

# MICROBIOLOGÍA DE LA FERMENTACIÓN DEL MUCÍLAGO DE CAFÉ SEGÚN SU MADUREZ Y SELECCIÓN

Gloria Inés Puerta Quintero\*; Javier Marín Mejía\*; Gabriel Angel Osorio Betancur\*\*

## RESUMEN

**PUERTA Q., G.I.; MARÍN M., J., OSORIO B., G.A. Microbiología de la fermentación del mucílago de café según su madurez y selección. Revista Cenicafé 63(2): 58-78. 2012**

Dado el potencial del mucílago de café como sustrato en fermentaciones industriales, es necesario conocer la cinética de los microorganismos involucrados en la fermentación del mucílago de café. En esta investigación se identificaron y cuantificaron las bacterias y levaduras del mucílago de *Coffea arabica*, fresco y fermentado hasta por 74 horas, a temperatura ambiente y en sistemas abiertos. El mucílago fue obtenido mecánicamente a partir de tres calidades y procesos de café, así: frutos maduros y granos clasificados por zaranda después del despulpado; frutos no seleccionados y granos clasificados por zaranda después del despulpado; frutos no seleccionados y granos no clasificados después del despulpado. Se hallaron *Lactobacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Torulopsis*, *Rhodotorula* y *Cryptococcus* en el mucílago de café sin fermentar y se contaron de  $69 \times 10^5$  a  $357 \times 10^5$  colonias mesófilas por gramo y de  $14 \times 10^5$  a  $38 \times 10^5$  levaduras; los mayores recuentos se encontraron en el mucílago de café obtenido de frutos maduros y granos seleccionados. Las bacterias *Lactobacillus* predominaron en el mucílago fresco y fermentado de las tres calidades, aunque en el maduro el crecimiento fue mayor hasta alcanzar un recuento máximo a las 44 h. Con el tiempo de la fermentación del mucílago de café la cantidad de microorganismos aerobios alcanzó valores de  $74 \times 10^5$  a  $96 \times 10^5$ , a las 74 h. Los coliformes se redujeron debido a la acidificación del medio. A las 20 h se contaron  $34 \times 10^5$  levaduras, estos recuentos aumentaron significativamente hasta  $150 \times 10^5$ , después de las 68 h, con respecto a los tiempos previos.

**Palabras clave:** Beneficio húmedo, *Lactobacillus*, levaduras, *Enterobacteriaceae*, cinética.

## ABSTRACT

Given the potential of the mucilage of coffee as a substrate in industrial fermentations, it is necessary to know the kinetics of the microorganisms involved in the fermentation of the mucilage of coffee. This research quantified and identified bacteria and yeasts of the mucilage from *Coffea arabica*, fresh and fermented for up to 74 hours at room temperature and in open systems. The mucilage was mechanically obtained from three qualities and processes of coffee: ripe fruits and grains classified by sieve after pulping, not selected fruits and grains classified by sieve after pulping, not selected fruits and grains unclassified after pulping. *Lactobacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Flavobacterium*, *Escherichia*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Torulopsis*, *Rhodotorula* and *Cryptococcus* were found in unfermented coffee mucilage and counted from  $69 \times 10^5$  to  $357 \times 10^5$  mesophilic colonies per gram and  $14 \times 10^5$  to  $38 \times 10^5$  yeasts, higher counts were found in the coffee mucilage obtained from selected ripe fruits and grains. The *Lactobacillus* bacteria predominated in fresh and fermented mucilage of the three qualities, but in the mature growth was greater to a maximum count at 44 hours. Over time of fermentation of coffee mucilage amount of aerobic microorganisms reached values from  $74 \times 10^5$  to  $96 \times 10^5$  at 74 hours. Coliforms were reduced due to acidification of the medium. At 20 hours  $34 \times 10^5$  yeasts were counted and after 68 hours these counts were significantly increased compared to previous times, to  $150 \times 10^5$ .

**Keywords:** wet processing, *Lactobacillus*, yeasts, *Enterobacteriaceae*, kinetics.

\* Investigador Científico III. Disciplina de Calidad, Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Manizales, Caldas, Colombia

\*\* Bacteriólogo y Laboratorista Clínico, respectivamente. Universidad Católica de Manizales

Las fermentaciones son procesos catabólicos de oxidación de sustancias orgánicas, principalmente azúcares que se transforman en energía y en compuestos más simples como etanol, ácido láctico, ácido acético y ácido butírico. Estos procesos son desarrollados por las enzimas naturales que producen las bacterias y levaduras presentes en los sustratos. Los productos de las fermentaciones dependen del tipo de bacterias y levaduras, de la composición del sustrato y de las condiciones externas (19, 30).

El café Arábica de Colombia se procesa en las fincas mediante el beneficio húmedo que comprende varias etapas. En la primera, se retira la pulpa del fruto en la operación de despulpado, luego se remueve el mucílago mediante el desmucilagador o por la fermentación natural, después con el lavado se retiran los productos de degradación del mucílago, y finalmente, en el secado se reduce la cantidad de agua del grano pergamino. Para asegurar la buena calidad e inocuidad del café se recomienda la aplicación de buenas prácticas de higiene y agricultura en los procesos del café en la finca (17, 20, 21, 22).

Debido a las condiciones climáticas de las zonas cafeteras colombianas, en un cafetal se pueden encontrar diversos estados de maduración del fruto al momento de la cosecha y no es posible recolectar solo frutos maduros. Por consiguiente, para homogeneizar la calidad de la materia prima y controlar el proceso, se requiere realizar en el beneficio operaciones de separación de impurezas, frutos y granos verdes, secos y severamente brocados y deteriorados, así: en el recibo para clasificar y seleccionar el fruto maduro y sano; y en la etapa del despulpado para obtener granos de café en baba de mejor calidad, que pasarán al desmucilagador o a la fermentación (17). Para estas selecciones

se separadores hidráulicos, tanques sifón, zarandas de motor, zarandas manuales, y separaciones manuales, entre otras (26).

Como producto vegetal, los frutos de café y sus partes contienen determinados microorganismos. De esta forma, en el mucílago de café se encuentran naturalmente bacterias y levaduras que se adaptan a la composición química y acidez de este sustrato y a las condiciones como la temperatura externa. Además, su carga microbiana se puede modificar por el contacto con el aire, suelos, aguas, animales, insectos, superficies y por la manipulación del grano de café por las personas.

