

# APLICACIÓN DE AGUA OZONIZADA Y ACTIVIDAD MICROBIANA EN EL CAFÉ PERGAMINO HÚMEDO DURANTE EL ALMACENAMIENTO

Jenny Paola Pabón Usaquén\*; Aída Esther Peñuela Martínez\*

---

**PABÓN U., J.P.; PEÑUELA M., A.E. Aplicación de agua ozonizada y actividad microbiana en el café pergamino húmedo durante el almacenamiento. Revista Cenicafé 67 (2): 7-14. 2016**

Con el propósito de evaluar la efectividad de la aplicación de agua ozonizada sobre la carga microbiana obtenida durante el almacenamiento del café pergamino húmedo, se planteó un diseño experimental completamente aleatorizado 2x4+1, con dos prácticas (aplicación de agua ozonizada y agua sin ozonizar), cuatro tiempos de almacenamiento (24, 48, 72 y 96 h) y un testigo (café lavado y secado inmediatamente). Se determinaron las poblaciones de aerobios mesófilos, coliformes totales y mohos y levaduras (UFC/g), mediante los métodos AOAC 990.12 y el AOAC 991.14 para aerobios mesófilos y coliformes totales, respectivamente, y el método AOAC 997.02 para mohos y levaduras. Se realizó un análisis de varianza al 95% y la prueba DMS de Fisher para cada uno de los grupos de microorganismos. Los resultados obtenidos mostraron que no hubo diferencias significativas entre la carga microbiana obtenida para el testigo y los tratamientos en los cuales se aplicó agua ozonizada, para los tres grupos de microorganismos evaluados.

**Palabras clave:** Microorganismos, mesófilos, coliformes totales, mohos.

---

## APPLICATION OF OZONATED WATER AND MICROBIAL ACTIVITY IN WET PARCHMENT COFFEE DURING STORAGE

In order to evaluate the effectiveness of the application of ozonated water on the microbial load obtained during storage of wet parchment coffee, a completely randomized design 2x4+1, with two practices (application of ozonated water and non-ozonated water) four storage times (24, 48, 72 and 96 h) and a control (coffee immediately washed and dried) was created. The populations of mesophilic aerobes, total coliforms and molds and yeasts (CFU/g) were determined by the AOAC 990.12 and AOAC 991.14 methods for mesophilic aerobes and total coliforms, respectively, and the AOAC 997.02 method for molds and yeasts. An analysis of variance at 95% and a Fisher's LSD test were done for each of the groups of microorganisms. The results showed no significant differences between the microbial load obtained for the control and the treatments in which ozonated water was applied to the three groups of microorganisms evaluated.

**Keywords:** Microorganisms, mesophilic, total coliforms, molds.

---

\* Asistente de Investigación e Investigador Científico I, respectivamente. Disciplina de Poscosecha. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Manizales, Caldas, Colombia.

La calidad de los alimentos es vulnerable a riesgos que afectan su inocuidad durante toda la cadena de procesamiento (9). En el caso del café, la aplicación de prácticas de conservación inadecuadas o deficientes durante la cosecha (recolección) y postcosecha (beneficio) pueden perjudicar la calidad del producto (7), lo que conlleva a pérdidas económicas significativas.

En la comercialización del café húmedo, el grano se encuentra en un estado intermedio con una humedad alta (52% base húmeda) y un valor de actividad de agua de 0,97 que genera un ambiente propicio para la proliferación de diferentes microorganismos, como hongos y bacterias que producen contaminación y dejan sabores residuales en el producto final (6, 16). Sin embargo, no existe una técnica aplicable al café pergamino húmedo que reduzca el riesgo sobre la calidad del producto sin afectar la inocuidad, ni generar altos costos de inversión, sin contener aditivos que cambien el aspecto, color y textura natural del producto ni que represente un riesgo para el consumo humano. Actualmente, las prácticas de comercialización de café lavado están relacionadas con el almacenamiento del producto en este estado o con remoción de mucílago incompleta, durante toda la semana en las fincas, para entregarlo finalmente en los puntos de compra, donde el secado tampoco inicia de forma inmediata, por lo tanto, se almacena por un tiempo indeterminado hasta completar la cantidad necesaria para iniciar el secado, aunque el café provenga de diferentes sitios. Estas formas de manejo se han asociado también a prácticas con las cuales se consumen grandes volúmenes de agua, en busca de retardar efectos perjudiciales en la calidad del café antes de la venta. Por lo anterior, se hizo necesario evaluar nuevas alternativas para conservar la inocuidad del café húmedo durante su comercialización.

