77
Aroma	8.8 ± 0.14 <sup>b</sup>	8.7 ± 0.00 <sup>c</sup>	9.0 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.45
Sabor	8.8 ± 0.14 <sup>a</sup>	8.6 ± 0.14 <sup>b</sup>	8.8 ± 0.14 <sup>a</sup>	2.01
Regusto	8.8 ± 0.20 <sup>a</sup>	8.5 ± 0.00 <sup>c</sup>	8.7 ± 0.00 <sup>b</sup>	2.11
Acidez	8.8 ± 0.14 <sup>b</sup>	8.7 ± 0.00 <sup>c</sup>	9.0 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.45
Cuerpo	8.8 ± 0.14 <sup>a</sup>	8.7 ± 0.00 <sup>a</sup>	8.7 ± 0.27 <sup>a</sup>	2.01
Balance	8.6 ± 0.14 <sup>a</sup>	8.5 ± 0.00 <sup>b</sup>	8.5 ± 0.00 <sup>b</sup>	1.12
Taza limpia	10 ± 0.00 <sup>a</sup>	10 ± 0.00 <sup>a</sup>	10 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00
Dulzor	10 ± 0.00 <sup>a</sup>	10 ± 0.00 <sup>a</sup>	10 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00
General	8.5 ± 0.14 <sup>b</sup>	8.6 ± 0.00 <sup>a</sup>	8.6 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.41
Puntaje final	91.3 ± 0.41 <sup>a</sup>	90.5 ± 0.00 <sup>b</sup>	91.5 ± 0.27 <sup>a</sup>	0.58

Nota. <sup>1</sup> cultivo iniciador para cada tratamiento. <sup>2</sup>Cada resultado representa el promedio y la desviación estándar de tres repeticiones. <sup>3</sup>Coefficiente de variación. <sup>a-d</sup> Valores seguidos de una letra diferente en cada fila representan diferencia estadística entre tratamiento ( $P \leq 0.05$ ).

Debido a que no hubo una esterilización previa a la inoculación, es importante relacionar la mezcla de microorganismos que aportan distintas características sensoriales al café, de acuerdo con Pereira G et al. (2014) la mezcla de levaduras reduce la producción de compuestos volátiles, en especial cuando *Saccharomyces* sp. es parte de esta composición, sin embargo, se ha demostrado una alta producción de isoamilacetato lo que provoca compuestos aromáticos distintivos en la misma composición. Además, la presencia de *Candida* sp. en todos los tratamientos pudo provocar alta actividad enzimática, es decir, mayor producción de compuestos en el medio fermentativo lo que implica la mezcla de percepciones distintas y favorables para los

puntajes finales (Silva et al. 2013). Sin embargo, todos los tratamientos mostraron presencia similar de microorganismos, por lo que el cultivo iniciador inoculado pudo tener influencia en el resultado final del análisis sensorial.

El tratamiento control fue calificado con leve cítrico, afrutado, dulce, lima y floral. Estos resultados coinciden con estudios previos donde han mencionado la capacidad aromática de *Saccharomyces cerevisiae* relacionándolo a fragancias de rosas (Sottit C et al., 2019). De acuerdo con Pereira et al. (2018) la percepción de los aromas del café dependen de la concentración de ciertos compuestos químicos, por ejemplo, el atributo afrutado lo relaciona al

compuesto 2-heptanone y el atributo dulce es relacionado a pyrazine-methyl. De igual manera menciona que la presencia de furanos provee notas herbales o afrutadas. Según con el fabricante del producto, se utiliza una cepa específica para formular este cultivo iniciador, lo que podría explicar por qué sus atributos marcan mayores compuestos en aroma.