En la literatura se reportan varios trabajos sobre los microorganismos presentes en la fermentación del café, así: en Colombia, Scharrer (29) sugirió que la degradación del mucílago de café se debe a levaduras; Frank *et al.* (8), Pee y Castelein (16) y Castelein y Pilnik (7), indicaron que los siguientes microorganismos de la fermentación del café producen pectinasas: *Erwinia dissolvens*, *E. herbicola*, *E. paracolobactrum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia sp.*, *Saccharomyces marxianus*, *S. bayanus*, *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* y *Schizosaccharomyces* ssp.

Archila (1) contó los aerobios mesófilos, hongos, levaduras, *Enterococcus* y *Streptococcus* en frutos de café, café en baba, café fermentado, aguas de despulpado y aguas de lavado de una finca cafetera de Cundinamarca e indicó que la manipulación del café, la cosecha y el transporte “contaminan el grano” y que en la fermentación proliferan varios microorganismos, pero que en el agua residual no se encontraron patógenos debido al pH ácido, de 3,72 a 4,53 en aguas de despulpado y de 3,73 a 4,21 en aguas de lavado.

López *et al.* (13) analizaron microorganismos y ácidos orgánicos en frutos de café que se almacenaron antes de beneficio, en granos durante la fermentación y en granos pergamino almacenados por 9 meses, a 20°C y 75% de humedad relativa y a 30°C y 85% de HR. Estos autores observaron que en el almacenamiento de los frutos de café se promueve la fermentación por levaduras y bacterias anaerobias, así como en la fermentación natural donde se producen diferentes ácidos carboxílicos; también detectaron bacterias anaerobias y levaduras en granos fermentados al inicio del almacenamiento, pero con el tiempo, en lugar de levaduras encontraron hongos.

En los granos de café en fermentación, Puerta *et al.* (24) identificaron levaduras y bacterias lácticas como microorganismos predominantes, registrando que estas bacterias acidifican el medio impidiendo la proliferación de hongos.

En México, Avallone *et al.* (4), en fermentaciones de granos de café identificaron a *Erwinia* y *Klebsiella*, las cuales además crecieron en medio de pectina de manzana; así mismo identificaron a *Leuconostoc mesenteroides* como bacteria láctica predominante y también hallaron *Lactobacillus brevis*. Como levaduras encontraron *Cryptococcus laurentii*, *Cryooccus albidus*, *Kloeckera apiculata* y *Candida guilliermondii*.

Avallone *et al.* (3), hallaron pectatoliasas producidas por *Erwinia herbicola* y *Klebsiella pneumoniae* con actividad óptima a pH de 8,5, mas no a los valores de pH de la fermentación del café (5,3 a 3,5); indicaron que *Leuconostoc mesenteroides* no produjo enzimas pécticas y que *Lactobacillus brevis* no es muy frecuente en la fermentación, aunque sí produjo poligalacturonasas. Así

mismo, afirmaron que la degradación del mucílago parecía estar correlacionada con la acidificación y no con actividad péctica.

Masoud *et al.* (14) analizaron por ITS-PCR y electroforesis (DGGE) las levaduras de frutos, granos despulpados, granos de fermentaciones de 1 y 2 días, granos lavados y granos en secado de café Arábica de Tanzania, con recuentos en el rango de  $4,0 \times 10^4$  a  $5,0 \times 10^7$  UFC/g, y reportaron varias levaduras en el café: *Pichia kluyveri* predominante en la fermentación y secado, *Hanseniaspora uvarum* predominante durante la fermentación, en tanto que *Kluyveromyces marxianus*, *Candida pseudointermedia*, *Issatchenkia orientalis*, *Pichia ohmeri* y *Torulaspora delbrueckii* se encontraron en concentraciones inferiores a 103 UFC/g de café. *Pichia anomala* se encontró en los frutos de café, en la pulpa y en el primer día de fermentación, en el rango de  $1,0 \times 10^3$  a  $3,0 \times 10^4$  UFC/g. Es de anotar que no aislaron en los cultivos *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida xestobii*, pero sí las detectaron por la electroforesis.

En cuando a sus componentes químicos, el mucílago de café es una sustancia viscosa que contiene en promedio de 90% de agua, 8,5% de carbohidratos, 0,9% de proteínas, 0,1% de lípidos y trazas de minerales y de ácidos y alcoholes (25). A su vez, los carbohidratos del mucílago de café se componen de 47,9% de azúcares reductores, 29,8% de azúcares no reductores, 7,3% de fibra y 15,0% de sustancias pécticas.

Dado el potencial de uso del mucílago de café como sustrato de fermentaciones industriales, es necesario conocer los microorganismos predominantes y la cinética microbiana durante la fermentación del mucílago de café Arabica de Colombia. Es así como en esta investigación se cuantificaron e identificaron

las bacterias y levaduras del mucílago de café fresco y fermentado hasta 74 horas, a temperatura ambiente y en sistemas abiertos. Se compararon los microorganismos de mucílago obtenido mecánicamente de tres calidades de café: Frutos de café maduros despulpados, a los cuales sus granos se clasificaron por zaranda y luego se desmucilaginaron; frutos de café sin selección, cuyos granos despulpados se clasificaron por zaranda y se desmucilaginaron; y frutos sin selección, los cuales se despulparon y desmucilaginaron sin selección.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Localización.** El experimento se realizó en Cenicafé, localizado a 05° 00' latitud Norte, 75° 36' longitud Oeste y 1.310 m de altitud, con temperatura media 21,0°C, temperatura máxima 27,6°C, temperatura mínima 16,8°C y humedad relativa 77%.

**Origen del café.** Se procesaron muestras de *Coffea arabica* L. de la variedad Colombia fruto rojo. El café fue cultivado en lotes experimentales de la Estación Naranjal en Chinchiná, localizada a 04° 58' latitud Norte, 75° 39' longitud Oeste, 1.381 m de altitud, con temperatura media 20,9°C, humedad relativa del 78%, precipitación total anual de 2.782 mm, con 229 días de lluvia y 1.763 horas de brillo solar.

**Beneficio del café.** Se recolectaron frutos de café en forma selectiva, para obtener frutos maduros que se despulparon y pasaron por zaranda de motor y por desmucilaginado mecánico, en un equipo de 600 kg.h<sup>-1</sup> de café cereza, con un flujo de agua de 1,6 L.min<sup>-1</sup>, para obtener el mucílago. Una parte de los frutos de café cosechados sin selección se pasó por el mismo desmucilaginado y la misma zaranda de motor y otra se despulpó y desmucilagino seguidamente, usando los

mismos equipos, pero ningún equipo de clasificación del grano de café.