La aplicación de agua ozonizada en concentraciones relativamente bajas es una técnica eficaz contra la mayoría de los microorganismos, empleando cortos tiempos de contacto. Por ello, el uso del ozono como desinfectante se constituye en una técnica factible y relativamente económica para la conservación de diferentes productos agrícolas (19). Se ha reportado la efectividad de la utilización del ozono en la disminución de la carga microbiana para diferentes frutas, hortalizas y granos (4, 8, 10, 12, 17). Considerando la relativa facilidad de aplicación del ozono y la efectividad comprobada en diferentes productos, incluyendo café, la técnica de ozonización es aplicable al café pergamino húmedo durante su almacenamiento y puede convertirse en una alternativa para mantener la inocuidad del producto.

El presente estudio tuvo como objetivo determinar el efecto de la aplicación de agua ozonizada sobre el crecimiento de tres grupos de microorganismos indicadores de contaminación: aerobios mesófilos, coliformes totales y mohos y levaduras, durante el almacenamiento del café pergamino húmedo en el proceso de comercialización.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las pruebas se realizaron con café Variedad Castillo®, proveniente de la Estación Experimental Naranjal, ubicada en la vereda la Quiebra, del municipio de Chinchiná (Colombia), y el proceso de beneficio húmedo se realizó en el módulo para procesar semilla del Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. La unidad experimental estuvo conformada por 18 kg de café pergamino húmedo, que se almacenó en canecas plásticas de 50 L de capacidad. Se utilizó un diseño factorial completamente aleatorizado 2x4+1 con dos procedimientos (café en agua ozonizada y sin

ozonizar), cuatro tiempos de almacenamiento (24, 48, 72 y 96 h) y un testigo, que correspondió al café pergamino húmedo obtenido después del lavado y secado inmediatamente (control negativo o café sin almacenamiento). De cada tratamiento se realizaron cinco repeticiones. Para los tratamientos en los cuales se aplicó ozono, se utilizó la metodología indicada en la caracterización de la técnica (13), en la cual se aplicó ozono durante 10 min a 5,0 L de agua para obtener agua ozonizada con una concentración de 0,2 mg.L<sup>-1</sup> y lavar el café pergamino húmedo por 15 min, cada 24 h. Para producir el ozono se utilizó el generador Bionic® (Bionic, Tecnología en bioseguridad y medio ambiente, Colombia). Para los tratamientos en los que no se empleó ozono, el café se lavó diariamente con agua sin ozonizar. El proceso de lavado del café, de cada uno de los tratamientos y el almacenamiento del café húmedo, se realizó en el Laboratorio de Ingeniería Agrícola de Cenicafé, a una temperatura de 20±3,0°C y a una humedad relativa de 80%±2,0%. Una vez aplicados los tratamientos correspondientes se tomó una muestra de granos de café para el análisis microbiológico. Las variables de respuesta fueron las unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo (UFC/g) para aerobios mesófilos, coliformes totales y mohos y levaduras, siguiendo los métodos oficiales de AOAC 990.12, el AOAC 991.14 y el AOAC 997.02, respectivamente (2).

**Análisis microbiológico.** Para cada análisis, se esterilizaron los materiales en autoclave por 15 min, a 120°C y 15 psi de presión. La preparación de cada muestra comprendió la adición de agua peptonada a 10 g de café pergamino húmedo de cada tratamiento. Esta mezcla se llevó a agitación a 120 rpm, en un agitador orbital por 2 h. Posteriormente, se tomó una alícuota de 1 mL y se prepararon las

diluciones decimales consecutivas hasta 10<sup>-6</sup>. Debido a que el café pergamino húmedo es una materia prima que no ha sido sometida a ningún tipo de procesamiento, tiene una alta carga microbiana, por lo cual se sembraron las diluciones de 10<sup>-5</sup> y 10<sup>-6</sup>.