Para el caso del inóculo nativo 1 se relacionó con un break flojo, especies, poco herbal, nueces, cítricos, limón, dulce, floral, vainilla y bergamota. Estos resultados concuerdan con estudios previos donde se menciona que especies de esta levadura ha demostrado un buen desempeño en la producción de componentes aromáticos como los ésteres, alcoholes, ácidos y otros compuestos volátiles (Chen L et al., 2023). De acuerdo con Pereira G et al. (2014) mencionó la relación del atributo cítrico a la producción de ésteres durante la fermentación. Ciertos de los compuestos que brindan notas frutales y florales durante la fermentación han sido encontrado en niveles elevados durante fermentaciones con especies del inóculo nativo 1, como es el caso del octanoato de etilo, el acetato de isoamilo y el hexilo (Delac et al., 2022).

En cuanto al tratamiento inóculo nativo 2, se describió como cítrico, canela, limón, poco terroso, floral, herbal, insípido. Ciertos de estos atributos fueron de igual manera encontrados en un estudio similar realizado por Elhalis et al. (2021) en donde la característica terrosa estaba

relacionada a la presencia de pirasinas, pirroles, piridinas, furanos, fenoles y azufrados consecuentes de la reacción de Maillard durante el tostado. Además, se ha mencionado que este género presenta bajas producciones de compuestos aromáticos, aspecto que sí poseen otras levaduras fermentativas (Cordero et al. 2013). Es importante mencionar que su bajo puntaje en este estudio, pudo ser a que la producción de compuestos aromáticos como alcoholes superiores, ácidos grasos y ésteres en cantidades y proporciones distintas, tienden a depender entre especies y cepas obtenidas (Vejarano y Calderón 2021).

### *Fase III. Efecto de las levaduras nativas en las características químicas del café*

*Flavonoides totales.* Los flavonoides son moléculas fenólicas que se encuentran distribuidas en el reino vegetal y se ha demostrado su efecto antioxidante (Ochoa y Ayala, 2004). De acuerdo con Ramirez et al. (2011) la concentración de estos compuestos dependen de la variedad, origen del grano, suelo, condiciones del ambiente y aspectos genéticos del cultivo. Para este estudio se analizaron los dos tratamientos con mejores evaluaciones sensoriales, inóculo control y inóculo nativo 1. Sin embargo, de acuerdo con el modelo estadístico no hubo diferencias estadísticas entre tratamientos ( $P \geq 0.05$ ) (Cuadro 3).

### **Cuadro 3**

Contenido de flavonoides y polifenoles totales de los mejores tratamientos, expresados en mg equivalentes a catequina/g de café tostado (mg EC/g café) y mg equivalentes a ácido gálico/g de café tostado (mg EAG/g café) respectivamente.

Tratamiento	Flavonoides (mg EC/g café)	Polifenoles (mg EAG/g café)
Inóculo nativo 1	39.2 ± 3.17 <sup>a</sup>	33.1 ± 2.85 <sup>a</sup>
Inóculo control	41.6 ± 0.86 <sup>a</sup>	33.1 ± 1.55 <sup>a</sup>
C.V (%)	4.69	7.04

El contenido de flavonoides en el café Geisha lavado con el tratamiento del inóculo nativo 1 fue en promedio de 39.2 mg equivalentes de catequina/g de café tostado y 41.6 mg equivalentes de catequina/g de café tostado para el tratamiento del inóculo control. De acuerdo con el estudio realizado por Vega et al. (2017) quien analizaba el contenido total de flavonoides de cafés puros comerciales de Panamá, determinó que los cafés Geisha grado de exportación, presentaban un contenido de flavonoides promedio de 34.64 mg equivalentes de catequina/g de café tostado sin previa inoculación. Es decir que no hay un efecto en la actividad microbiana para este compuesto químico.

*Polifenoles totales.* Los polifenoles son moléculas del metabolismo de las plantas, y cuentan con variaciones en su concentración dependiendo del grado de madurez, composición del suelo, localización y condiciones ambientales donde se encuentre el fruto (Avilés E et al., 2017).

#### Cuadro 4

Actividad antioxidante en mg equivalentes a ácido gálico/g de café tostado (mg EAG/g café) y porcentaje de inhibición.