**Fermentación.** Para cada tipo de muestra se fermentaron 50 kg del mucílago de café, en canecas cilíndricas de plástico, de 37,5 cm de diámetro interno x 50 cm de altura, previamente lavadas con agua potable; los procesos de fermentación se desarrollaron en ambiente externo, en sistemas discontinuos (*batch*), estáticos y abiertos. Durante los días de ejecución de esta investigación, la temperatura del aire varió de 15,4 a 30,5°C (promedio 20,5°C), humedad relativa de 81,7% (37,0% a 98,0%), según datos climáticos de la estación meteorológica de Cenicafé.

**Análisis de las muestras.** En cada tiempo de fermentación se recolectaron 100 g de mucílago mediante recipientes asépticos, guantes de laboratorio y asas e instrumentos previamente esterilizados. La muestra inicial, en el tiempo cero, estuvo constituida en forma compuesta de la primera descarga de mucílago, de la parte intermedia y de la parte final; las muestras de los siguientes tiempos de fermentación se recolectaron de cada fermentador en forma compuesta. Las muestras se conservaron a 4°C hasta su análisis. De cada muestra se pesaron 50 g de mucílago y se aforaron a 500 mL con agua destilada estéril, dilución al 10% p/v, a partir de esta solución se realizaron diluciones consecutivas, desde 10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-6</sup> con agua estéril.

**Siembra e incubación.** Para el crecimiento de bacterias, por duplicado, se sembraron 0,01 mL de las diluciones 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup> en cajas con agar sangre, y 0,1 mL de las diluciones 10<sup>-3</sup> a 10<sup>-5</sup> en medio agar *plate count*; ambos se incubaron a 37°C bajo oscuridad continua, por 48 horas. Para hongos y levaduras se sembraron 0,1 mL de las diluciones 10<sup>-3</sup> a

10<sup>-5</sup>, cada una en tres cajas de agar saboraud dextrosa acidificado con ácido láctico al 44%, y se incubaron a temperaturas entre 22 a 25°C, durante 3 a 5 días.

Para los coliformes totales, se sembraron por triplicado muestras de 1 mL de las diluciones 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-3</sup> en tubos de caldo lauril sulfato triptosa, que se incubaron a 37°C bajo oscuridad continua, durante 48 horas. Para los coliformes fecales se tomó el tubo positivo más representativo de los coliformes fecales y de éste se sembraron dos a tres lupas por triplicado, en tubos con caldo lactosado verde bilis brillante. Al mismo tiempo, cada tubo positivo se inoculó en agua triptona, para verificar la producción de indol; los tubos se incubaron a 45°C en oscuridad continua durante 48 horas.

Todas las siembras se efectuaron en cámara de flujo laminar. También se realizó un control ambiente con los correspondientes medios de cultivo y condiciones de incubación para las bacterias, hongos y levaduras. Las colonias presentes en los controles ambientes se restaron de los recuentos obtenidos de las siembras.

**Recuentos.** Se contaron las colonias de bacterias aerobias mesófilas del *plate count* agar y los hongos y levaduras de características morfológicas similares en cada medio y caja. Luego, se cuantificaron los microorganismos, según los volúmenes sembrados y las diluciones; los resultados se expresaron en unidades formadores de colonia por gramo de mucílago (UFC/g).

Para el recuento de los coliformes totales y fecales, se tomaron los tubos que mostraron producción de gas o turbidez correspondientes a una misma dilución. Los resultados se expresaron como el número más probable por gramo de muestra (NMP/g), según la tabla de McCrady (28).

**Aislamiento e identificación.** Las colonias representativas de las bacterias se sembraron en agar sangre. La identificación se efectuó mediante colorantes para determinar tinción y morfología, con pruebas bioquímicas específicas para las no fermentadoras y fermentadoras, como catalasa, oxidasa, indol, movilidad, citrato Simmons, urea, oxidación fermentación, triple azúcar hierro, rojo de metilo, nitratos, lisina hierro y bilis esculina, entre otras. También se usaron los *kits BBL Crystal* para identificación de bacterias entéricas.

Las levaduras y hongos se aislaron en agar saboraud dextrosa y papa dextrosa acidificado. Los métodos de identificación de las levaduras incluyeron pruebas bioquímicas de asimilación de azúcares y fermentación mediante *kits Minitek*. Además, se realizaron pruebas de presencia del tubo germinal, formación de clamidosporas, consumo de urea, formación de nitratos, formación de pseudohifas y crecimiento a 37°C, entre otras.

Para el aislamiento de los coliformes fecales se repicaron los tubos positivos en caldo verde bilis brillante, en medios selectivos eosina azul de metileno, xilosa lisina desoxicolato y MacConkey, además, se efectuaron otras pruebas bioquímicas específicas para su identificación.

**Diseño experimental.** Se evaluaron dos factores: El efecto de la calidad del mucílago y del tiempo de fermentación, así, tres calidades de mucílago proveniente de 1. Frutos cosechados maduros y granos despulpados clasificados por zaranda, 2. Frutos de café sin selección y granos despulpados clasificados por zaranda, y 3. Frutos sin selección y granos sin clasificación; por diez tiempos de fermentación para el café maduro y para el café sin selección y sin zaranda (0, 4, 8, 20, 26, 31, 44, 52, 68 y 74 horas ) y seis tiempos de fermentación para el café sin

selección y con zaranda (0, 4, 8, 20, 26, 31 y 44 horas). El experimento se repitió tres veces, para un total de 78 muestras analizadas.

**Variables medidas.** Recuentos de bacterias mesófilas, hongos y levaduras, coliformes totales y fecales. Microorganismos identificados en cada muestra.

**Análisis de resultados.** Se determinaron el promedio y la desviación típica para cada variable en cada tiempo de fermentación, para cada calidad de mucílago de café fermentado. Además, se compararon los promedios entre los tiempos y entre las calidades del mucílago fermentado, mediante la prueba Duncan, con un intervalo de confianza del 95%. También se estimó la frecuencia de las bacterias y levaduras identificadas en cada tiempo, con respecto a cada grupo de microorganismos. Además, se desarrollaron curvas de ajuste para la cinética del crecimiento en el tiempo de las bacterias y levaduras en el mucílago fermentado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Aerobios mesófilos.** En este recuento se estimó la cantidad de microorganismos, principalmente bacterias, que requieren oxígeno para su desarrollo y crecen a temperaturas entre 20 y 40°C, óptimamente entre 30 y 40°C, en el tiempo de 48 horas establecido en este análisis. Estos recuentos pueden incluir levaduras, pero no hongos, los cuales requieren de más tiempo para su desarrollo.