La inoculación de las muestras se realizó en placas petrifilm (3M®, USA), que vienen preparadas con los medios específicos para cada grupo de microorganismos, listos para sembrar. Posteriormente, las placas se incubaron por 48±2,0 h a 35±1,0°C para el crecimiento de los aerobios mesófilos y coliformes totales, y entre 20 y 25°C, durante 5 días, para mohos y levaduras según protocolos mencionados anteriormente.

**Análisis de la información.** Se realizó un análisis de varianza con un nivel de confianza del 95% con cada una de las variables de respuesta. La comparación de medias se realizó a través de la prueba DMS de Fisher con un nivel del 95%.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Aerobios mesófilos

Con la identificación de los microorganismos aerobios mesófilos puede determinarse la calidad de la materia prima de un producto alimenticio, problemas en su almacenamiento, su vida útil y la aplicación de buenas prácticas de manufactura, entre otros aspectos (11). En la *Tabla 1* se presentan los resultados para el recuento de aerobios mesófilos. El análisis de varianza mostró efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de este grupo de microorganismos (valor *p*: 0,0034), la prueba DMS no presentó diferencias significativas cuando se comparó el valor promedio obtenido en el testigo y los obtenidos en los tratamientos 1, 2, 3 y 4 donde se aplicó agua ozonizada. Adicionalmente, en el

testigo se obtuvo un valor significativamente menor que los valores medios obtenidos para los tratamientos 5, 6, 7 y 8, donde el café se lavó con agua sin ozonizar, debido a que no se aplicó alguna técnica de desinfección. Lo anterior indica que la aplicación de agua ozonizada al café, bajo las condiciones realizadas en este estudio, cuando va a ser sometido a almacenamiento hasta por 96 h, permite en el café una carga de aerobios mesófilos estadísticamente igual a la obtenida cuando el café es llevado a secado inmediatamente después del lavado en el proceso de poscosecha.

Das y Kim (5) aplicaron agua ozonizada en el almacenamiento de brócoli fresco, con una concentración de 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de ozono, durante 90 y 180 s, obteniendo una reducción significativa en el crecimiento de aerobios en comparación con los valores registrados cuando utilizaron agua sin ozonizar, agua con cloro y agua electrolizada, en los mismos tiempos de aplicación. Estos resultados positivos se atribuyen al poder oxidante del ozono, que se mantuvo gracias al lavado diario y a la dosificación de la misma concentración durante todo el tiempo de almacenamiento. Por lo anterior, cuando se aplica la técnica de agua ozonizada durante varios días de

almacenamiento, debe garantizarse que la concentración y el tiempo de aplicación sean los adecuados, para obtener los mayores resultados de desinfección.

### Coliformes totales

La presencia de coliformes totales indica contaminación cruzada causada por el contacto del café con el suelo, al lavado con aguas contaminadas y por la manipulación inadecuada de los operarios que realizan el proceso de beneficio (14). En la Tabla 2 se presentan los resultados para el conteo de coliformes totales que se obtuvieron durante la aplicación de los tratamientos. El análisis de varianza mostró efecto significativo (valor  $p = 0,0368$ ). La carga media de coliformes totales obtenida en el testigo y en los tratamientos 1, 2, 3 y 4 (agua ozonizada) fue significativamente menor que en los tratamientos en los cuales no se utilizó ozono.

En contraste, la prueba DMS no hubo diferencias significativas (valor  $p = 0,2891$ ) entre los tratamientos en los cuales el café se lavó con agua ozonizada y el testigo, lo que indica que se obtuvo la misma carga microbiana para coliformes totales cuando el café se llevó a secado inmediatamente y

**Tabla 1.** Valores promedio de aerobios mesófilos en todos los tratamientos

Tratamiento	Procedimiento	Tiempo de almacenamiento antes del secado (h)	UFC/g
Testigo	Secado inmediato	0	5,0x10 <sup>6</sup>
1	Agua ozonizada	24	5,184x10 <sup>6</sup>
2		48	5,342x10 <sup>6</sup>
3		72	3,344x10 <sup>6</sup>
4		96	2,670x10 <sup>6</sup>
5	Agua sin ozonizar	24	1,199x10 <sup>7*</sup>
6		48	1,251x10 <sup>7*</sup>
7		72	1,472x10 <sup>7*</sup>
8		96	1,362x10 <sup>7*</sup>