Tratamiento	Actividad antioxidante (mg EAG/g café)	Porcentaje de inhibición
Inóculo nativo 1	13.6 ± 0.27 <sup>a</sup>	38.8 ± 0.83 <sup>a</sup>
Inóculo control	14.3 ± 0.15 <sup>a</sup>	40.8 ± 0.44 <sup>a</sup>
C.V (%)	3.54	2.14

De acuerdo con Fukushima et al. (2009) la actividad antioxidante está fuertemente correlacionada con los contenidos de polifenoles totales. Según lo discutido en la sección de polifenoles totales, esto explicaría la baja actividad antioxidante y por lo tanto, sus bajos porcentajes de inhibición en ambos tratamientos. Hay poca literatura al respecto en cuanto al café tostado, sin embargo, Jiménez et al. (2012) demostró presentar alta capacidad antioxidante con un porcentaje de inhibición al 50%, esto relacionado al tipo de extracción realizada al café y a su país de procedencia.

El modelo estadístico no mostró diferencias estadísticas entre tratamientos ( $P \geq 0.05$ ) (Cuadro 3). El contenido de polifenoles totales en el café Geisha lavado para el tratamiento del nativo 1 fue en promedio de 33.1 mg equivalentes de ácido gálico/g de café tostado para ambos. Siguiendo lo explicado en la sección de flavonoides totales, no hubo una influencia en la inoculación realizada.

*Actividad antioxidante.* La actividad antioxidante es de relevancia en el estudio del café ya que funciona como indicador a la presencia de compuestos antioxidantes de importancia en el aporte de características sensoriales, como es el caso de los ácidos clorogénicos (Kamiyama et al., 2015). Para estudio se tomaron los tratamientos evaluados, sin embargo, de acuerdo con el modelo estadístico no hubo diferencias estadísticas entre tratamientos para la actividad antioxidante y el porcentaje de inhibición ( $P \geq 0.05$ ) (Cuadro 4).

#### Conclusiones/Recomendaciones

Se lograron identificar 13 morfoespecies de levaduras, pertenecientes a seis géneros. *Pichia* sp. fue el género más predominante en el café Geisha natural estudiado, demostrando la diversidad de estas durante el proceso de fermentación y secado. También, se observó la presencia del *Candida* sp. durante el procesamiento del café lavado Geisha, a pesar de no ser inoculado. Además, se demostró que las levaduras nativas provenientes del mosto del café Geisha tienen el potencial de aportar a las

características sensoriales del café similares a un inóculo comercial. Y, por último, se determinó que la diversidad de levaduras no tuvo influencia en el contenido de flavonoides, polifenoles totales y la actividad antioxidante del café lavado Geisha.

Se recomienda realizar prueba de Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciación para corroborar la identidad de las levaduras estudiadas. Además, aumentar la concentración de células viables a inocular, con el objetivo de verificar su efecto en la calidad sensorial. También, hacer el mismo estudio con variedades de Geisha sometidas a diferentes condiciones ambientales y geográficas. Y por último, formular mezclas de levaduras nativas para determinar su aporte al desarrollo en la calidad del café.

### Contribuciones de los autores

**G. Castillo Avilés** - Conceptualización, análisis formal, adquisición de fondos, investigación, administración del proyecto, visualización, redacción- borrador original. **T. A. Hofmann** - Conceptualización, metodología, administración del proyecto, recursos, supervisión, validación, redacción-revisión y edición. **J. Cardona** - Conceptualización, metodología, administración del proyecto, recursos, supervisión, validación, redacción-revisión y edición.

### Referencias Bibliograficas

Alcázar, E. (2011). Capacidades fermentativas y generación de volátiles de cepas de levaduras aisladas en diferentes estados productores de mezcal. *Centro De Investigación Y Asistencia En Tecnología Y Diseño Del Estado De Jalisco*.  
<https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/91/1/Elba%20Montserrat%20Alcazar%20Valle.pdf>