En los recuentos no se especifican los tipos de microorganismos, sin embargo, son varias especies de las bacterias mesófilas, gram-positivas y frecuentes en plantas, que pueden crecer en este medio, que incluyen *Staphylococcus* (anaerobia facultativa), *Streptococcus* (aerotolerante

anaerobia), *Leuconostoc mesenteroides* (anaerobia facultativa), *Micrococcus* (aerobia), *Bacillus* (aerobia o anaerobia facultativa) y *Lactococcus* (anaerobia facultativa). Además, bacterias gram-negativas fermentadoras de la lactosa de la familia *Enterobacteriaceae* (anaerobias facultativas) como *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Citrobacter*; también las aerobias *Pseudomona*, *Flavobacterium*, *Acetobacter*, *Acinetobacter*.

En la Tabla 1 se presentan los valores promedio de los recuentos de aerobios mesófilos determinados en las tres calidades de mucílago de café fresco y durante los tiempos de fermentación. No hubo diferencias significativas al nivel del 5% en la variable aerobios mesófilos, ni entre los tiempos de fermentación para una misma calidad de mucílago, ni entre las calidades de mucílago para un mismo tiempo. Sin embargo, se observó que la mayor cantidad de aerobios mesófilos inicial la presentó el mucílago del café maduro clasificado con la zaranda, seguida de los recuentos en el mucílago del café obtenido de frutos no seleccionados, cuyos granos sí se clasificaron por la zaranda. Este comportamiento puede deberse tanto a la manipulación de los frutos y granos como a factores externos y ambientales desde la cosecha hasta el beneficio del café. Por lo tanto, el recuento de aerobios mesófilos en el mucílago de café fresco puede ser un indicador de la calidad y manipulación del sustrato a fermentar.

En este estudio, el mucílago de café fresco presentó entre  $69 \times 10^5$  y  $357 \times 10^5$  colonias de bacterias mesófilas. Con el tiempo de fermentación la cantidad de aerobios mesófilos del mucílago de café presentó algunas variaciones, sobre todo en el sustrato maduro y clasificado; en general, a las 20 horas (h) de fermentación el mucílago

**Tabla 1.** Promedios del recuento de los microorganismos aerobios mesófilos en cada calidad del mucílago de café, durante la fermentación a temperatura ambiente.

Tiempo de fermentación (horas)	Microorganismos aerobios mesófilos UFC x 10 <sup>5</sup> /g mucílago de café					
	Maduro con zaranda		Sin selección con zaranda		Sin selección sin zaranda	
	Promedio	Desviación típica	Promedio	Desviación típica	Promedio	Desviación típica
0	357 a	274	270 a	26	69 a	62
4	218 a	182	147 a	32	56 a	23
8	243 a	148	377 a	235	106 a	11
20	275 a	214	554 a	555	108 a	16
26	247 a	138	-	-	91 a	51
31	309 a	253	457 a	499	67 a	37
44	288 a	247	476 a	455	29 a	6
52	189 a	229	-	-	44 a	46
68	55 a	49	-	-	69 a	84
74	74 a	56	-	-	96 a	115

Valores promedio con letras distintas entre tiempos, para cada calidad de mucílago de café procesado, indican diferencias estadísticas, Duncan al 5%.

presentó de  $108 \times 10^5$  a  $275 \times 10^5$  de bacterias y a las 74 h de  $74 \times 10^5$  a  $96 \times 10^5$ , mientras que Puerta *et al.* (24) reportaron de  $100 \times 10^5$  a  $300 \times 10^5$  de colonias aerobias a las 4 h de fermentación por gramo de café en baba. Por su parte, Avallone *et al.* (4), reportaron  $250 \times 10^5$  colonias de microorganismos totales por mililitro de mucílago de café al inicio de una fermentación y  $1.350 \times 10^5$  a las 15 h.

En productos fermentados es normal que estos recuentos aumenten con el tiempo de proceso, a su vez, la disminución posterior se debe al consumo de sustrato y al cambio de las condiciones del sustrato, el cual se acidifica con la fermentación (25).

**Coliformes.** Los coliformes son bacterias gram-negativas aerobias y anaerobias facultativas de la familia *Enterobacteriaceae* que no forman endosporas, poseen forma de bacilo y crecen a temperaturas entre 31 y 37°C. Los coliformes totales se encuentran en suelos, vegetales, aguas, alcantarillas, tracto intestinal y comprenden los géneros *Escherichia*,

*Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Hafnia*, *Klebsiella* y *Proteus*, entre otras.

Por su parte, *Escherichia coli* es la bacteria más representativa de los coliformes fecales, hace parte de la población bacteriana de los intestinos de los humanos y animales de sangre caliente, y por lo tanto, se usa como principal microorganismo indicador de contaminación fecal del agua y de los alimentos (6, 10, 30).

En las Tablas 2, 3 y 4 se presentan los valores promedio de los recuentos de coliformes totales y fecales en el mucílago de café y las diferencias estadísticas en los recuentos de estas bacterias entre los tiempos de fermentación, para cada calidad de mucílago. La cantidad de coliformes totales (NMP/g) en el mucílago de café disminuyó con el tiempo de fermentación, con algunas diferencias significativas entre tiempos para una misma calidad de mucílago. Por el contrario, para esta variable no se detectaron diferencias significativas entre las calidades

de mucílago de café, para un mismo tiempo de fermentación.

Se destacó el número elevado de coliformes fecales en el mucílago fresco de las tres calidades, así como a las 4 h en el mucílago que se clasificó con la zaranda, valores que resultaron significativamente mayores a los determinados en las siguientes horas de fermentación. Por el contrario, en el mucílago de café sin selección y no manipulado por zaranda, solo se detectó 0,001% y 0,004% de *E. coli* con respecto a los totales en el mucílago fresco y a las 4 h, posteriormente no se detectaron coliformes fecales en este tipo de mucílago.