\*Indica diferencias significativas según la prueba de Fisher DMS con el 5,0% de significancia.

cuando se aplicó agua ozonizada diariamente, con una concentración de 0,2 mg.L<sup>-1</sup> durante 15 min y se almacenó a 20°C, por 4 días. Estos resultados demuestran que la aplicación de un desinfectante como el ozono controla el crecimiento de este grupo de microorganismos bajo el periodo de almacenamiento evaluado.

La inactivación de las bacterias por el ozono se atribuye a las reacciones de oxidación (15), considerando además, que según García *et al.* (8), las bacterias coliformes son uno de los grupos de microorganismos más sensibles al poder oxidativo del ozono. Resultados similares fueron reportados por Alexopoulos *et al.* (1) y Das y Kim (5), cuando aplicaron agua ozonizada en mayores concentraciones pero menores tiempos de aplicación en pimentones (0,5 mg.L<sup>-1</sup> de O<sub>3</sub> por 7,0 min) y trozos de brócoli (2,0 mg.L<sup>-1</sup> de O<sub>3</sub> por 3,0 min). Lo anterior evidencia que la aplicación de ozono, cuando se realiza en la concentración y el tiempo adecuados, es efectiva en el control del crecimiento de coliformes totales cuando se aplica a productos perecederos como los granos de café pergamino húmedo.

Aunque en los tratamientos en los que no se aplicó agua ozonizada se obtuvieron valores altos de este grupo de microorganismos, los resultados son menores a los reportados por Peñuela y Oliveros (14\_ENREF\_16), quienes obtuvieron valores máximos de 4,5x10<sup>9</sup> UFC/g en muestras de café pergamino húmedo recolectadas en diferentes puntos de compra; en estos casos no se aplica alguna práctica para conservar el café y el almacenamiento frecuentemente se realiza en los recipientes en los cuales se transporta el café.

### Mohos y levaduras

Los mohos y levaduras son microorganismos que indican condiciones inapropiadas de almacenamiento y de manejo. Se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente y se dispersan fácilmente por el aire y por el polvo (18). Las malas condiciones de almacenamiento de los granos, especialmente en el café pergamino húmedo, hacen posible la presencia de mohos, los cuales aumentan el riesgo de producir micotoxinas y disminuyen la calidad tanto en su apariencia visual como en las cualidades organolépticas de la bebida (3).

**Tabla 2.** Valores promedio, máximo y mínimo para la variable coliformes totales presentes en el testigo y los tratamientos.