- Andrews, W. y Hammack, T. (2022). BAM Chapter 1: Food sampling/preparation of sample homogenate. *Food and Drug Administration (FDA)*.  
<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-1-food-samplingpreparation-sample-homogenate>
- Avilés, E., Figueroa, I., Martínez, E., Bartolomé, M., Martínez, H. y García, M. (2017). Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*(16), 15–29.  
<https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/quimica/article/view/1583>
- Bressani, A. P. P., Martinez, S. J., Sarmiento, A. B. I., Borém, F. M. y Schwan, R. F. (2020). Organic acids produced during fermentation and sensory perception in specialty coffee using yeast starter culture. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 128, 108773.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108773>
- Carvalho Neto, D., Melo Pereira, G. de, Tanobe, V., Thomaz Soccol, V., Da G. Silva, B., Rodrigues, C. y Soccol, C. (2017). Yeast diversity and physicochemical characteristics associated with coffee bean fermentation from the brazilian cerrado Mineiro region. *Fermentation*, 3(1), 11.  
<https://doi.org/10.3390/fermentation3010011>
- Chen, L., Li, K., Chen, H. y Li, Z. (2023). Reviewing the source, physiological characteristics, and aroma production mechanisms of aroma-producing yeasts. *Foods*, 12(18), 3501.  
<https://doi.org/10.3390/foods12183501>
- Cordero, G., Esteve, B., Cabellos, J. M., Gil, M. y Arroyo, T. (2013).