De otra parte, al comparar los conteos de coliformes fecales de las tres diferentes calidades de mucílago se encontraron diferencias significativas hasta las 8 h de fermentación, así: a las 4 h el recuento de coliformes fecales en el mucílago de café sin selección y con zaranda fue significativamente mayor que los presentes en los otros tipos de mucílago y a las 8 h las diferencias fueron

significativas entre los mucílagos de café sin seleccionar, con un valor mayor en el mucílago clasificado por la zaranda.

En el mucílago de café se identificaron bacterias coliformes totales de los géneros *Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella*. *E.coli* se halló como único coliforme fecal en el mucílago de café y estuvo presente hasta las 4 h en el material sin selección, hasta las 20 h en el mucílago de café sin selección, pero clasificado con zaranda, y hasta las 31 h en el sustrato maduro y clasificado con zaranda.

Las bacterias *Enterobacter* realizan fermentaciones ácido-mixtas con la producción de ácido fórmico, H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, ácido acético y etanol y también butanodiólica con la producción de 2,3 butanodiol (butilenglicol) y acetoina. Por su parte, *Escherichia coli* produce ácido fórmico, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> y las *Klebsiella* realizan fermentaciones butanodiólicas (11, 12, 30).

Los coliformes pueden ser parte de los microorganismos normales del mucílago,

**Tabla 2.** Promedios de la cantidad de las bacterias coliformes totales y fecales en mucílago de café obtenido de frutos maduros y granos despulpados clasificados, durante la fermentación a temperatura ambiente.

Mucílago de café maduro y clasificado después del desulpado			
Tiempo de fermentación horas	Coliformes totales (NMP/g) (Promedio)	Coliformes fecales (NMP/g) (Promedio)	Coliformes fecales/ totales %
0	99.999 a	33.766 a	33,77
4	99.999 a	241 b	0,24
8	33.566 ab	76 b	0,23
20	66.679 ab	50 b	0,08
26	66.679 ab	30 b	0,05
31	33.707 ab	67 b	0,20
44	67.033 ab	0 b	0,00
52	33.530 ab	0 b	0,00
68	763 b	0 b	0,00
74	33.707 ab	0 b	0,00

Valores promedio con letras distintas entre tiempos, para las variables coliformes totales y fecales, indican diferencias estadísticas, Duncan al 5%.



**Tabla 3.** Promedios de la cantidad de las bacterias coliformes totales y fecales en mucílago de café obtenido de frutos sin selección y granos despulpados clasificados, durante la fermentación a temperatura ambiente.

<b>Mucílago de café sin selección y clasificado después de despulpado</b>			
<b>Tiempo de fermentación horas</b>	<b>Coliformes totales (NMP/g) (Promedio)</b>	<b>Coliformes fecales (NMP/g) (Promedio)</b>	<b>Coliformes fecales/ totales %</b>
0	99.999 a	50.006 a	50,03
4	99.999 a	67.033 a	67,03
8	33.666 ab	200 b	0,59
20	33.666 ab	15 b	0,05
31	463 b	0 b	0,00
44	33.766 ab	0 b	0,00

Valores promedio con letras distintas entre tiempos, para las variables coliformes totales y fecales, indican diferencias estadísticas, Duncan al 5%.

debido a la manipulación del fruto de café en las labores en el campo, sin embargo, el mayor número de coliformes fecales en el mucílago de café obtenido de granos clasificados se atribuye a la manipulación en esta etapa, a los equipos, a la exposición del sustrato al medio ambiente, a través de los insectos que pueden inocular este tipo de microorganismos.

Cabe recalcar nuevamente la importancia de realizar un buen mantenimiento e higiene a las instalaciones, personal, ambientes y equipos del beneficio del café incluyendo las zarandas, para que las operaciones de clasificación en el beneficio no se conviertan en un factor aportante de microorganismos contaminantes, que puedan alterar los procesos de fermentación y degradación del mucílago, y deteriorar la calidad e inocuidad del grano de café.

Al inicio del proceso de fermentación, los coliformes aprovecharon los azúcares del mucílago de café para obtener energía. Sin embargo, con el transcurrir del tiempo de fermentación cambió la temperatura, bajó el pH, aumentó la acidez del sustrato, y como consecuencia, disminuyó la proliferación de coliformes totales y fecales en el mucílago de café.

En la Tabla 5 se observa el recuento de bacterias que crecieron en el medio agar sangre, las cuales se identificaron como *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas cepacia*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium odoratum*, además, *Listeria* (anaerobia facultativa y *Lactobacillus* (microaerófila).

La cantidad de estas bacterias en el mucílago de café obtenido de frutos sin selección y granos no clasificados por la zaranda resultó menor que los recuentos encontrados en las muestras clasificadas, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas entre calidades de mucílago de café fermentado, para algún tiempo de fermentación. Sin embargo, resultó notorio el mayor recuento de estas bacterias en el café maduro y clasificado, que puede deberse a la mayor cantidad del sustrato en este grano (25) y también a la manipulación del café con las manos y con la zaranda.

Por el contrario, se observaron diferencias en los crecimientos de estas bacterias con el tiempo de fermentación, así: para el mucílago maduro, el número de bacterias a las 44 h se diferenció del recuento inicial, a las 4 h y a las 74 h, y también los recuentos a las 26 y 31 h se diferenciaron de los de

**Tabla 4.** Promedios de la cantidad de las bacterias coliformes totales y fecales en mucílago de café obtenido de frutos sin selección y granos despulpados sin clasificación, durante la fermentación a temperatura ambiente.

Mucílago de café sin selección y clasificado después de despulpado			
Tiempo de fermentación horas	Coliformes totales (NMP/g) (Promedio)	Coliformes fecales (NMP/g) (Promedio)	Coliformes fecales/ totales %
0	99.999 a	1 a	0,001
4	33.766 ab	1 a	0,004
8	33.766 ab	0 a	0,00
20	747 b	0 a	0,00
26	33.666 ab	0 a	0,00
31	33.450 ab	0 a	0,00
44	33.713 ab	0 a	0,00
52	33.513 ab	0 a	0,00
68	33.364 ab	0 a	0,00
74	103 b	0 a	0,00

Valores promedio con letras distintas entre tiempos, para las variables coliformes totales y fecales, indican diferencias estadísticas, Duncan al 5%.

las primeras 4 h; por el contrario, en el café sin selección pero clasificado por la zaranda, el crecimiento de estas bacterias no resultó significativo en el tiempo, mientras que en el mucílago de café no seleccionado, los recuentos de estas bacterias resultaron mayores a las 31, 44, 52, 68 y 74 h y se diferenciaron de los recuentos iniciales.