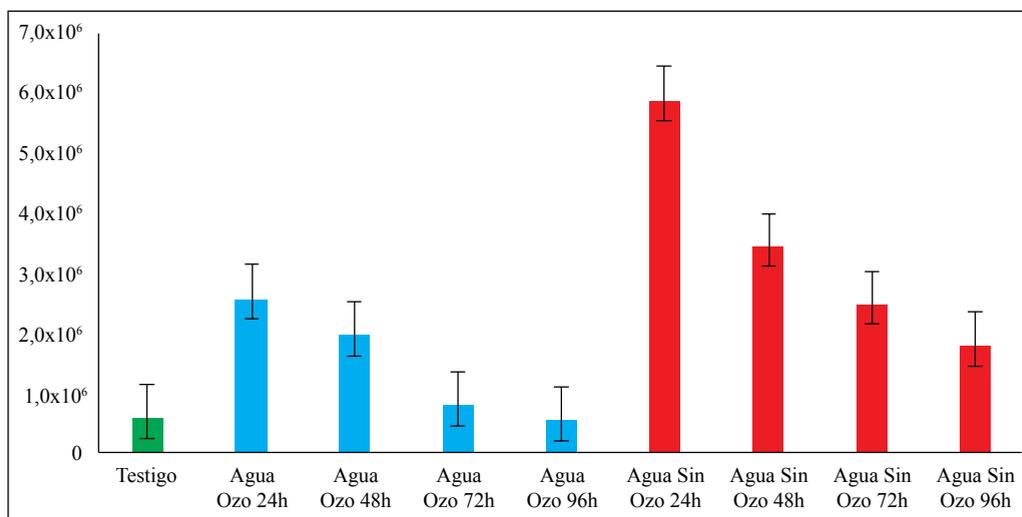
Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (h)	Procedimiento	Promedio (UFC/g)	Máximo (UFC/g)	Mínimo (UFC/g)
Testigo	-	Secado inmediato	2,14 x 10 <sup>5</sup>	6,20 x 10 <sup>5</sup>	9,00 x 10 <sup>4</sup>
1	24	Agua ozonizada	2,97 x 10 <sup>5</sup>	7,05 x 10 <sup>5</sup>	5,00 x 10 <sup>3</sup>
2	48		9,00 x 10 <sup>4</sup>	3,75 x 10 <sup>5</sup>	0,00
3	72		1,20 x 10 <sup>4</sup>	2,00 x 10 <sup>4</sup>	0,00
4	96		1,17 x 10 <sup>5</sup>	2,50 x 10 <sup>5</sup>	3,00 x 10 <sup>4</sup>
5	24	Agua sin ozonizar	9,07 x 10 <sup>5</sup>	1,78 x 10 <sup>6</sup>	2,80 x 10 <sup>5</sup>
6	48		4,83 x 10 <sup>5</sup>	1,02 x 10 <sup>6</sup>	1,35 x 10 <sup>5</sup>
7	72		6,23 x 10 <sup>5</sup>	1,01 x 10 <sup>6</sup>	1,30 x 10 <sup>5</sup>
8	96		1,16 x 10 <sup>6</sup>	1,87 x 10 <sup>6</sup>	8,90 x 10 <sup>5</sup>

En la Figura 1 se presenta el comportamiento de esta variable respecto a los tratamientos evaluados. El análisis de varianza mostró efecto de tratamientos (valor  $p$ : 0,0480). Cuando se comparó el promedio obtenido en el testigo ( $0,767 \times 10^6$  UFC/g) con los valores de mohos y levaduras de los tratamientos donde se aplicó agua ozonizada no hubo diferencia significativa (valor  $p$ : 0,4369), es decir, se controló el contenido de mohos y levaduras en el café pergamino húmedo cuando se aplicó agua ozonizada como técnica de conservación durante el almacenamiento. Por otra parte, los valores obtenidos en los tratamientos donde no se utilizó ozono fueron mayores significativamente al obtenido en el testigo. Adicionalmente, se observa la disminución de la población de este grupo de microorganismos en el café a medida que avanza el tiempo de almacenamiento con la aplicación del agua ozonizada, indicando un efecto residual del ozono sobre mohos y levaduras.

Los datos obtenidos indican que si no se aplica una técnica de desinfección durante el almacenamiento, el café pergamino húmedo se expone al riesgo de contaminación debido al crecimiento de hongos que pueden generar micotoxinas como la ocratoxina.

En el presente trabajo se cuantificaron tres grupos de microorganismos durante el almacenamiento del café pergamino húmedo, con el fin de evaluar la técnica de conservación empleando agua ozonizada. Se puede concluir que no hubo diferencia estadística entre la carga obtenida de microorganismos aerobios mesófilos, coliformes totales y mohos y levaduras, cuando los granos húmedos se secaron inmediatamente luego del beneficio y cuando el café se almacenó durante 4 días con aplicación de agua ozonizada como técnica de conservación.

Estos resultados demuestran que la aplicación diaria de agua ozonizada en una concentración de  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  por 15 min,



**Figura 1.** Comportamiento durante el tiempo de almacenamiento de la cantidad de mohos y levaduras, para los tratamientos y el testigo. Las barras indican el error estándar.

permite el control del crecimiento microbiano de los grupos indicadores evaluados durante 4 días de almacenamiento. La aplicación de ozono se convierte en una alternativa de conservación de fácil implementación en los puntos de compra, para mantener la inocuidad del producto durante la comercialización de café húmedo.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a al Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé, y al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias, por la financiación del proyecto. Igualmente, los autores expresan su agradecimiento a la doctora Carmen Dussan, profesora del Departamento de Matemáticas de la Universidad de Caldas por su asesoría estadística y al Lic. Rafael Rodríguez del Laboratorio de Recursos Naturales de Cenicafé por su asesoría en los análisis microbiológicos.