- Biotechnological potential of non-*Saccharomyces* yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* cv. L.). *European Food Research and Technology*, 236(1), 193–207. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1874-9>
- Cruz-O'Byrne, R., Piraneque-Gambasica, N. y Aguirre-Forero, S. (2021). Microbial diversity associated with spontaneous coffee bean fermentation process and specialty coffee production in northern Colombia. *International Journal of Food Microbiology*, 354, 109282. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109282>
- Da Silva, A., Melo Pereira, G. V. de, Carvalho Neto, D. P. de, Rodrigues, C., Pagnoncelli, M. G. B. y Soccol, C. R. (2019). Effect of co-inoculation with *Pichia fermentans* and *Pediococcus acidilactici* on metabolite produced during fermentation and volatile composition of coffee beans. *Fermentation*, 5(3), 67. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030067>
- D'Amore, T., Russell, I. y Stewart, G. (1989). Sugar utilization by yeast during fermentation. *Journal of Industrial Microbiology*, 4(4), 315–324. <https://doi.org/10.1007/BF01577355>
- Deak, T. (2007). *Handbook of food spoilage yeasts*. CRC Press.
- Delac, D., Horvat, I., Hranilovic, A., Plavska, T., Radeka, S., Pakovic, I. y Lukic, I. (2022). Diversity of volatile aroma compound composition produced by non-*Saccharomyces* yeasts in the early phase of grape must fermentation. *Foods*, 11(19), 3088. <https://doi.org/10.3390/foods11193088>
- Delgado, J., Triboletti, S., Alessandria, V., Serio, A., Sergi, M., Paparella, A., Rantsiou, K. y Chaves-López, C. (2020). Functional biodiversity of yeasts isolated from colombian fermented and dry cocoa beans. *Microorganisms*, 8(7), 1086. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071086>
- Díaz, C., Molina, A. M., Nähring, J. y Fischer, R. (2013). Characterization and dynamic behavior of wild yeast during spontaneous wine fermentation in steel tanks and amphorae. *BioMed Research International*, 2013, 540465. <https://doi.org/10.1155/2013/540465>
- Elhali, H., Cox, J., Frank, D. y 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>
- Elhali, H., Cox, J., Frank, D. y Zhao, J. (2021). Microbiological and chemical characteristics of wet coffee fermentation inoculated with *Hansinaspora uvarum* and *Pichia kudriavzevii* and their impact on coffee sensory quality. *Frontiers in Microbiology*, 12, 713969. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.713969>
- Elhali, H., Cox, J. y Zhao, J. (2020). Ecological diversity, evolution and metabolism of microbial communities in the wet fermentation of Australian coffee beans. *International Journal of Food Microbiology*, 321, 108544. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108544>
- Evangelista, S., Da Cruz, M., Ferreira, C., Marques, A. y Freitas, R. (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>
- Evangelista, S., Da Cruz, M., Souza, C. de, Ferreira, C., Marques, A. y Freitas, R. (2014). Inoculation of starter cultures in a semi-dry coffee (*Coffea arabica*) fermentation process. *Food Microbiology*, 44, 87–95.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.05.013>
- Evangelista, S., Ferreira, C., Pedrozo, M., Souza, C. de, Marques, A., Ferreira, W. y Freitas, R. (2013). Improvement of coffee beverage quality by using selected yeasts strains during the fermentation in dry process. *Food Research International*, 61, 183–195.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.033>
- Food & Drug (Ed.). (1998). *Bacteriological Analytical Manual. Bacteriological Analytical Manual (BAM)* (8<sup>a</sup> ed.).  
<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-18-yeasts-molds-and-mycotoxins>
- Fukushima, Y., Ohie, T., Yonekawa, Y., Yonemoto, K., Aizawa, H., Mori, Y., Watanabe, M., Takeuchi, M., Hasegawa, M., Taguchi, C. y Kondo, K. (2009). Coffee and green tea as a large source of antioxidant polyphenols in the Japanese population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1253–1259.  
<https://doi.org/10.1021/jf802418j>
- Guimarães, E., Castro, L. de y Carvalho, H. (2016). A terceira onda do café em Minas Gerais. *Revista Organizações Rurais & Agroindustriais*, 18(3).  
<http://www.revista.dae.ufla.br/index.php/ora/article/view/1108>
- Haile, M. y Kang, W. (2019a). Antioxidant activity, total polyphenol, flavonoid and tannin contents of fermented green coffee beans with selected yeasts. *Fermentation*, 5(1), 29.  
<https://doi.org/10.3390/fermentation5010029>
- Haile, M. y Kang, W. (2019b). Isolation, identification, and characterization of pectinolytic yeasts for starter culture in coffee fermentation. *Microorganisms*, 7(10), 401.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms7100401>
- Haile, M. y Kang, W. (2019c). The role of microbes in coffee fermentation and their impact on coffee quality. *Journal of Food Quality*, 2019(4836709).  
<https://doi.org/10.1155/2019/4836709>
- Jeszka-Skowron, M., Sentkowska, A., Pyrzyńska, K. y Peña, M. P. de (2016). Chlorogenic acids, caffeine content and antioxidant properties of green coffee extracts: Influence of green coffee bean preparation. *European Food Research and Technology*, 242(8), 1403–1409.  
<https://doi.org/10.1007/s00217-016-2643-y>
- Jiménez, A., Sánchez, M. y Martínez, M. (2012). Optimización del método captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) para evaluar actividad antioxidante en bebida de café. *Anales De Veterinaria De Murcia*, 28, 67–78.  
<https://doi.org/10.6018/j/188731>
- Kamiyama, M., Moon, J.-K., Jang, H. W. y Shibamoto, T. (2015). Role of degradation products of chlorogenic acid in the antioxidant activity of roasted coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(7), 1996–2005.  
<https://doi.org/10.1021/jf5060563>