En la Figura 1 se observa la frecuencia de bacterias en el mucílago de café, según el tiempo de fermentación y la calidad del mucílago de café. En el mucílago de café maduro y clasificado, el 33% de la población inicial eran *Lactobacillus* y otro 33% del género *Enterobacter*, 16,7% *Flavobacterium* y 16,7% *Klebsiella*. Durante la fermentación de esta calidad de mucílago no se encontraron *Flavobacterium* y *Klebsiella*; de otra parte, las bacterias del género *Enterobacter* disminuyeron desde el inicio de la fermentación y después de las 20 h no fueron detectadas. Por el contrario, las bacterias fermentadoras del género *Lactobacillus* crecieron desde las primeras horas del proceso hasta predominar.

En el caso del mucílago de café fresco obtenido de frutos sin selección y de granos clasificados por zaranda, se presentó predominio de *Enterobacter* en un 60%, seguido de *Flavobacterium* y *Lactobacillus* en un 20% cada una. Igualmente, *Flavobacterium* no sobrevivió la fermentación y las *Enterobacter* no se detectaron después de las 8 h. Sin embargo, es de destacar la presencia de *Escherichia coli* que representó el 40% a las 4 h, luego disminuyó, aunque a las 30 horas representó un 25% de la población de bacterias. Igualmente *Lactobacillus* predominó desde las 8 h de fermentación en esta calidad de mucílago de café.

Por otro lado, en el mucílago de café fresco obtenido de frutos y granos sin selección se observó presencia de igual proporción de *Pseudomona*, *Enterobacter* y *Escherichia*, y un 50% de *Lactobacillus*. En esta calidad de mucílago de café solamente las bacterias lácticas continuaron su crecimiento, desde las 8 h de fermentación, las demás murieron.

**Tabla 5.** Promedios de los recuentos de bacterias identificadas en el mucílago de café durante la fermentación, para cada calidad de café procesado.

Tiempo de fermentación (horas)	Recuentos de las bacterias identificadas <i>Enterobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Pseudomona</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> y <i>Listeria</i>					
	UFC x 10 <sup>5</sup> /g mucílago de café					
	Maduro con zaranda		Sin selección con zaranda		Sin selección sin zaranda	
	Prom.	Desviación típica	Prom.	Desviación típica	Prom.	Desviación típica
0	76 c	65	108 a	117	12 b	15
4	54 c	49	98 a	93	34 ab	50
8	114 abc	76	69 a	38	61 ab	56
20	221 abc	137	177 a	95	50 ab	28
26	248 ab	155	-	-	52 ab	29
31	257 ab	177	206 a	161	92 a	10
44	290 a	164	139 a	164	88 a	18
52	225 abc	99	-	-	92 a	38
68	204 abc	72	-	-	90 a	85
74	56 c	60	-	-	103 a	91

Valores promedio con letras distintas entre tiempos, para cada calidad de mucílago de café, indican diferencias estadísticas, Duncan al 5%.

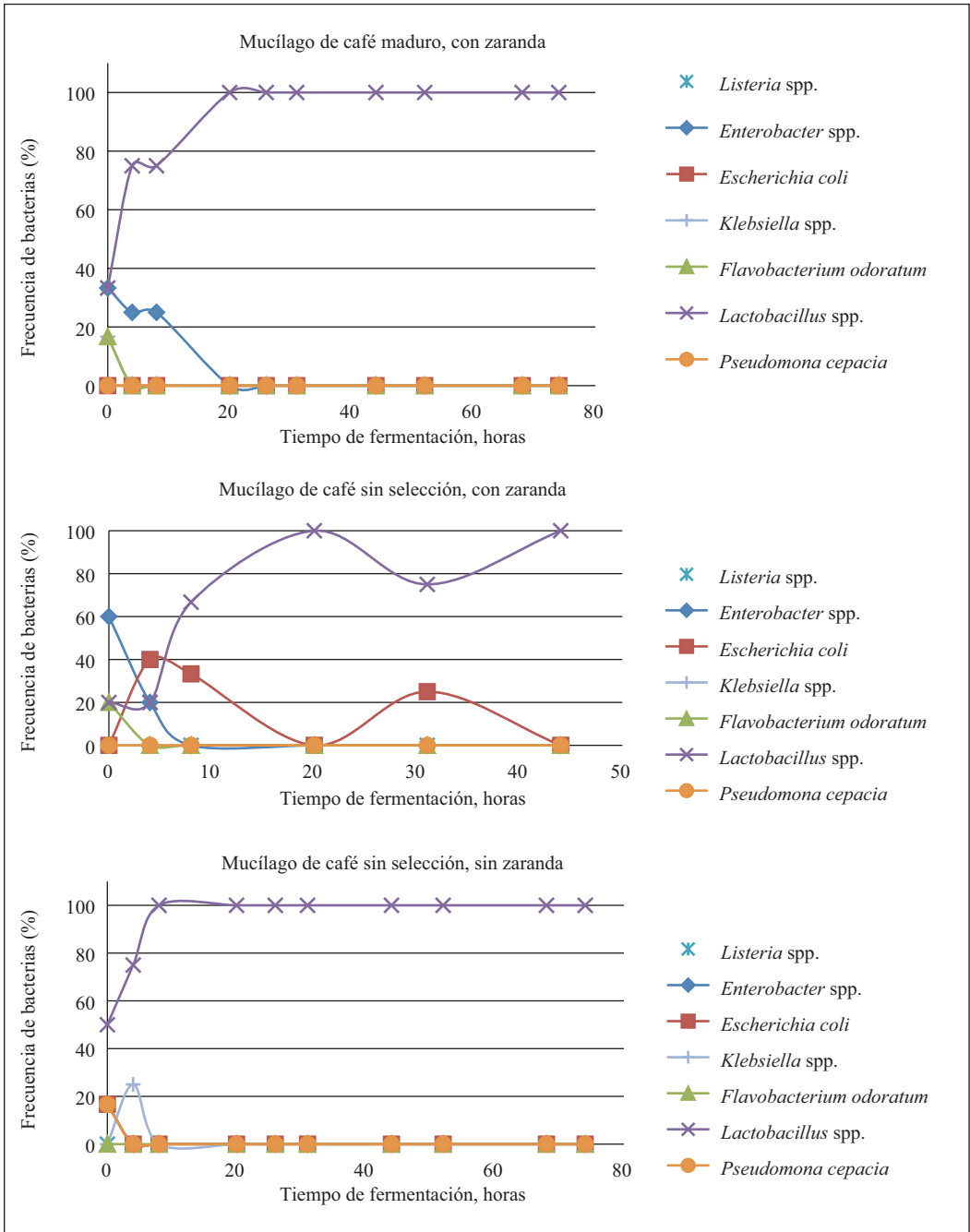
La presencia de bacterias del género *Enterobacter* desde el tiempo cero indica que estos microorganismos son normales en la población microbiana del mucílago; este género de microorganismos es frecuente en materiales vegetales, aunque también pudo ser aportado mediante la zaranda y la manipulación (6, 30). Posteriormente, estas bacterias desaparecieron durante la fermentación debido a la acidificación que es una condición desfavorable para el crecimiento y desarrollo de estos microorganismos.