## LITERATURA CITADA

- ALEXOPOULOS, A.; PLESSAS, S.; CECIU, S.; LAZAR V. Evaluation of ozone efficacy on the reduction of microbial population of fresh cut lettuce (*Lactuca sativa*) and green bell pepper (*Capsicum annuum*). *Food control* 30(2):491-496. 2013.
- AOAC. Official and tentative methods of analysis of the AOAC. 5a. ed. Washington : AOAC, 2005. 757 p.
- BATISTA, L.R.; CHALFOUN, S.M.; SILVA, C.F.; CIRILLO, M.; VARGA, E.A.; SCHWAN, R.F. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. *Food control* 20(9):784-790. 2009.
- CASTRO, N.; QUISPE, A. Efecto del ozono en los sistemas de higienización de frutas y hortalizas de los laboratorios especializados de la FIIA UNASAM. *Aporte santiaguino* 3(1):47-52. 2010.
- DAS, B.; KIM, J. Microbial quality and safety of fresh cut broccoli with different sanitizers and contact times. *Microbiology and biotechnology* 20(2):363. 2010.
- FAO. Directrices para prevenir la formación de moho en el café. Roma : FAO, 2005. 251 p.
- FAO. Buenas prácticas de higiene en la cadena de café: Recurso para la capacitación para los países productores de café. Roma : FAO, 2006.
- GARCIA, A.B.; GUERRERO, N.; ALZAMORA, S.M. Inactivation kinetics and growth dynamics during cold storage of *Escherichia coli* ATCC 11229, *Listeria innocua* ATCC 33090 and *Saccharomyces cerevisiae* KE162 in peach juice using aqueous ozone. *Innovative food science & emerging technologies* 29:271-279. 2015.
- JHA, S.N. Food safety and quality. p. 1-24. En: *Rapid detection of food adulterants and contaminants*. San Diego : Academic press, 2016.
- KARACA, H.; VELIOGLU, Y.S. Ozone applications in fruit and vegetable processing. *Food reviews international* 23(1):91-106. 2007.
- MARTINEZ, M. Análisis microbiológico de alimentos: Microorganismos marcadores. Manizales : Universidad de Caldas, 2011. 54 p.
- NASCIMENTO, C.; LIMA, C.; PICOLLI, R.; FIORINI, J.; DUARTE, S.; SILVA, J.M.; OLIVEIRA, N.; VEIGA, S. Ozonio e ultra-som: Processos alternativos para o tratamento do café despulpado. *Ciência e tecnologia de alimentos* 28(2):282-294. 2008.
- PABÓN U., J.P. Efecto de la aplicación de agua ozonizada en la conservación de café pergamino húmedo durante el proceso de comercialización. Manizales : Universidad de Caldas. Facultad de Ingenierías, 2014. 86 p. -- Tesis: Magister en ingeniería de alimentos.
- PEÑUELAM., A.E., OLIVEROST., C.E. Evaluación de técnicas de conservación del café húmedo: Informe. Manizales : Cenicafé, 2013. 70 p.
- PRIYANKA, B.; RASTOGI, K.; TIWARI, B. Opportunities and challenges in the application of ozone in food processing. p. 335-358. En: *Emerging technologies for food processing*. San Diego : Academic press, 2014.
- PUERTA Q., G.I. La humedad controlada del grano preserva la calidad del café. Manizales : Cenicafé. 2006. 8 p. (Avances Técnicos No. 352).

17. SUNG, H.J.; SONG, W.J.; KIM, K.P.; RYU, S.; KANG, D.H. Combination effect of ozone and heat treatments for the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* in apple juice. International journal of food microbiology 171:147-153. 2014.
18. TORTORA, G.; BERDELL, F.; CASE, C. Microbiology an introduction. San Francisco : Pearson education, 2010.
19. ZHANG, L.; LU, Z.; YU, Z.; GAO, X. Preservation of fresh-cut celery by treatment of ozonated water. Food control 16(3):279-283. 2005.