- Maicas, S. (2020). The role of yeasts in fermentation processes. *Microorganisms*, 8(8), 1142. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081142>
- Marques, D., Pereira, G., Ferreira, C., Batista, L. y Freitas, R. (2010). Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). *Food Microbiology*, 27, 1128–1135. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.024>
- Martinez, S. J., Bressani, A. P. P., Dias, D. R., Simão, J. B. P. y Schwan, R. F. (2019). Effect of bacterial and yeast starters on the formation of volatile and organic acid compounds in coffee beans and selection of flavors markers precursors during wet fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1287. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01287>
- Martins, V., Costa, L., Soares, R., Ayogu, P., Teixeira, A. y Gerós, H. (2022). A catalogue of cultivable yeasts from the microbiota of grape berries cv. Vinhão and Loureiro. *OENO One Vine and Wine*, 56(3), 247–260. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2022.56.3.5462>
- Masoud, W., Cesar, L. B., Jespersen, L. y Jakobsen, M. (2004). Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. *Yeast (Chichester, England)*, 21(7), 549–556. <https://doi.org/10.1002/yea.1124>
- Meersman, E., Steensels, J., Struyf, N., Paulus, T., Saels, V., Mathawan, M., Allegaert, L., Vrancken, G. y Verstrepen, K. J. (2016). Tuning chocolate flavor through development of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* starter cultures with increased acetate ester production. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(2), 732–746. <https://doi.org/10.1128/AEM.02556-15>
- Ochoa, C. y Ayala, A. (2004). Los flavonoides: apuntes generales y su aplicación en la industria de alimentos. *Ingeniería Y Competitividad*, 6(2). <https://doi.org/10.25100/iyc.v6i2.2280>
- Oliveira, A. de, Melo Pereira, G., Medina, J., Alvear, M., Rosero, R., Carvalho, D. de, Enríquez, H. y Soccol, C. (2019). First description of bacterial and fungal communities in Colombian coffee beans fermentation analysed using Illumina-based amplicon sequencing. *Scientific Reports*, 9, 8794. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45002-8>
- Pereira, A., Martínez, S., Reis, S., Ribeiro, D. y Freitas, R. (2018). Characteristics of fermented coffee inoculated with yeast starter cultures using different inoculation methods. *LWT-Food Science and Technology*, 92, 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.029>
- Pereira, G., Da Miguel, M. G. C. P., Ramos, C. L. y Schwan, R. F. (2012). Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined starter culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), 5395–5405. <https://doi.org/10.1128/AEM.01144-12>
- Pereira, G., Soccol, V., Pandey, A., Medeiros, A., Andrade, J., Gollo, A. y Soccol, C. (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>
- Pereira, T., Batista, N., Santos, L., Martinez, S., Ribeiro, L., Oliveira, J. y Schwan, R. (2022). Self-induced anaerobiosis coffee fermentation: Impact on microbial communities, chemical composition and sensory quality of coffee. *Food Microbiology*, 103, 103962.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103962>
- Puerta, G. y Ríos, S. (2011). Composición química del mucílago del café según el tiempo de fermentación y refrigeración. *Centro Nacional De Investigaciones De Café*, 62(2), 23–40.  
<https://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/478/1/arc062%2802%2923-40.pdf>
- Puerta, Q., Marin, J. y Osorio, B. (2015). Microbiología de la fermentación del mucílago de café según su madurez y selección. *Cenicafé*, 63(2), 58–78.  
<https://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/536>
- Ramirez, M., Plaza, M. L., Azeredo, A., Balaban, M. O. y Marshall, M. R. (2011). Physicochemical and phytochemical properties of cold and hot water extraction from *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Food Science*, 76(3), C428-35.  
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02091.x>
- Ramos, L., Mokus, L., Frota, H. F., Santos, M. V., Oliveira, S. S. C., Oliveira, M. M. E., Costa, G. L., Alves, A. L., Bernardes-Engemann, A. R., Orofino-Costa, R., Aor, A. C., Branquinha, M. H. y Santos, A. L. S. (2023). Sars-CoV-2 Post-infection and sepsis by *Saccharomyces cerevisiae*: A fatal case report-focus on fungal susceptibility and potential virulence attributes. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 8(2), 99.  
<https://doi.org/10.3390/tropicalmed8020099>
- Ribeiro, L. S., Da Miguel, M. G. C. P., Evangelista, S. R., Martins, P. M. M., van Mullem, J., Belizario, M. H. y Schwan, R. F. (2017). Behavior of yeast inoculated during semi-dry coffee fermentation and the effect on chemical and sensorial properties of the final beverage. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 92, 26–32.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.011>
- Ricci, A., Teslic, N., Petropolis, V.-I., Parpinello, G. P. y Versari, A. (2019). Fast analysis of total polyphenol content and antioxidant activity in wines and oenological tannins using a flow injection system with tandem diode array and electrochemical detections. *Food Analytical Methods*, 12(2), 347–354.  
<https://doi.org/10.1007/s12161-018-1366-z>
- Salfinger, Y. y Tortorello, M. L. (Eds.). (2015). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (5<sup>a</sup> ed.). American Public Health Association.  
<https://doi.org/10.2105/MBEF.0222>
- Secretaría de Salud; Secretaría de medio ambiente, recursos naturales y pesca; Instituto Politécnico Nacional (1994). *Norma Oficial Mexicana NOM-III-SSAI-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en*