Así mismo, la aparición de *Escherichia coli*, *Pseudomona cepacia* y *Flavobacterium odoratum* en el mucílago de café fresco se atribuye a contaminaciones a través de las labores culturales y de manipulación de los frutos y granos durante el procesamiento. Igualmente *Klebsiella*, que se presentó solo a las 4 h de fermentación, se considera un contaminante externo durante el proceso de fermentación. La acidificación del medio inhibió el crecimiento de *Escherichia coli*

durante la fermentación. Por su parte, *Listeria* pudo ser un contaminante del ambiente de fermentación de las muestras.

Es de recalcar el predominio de las bacterias del género *Lactobacillus* sobre las demás bacterias durante todo el tiempo de la fermentación del mucílago de café, independientemente de la calidad del café procesado. El crecimiento de *Lactobacillus* es favorecido por los azúcares que componen el mucílago de café y por las condiciones de la temperatura ambiente en que se desarrolló la fermentación (18, 19, 25). Al mismo tiempo, los *Lactobacillus* realizan la fermentación láctica con la producción de ácido láctico que acidifica el medio e inhibe el desarrollo de otros géneros bacterianos.

En promedio, durante todo el tiempo de fermentación, *Lactobacillus* constituyó el 84% de este grupo de bacterias del mucílago de café, *Enterobacter* el 7%, *Escherichia*



**Figura 1.** Frecuencia de bacterias *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas cepacia*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium odoratum*, *Lactobacillus* spp. y *Listeria* spp., en las diferentes calidades de mucilago de café, según el tiempo de fermentación.

*coli* el 4,4%. *Flavobacterium odoratum* el 1,6%, *Klebsiella* el 1,4%, *Listeria* el 0,8% y *Pseudomona cepacia* el 0,6%.

Por su parte, Puerta *et al.* (24) identificaron a *Lactobacillus* como predominante a las 4 h, conformando el 37% de las bacterias y levaduras, y al final de la fermentación un 44%. Pederson y Vaughn *et al.*, citados por Avallone *et al.* (4), indicaron que *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* y *Leuconostoc* son bacterias frecuentes en la fermentación del café. Así mismo, Pagnoncelli *et al.* (15) identificaron a *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis* y *L. paracasei* en la pulpa de café. Mientras que Avallone *et al.* (3, 4), mostraron que *Klebsiella* y *Erwinia* eran bacterias coliformes predominantes durante la fermentación del café y que además producían pectinasas.

El género *Lactobacillus* no es patógeno para el hombre; estas bacterias se encuentran en los vegetales y en el tracto intestinal y son muy usadas en la industria de lácteos y encurtidos. Los *Lactobacillus* crecen en medios anaerobios, pero no son sensibles al oxígeno, son anaerobios aerotolerantes o microaerófilos, toleran medios ácidos y requieren de azúcares, aminoácidos y vitaminas que en la fermentación del café son suministrados por el sustrato.

Los *Lactobacillus* homofermentativos producen ácido láctico como producto principal de fermentación e incluyen a *L. caucasicus*, *L. bulgaricus*, *L. lactis*, *L. acidophilus* y *L. delbrueckii*. Los heterofermentativos producen además de ácido láctico, dióxido de carbono, etanol, ácido acético y otros productos volátiles; en este grupo está *L. plantarum* que produce sustancias con olor a pasto verde y *L. brevis* muy usado en lácteos y panadería (12, 30).

*Klebsiella* se encuentra en el suelo y el agua, y con frecuencia en el tracto respiratorio e intestinos del hombre. *Enterobacter* es frecuente en suelos, productos lácteos, cloacas, material vegetal y en los intestinos del hombre y otros animales; estas bacterias se consideran patógenos oportunistas y producen infecciones en el tracto urinario (10, 11).

*Flavobacterium* puede encontrarse en plantas, suelos y agua, no es fermentadora, pero puede alterar carnes, mariscos, huevos y mantequilla, y crecer en hortalizas congeladas. *Pseudomona* pueden alterar el sabor de los alimentos, metaboliza diversos compuestos, produce enzimas lipolíticas y proteolíticas. *Listeria* es un bacilo que fermenta carbohidratos y produce ácido láctico (6, 11).

**Hongos y levaduras.** La mayoría de las levaduras crecen entre 25 y 35°C, aunque algunas resisten muy bajas temperaturas, también crecen a pH ácidos de 4,0 a 4,5, en aerobiosis y lentamente en anaerobiosis, fermentan principalmente azúcares, aunque las levaduras oxidativas, oxidan los ácidos orgánicos y al mismo alcohol.

En esta investigación no se encontraron hongos en el mucílago de café. Los hongos frecuentes en el café y sus partes son del género *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Trichoderma* (23, 24). En la Tabla 6 se comparan los recuentos de las levaduras del mucílago de café durante el tiempo de fermentación obtenido de las tres calidades de mucílago de café.

El número de levaduras en el mucílago de café maduro fresco resultó estadísticamente diferente de los valores de las otras calidades de mucílago; el mucílago de café maduro presentó  $38 \times 10^5$  de colonias, comparado con  $14 \times 10^5$  y  $18 \times 10^5$  que presentaron los mucílagos de café sin selección, con y sin

**Tabla 6.** Promedios de los recuentos de levaduras en cada calidad de mucílago de café, durante la fermentación a temperatura ambiente.