- alimentos*. (Norma, NOM-111-SSA1-1994).
- Silva, C., Marques, D., Souza, C. de, Ferreira, W., Ribeiro, D. y Freitas, R. (2013). Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. *World J Microbiol Biotechnol*, 29(2), 235–247. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1175-2>
- Singleton, V., Orthofer, R. y Lamuela-Raventós, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Smets, B., Ghillebert, R., Snijder, P. de, Binda, M., Swinnen, E., Virgilio, C. de y Winderickx, J. (2010). Life in the midst of scarcity: Adaptations to nutrient availability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 56(1), 1–32. <https://doi.org/10.1007/s00294-009-0287-1>
- Sottit, C., Salor, J., Moreno, J [Jaime], Moreno, J [Juan] y Gracia, T. (2019). Using *Torulopsis delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* wine yeasts as starter cultures for fermentation and quality improvement of mead. *European Food Research and Technology*, 245, 2705–2714. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03384-z>
- Specialty Coffee Association. (2015). *SCAA Protocols: Cupping specialty coffee*. <https://www.scaa.org/PDF/resources/cupping-protocols.pdf>
- Tournas, V., Stack, M., Mislivec, P., Koch, H. y Bandler, R. (1998). BAM chapter 18: yeasts, molds and mycotoxins. En Food & Drug (Ed.), *Bacteriological Analytical Manual. Bacteriological Analytical Manual (BAM)* (8<sup>a</sup> ed.). <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-18-yeasts-molds-and-mycotoxins>
- Trandafir, I., Nour, V. y Ionica, M. E. (2013). Antioxidant capacity, phenolic acids and caffeine contents of some commercial coffees available on the Romanian market. *Archivos Latinoamericanos De Nutricion*, 63(1), 87–94. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24167962/>
- Tucker, C. (2018). *Coffee culture: local experiences, global connections* (2<sup>a</sup> ed.). Routledge. <https://www.book2look.com/embed/9781317392248>
- Vaughan, M., Mitchell, T. y McSpadden, B. (2015). What's inside that seed we brew? A new approach to mining the coffee microbiome. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(19). <https://doi.org/10.1128/AEM.01933-15>
- Vega, A., León, J. de y Reyes, S. (2017). Determinación del contenido de polifenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante de 34 cafés comerciales de Panamá. *Información Tecnológica*, 28(4). <https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000400005>
- Vejarano, R. y Calderón, A. (2021). Commercially available non-*Saccharomyces* yeasts for winemaking: current market, advantages over *Saccharomyces*, biocompatibility, and safety. *Fermentation*, 7(3), 171. <https://doi.org/10.3390/fermentation7030171>
- Vilela, D., Pereira, Gilberto Vinícius de M., Silva, C. F., Batista, L. R. y

- Schwan, R. F. (2010). Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). *Food Microbiology*, 27(8), 1128–1135. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.024>
- Wolfe, K., Wu, X. y Liu, R. H. (2003). Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 609–614. <https://doi.org/10.1021/jf020782a>
- Wulan, R., Astuti, R. I., Rukayadi, Y. y Meryandini, A. (2021). Evaluation of indigenous *Pichia kudriavzevii* from cocoa fermentation for a probiotic candidate. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 22(3). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220331>
- Zhang, S., Zoerkler, N., Genevaz, A., Roubaty, C., Pollien, P., Bordeaux, M., Mestdagh, F. y Moccand, C. (2023). Unlocking the aromatic potential of native coffee yeasts: from isolation to a biovolatile platform. *J. Agric. Food Chem.*, 71, 4665–4674. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c08263>
- Zhishen, J., Mengcheng, T. y Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555–559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)

## Material Suplementario

Descripción macro y microscópicas de las morfoespecies estudiadas.

N°	Descripción	
	Macroscópica	Microscópica
1	Las colonias incubadas a 37°C en agar YGC presentaron un diámetro de 1-1(2) mm después de 4 días del crecimiento levaduriforme. Colonias de forma circular, elevación plana a ligeramente elevada, consistencia suave, borde entero, textura lisa, color blanco hueso a ligeramente crema, transparencia opaca y brillo notable.	Células con forma globosa a ampliamente elipsoidal y cilíndrica de (4)5-7x(3)4-6(7) $\mu\text{m}$ color hialino, ornamentación lisa, gemación multilateral, ausencia de pseudohifas.
2	Las colonias incubadas a 37°C en agar YGC presentaron un diámetro de (0.5)1-1 mm después de cinco días del crecimiento levaduriforme. Forma circular, elevación plana a ligeramente elevada, consistencia suave, borde entero, textura lisa, color blanco hueso, transparencia opaca y brillo notable.	Células con forma elipsoidal a ampliamente cilíndricas de (4)5-7(8) x 3-5(6) $\mu\text{m}$ color hialino, ornamentación lisa, gemación multilateral y ausencia de pseudohifas.
3	Las colonias incubadas a 37°C en agar YGC presentaron un diámetro de 1-1(2) después de 2 días del crecimiento levaduriforme. Forma circular a irregular, elevadas, consistencia suave, borde entero a rizado, textura entre lisa y rugosa, color salmón oscuro, transparencia opaca, y brillo notable.	Células con forma globosa a ligeramente elipsoidal de (6)7-12(15) x (3)4-5 $\mu\text{m}$ color hialino, ornamentación lisa, gemación monopolar y ausencia de pseudohifas.
4	Las colonias incubadas a 37°C en agar YGC presentaron un diámetro de 1-2 mm a los 5 días del crecimiento levaduriforme. Colonias con forma irregular, elevación plana a ligeramente elevada, consistencia suave, borde ondulado, textura lisa, color salmón oscuro, transparencia opaca y brillo notable.	Células con forma globosa a ampliamente cilíndrica de (9)10-14(16) x 5-7(8) $\mu\text{m}$ color hialino, ornamentación lisa, gemación multilateral y ausencia de pseudohifas.
5	Las colonias incubadas a 37°C en agar YGC presentaron un diámetro de 1-1(2) mm después de 4 días del crecimiento levaduriforme. Forma circular, elevación plana a ligeramente elevada, consistencia suave, borde entero, textura lisa, color blanco hueso a crema, transparencia opaca y brillo notable.	Células con forma elipsoidal a ampliamente cilíndricas de (4)5-7(9) x (2)3-5 $\mu\text{m}$ color hialino, ornamentación lisa, gemación multilateral y ausencia de pseudohifas.
6	Las colonias incubadas a 37°C en agar YGC presentaron un diámetro de 4-7(8) mm a 4 días de crecimiento levaduriforme. Colonias con forma irregular, elevación plana, consistencia suave, borde rizado, textura lisa, color blanco hueso a crema, transparencia opaca y sin brillo notable.	Células con forma elipsoidal a ampliamente cilíndrica de (4)6-10(11) x 3-5 (6) $\mu\text{m}$ color hialino, gemación multilateral y ausencia de pseudohifas.
7	Las colonias incubadas a 37°C en agar YGC presentaron un diámetro de 1-3(4) mm después de 4 días del crecimiento levaduriforme. Colonias con forma filamentosa, elevación plana a ligeramente elevada, consistencia suave, borde filamentoso, textura lisa, color blanco hueso, transparencia opaca y sin brillo notable.	Células con forma elipsoidal a ampliamente cilíndrica de (4)6-10(11) x 3-6(7) $\mu\text{m}$ color hialino, ornamentación lisa, gemación multilateral, presencia de pseudohifas hialinas septadas.