Tiempo de fermentación (horas)	Recuentos de levaduras (UFC x 10 <sup>5</sup> /g) en el mucílago de café					
	Maduro con zaranda		Sin selección con zaranda		Sin selección sin zaranda	
	Prom.	Desviación típica	Prom.	Desviación típica	Prom.	Desviación típica
0	38 bc	5	14 a	5	18 d	10
4	18 c	9	22 a	13	19 d	12
8	28 bc	17	38 a	10	24 cd	8
20	27 bc	25	44 a	45	31 cd	11
26	29 bc	29	-	-	41 cd	38
31	41 bc	35	56 a	69	47cd	44
44	44 bc	41	76 a	86	49 cd	15
52	79 b	38	-	-	56 bc	16
68	159 a	113	-	-	86 b	14
74	159 a	120	-	-	142 a	35

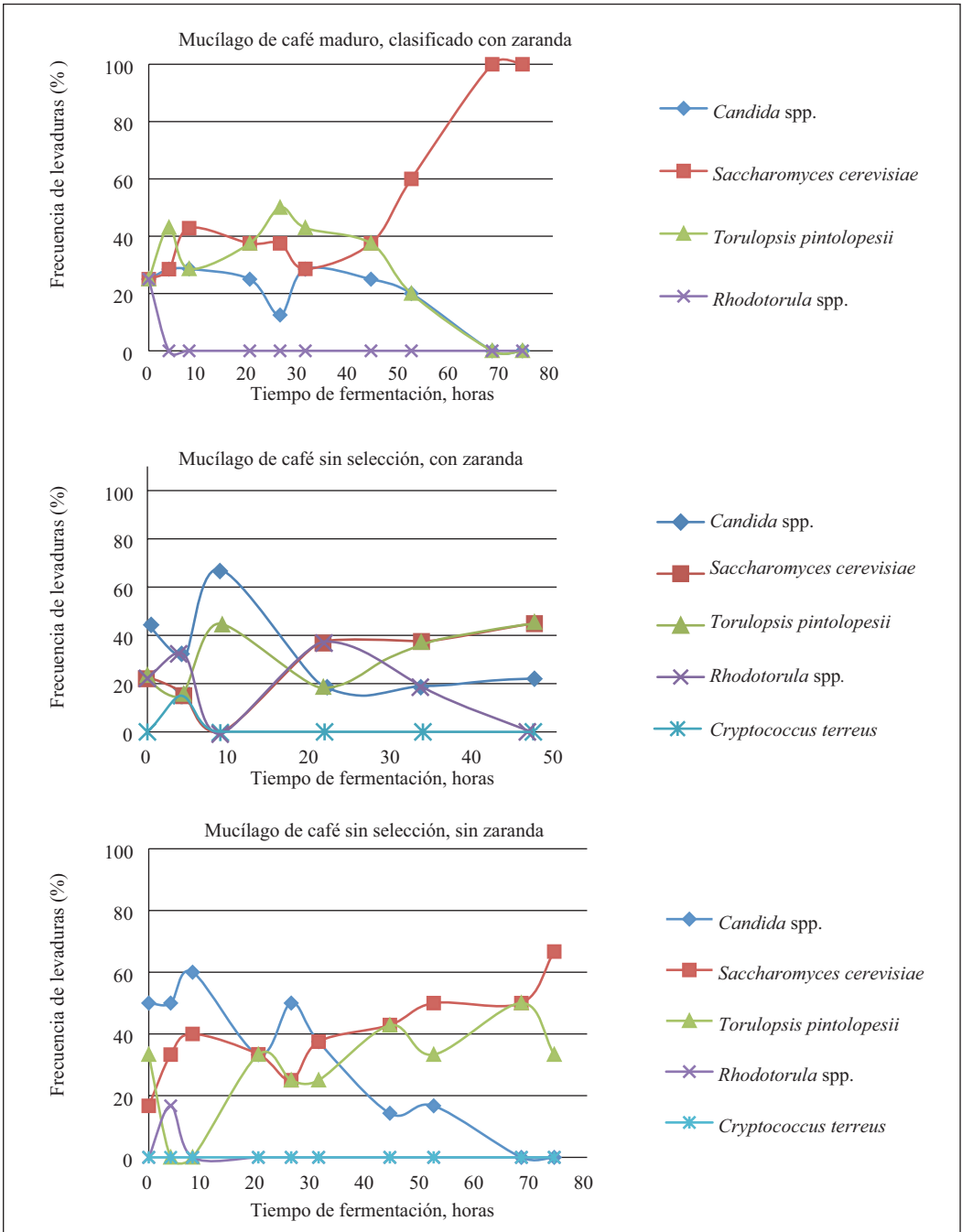
Promedios con letras distintas entre tiempos, para cada calidad de mucílago de café procesado, indican diferencias estadísticas según la prueba Duncan al 5%.

clasificación por la zaranda, respectivamente. En los demás tiempos de fermentación los recuentos de levaduras fueron similares en los tres tipos de mucílago de café analizado. Se deduce que la calidad del mucílago no alteró considerablemente la cantidad de levaduras del mucílago de café durante la fermentación a temperatura ambiente.

En general, el número de levaduras se incrementó a través de todo el tiempo de fermentación en las tres calidades de mucílago de café, a las 20 h se encontraron en promedio  $34 \times 10^5$  de colonias por cada gramo de mucílago, y después de las 68 h las diferencias en los recuentos de levaduras fueron significativas con respecto a los tiempos previos de fermentación, con valores de  $150 \times 10^5$  de colonias de levaduras, en promedio.

Masoud *et al.* (14), indican que las levaduras participan y se incrementan en la fermentación del café, aunque los géneros y especies reportados en el café de Tanzania son diferentes a los encontrados en este estudio en la fermentación del mucílago de café de Colombia.

En la Figura 2 se observan las levaduras identificadas y su frecuencia con el tiempo de fermentación, para cada calidad de mucílago de café. En el mucílago de café obtenido de frutos sin selección y con zaranda después de desulpado se detectaron las siguientes levaduras: *Candida tropicalis* y *Candida* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis pintolopessi*, *Rhodotorula* spp. y *Cryptococcus terreus*. En este material fresco se presentó en igual proporción las poblaciones de *Saccharomyces*, *Torulopsis* y *Rhodotorula*, mientras que *Candida* predominó con un 40%. En las primeras 8 h de fermentación *Candida* se mantuvo como el principal género de levaduras, seguidas de *Torulopsis*; a las 20 h predominaron *Rhodotorula* y *Saccharomyces*, y a partir de este tiempo *Rhodotorula* disminuyó y *Torulopsis* y *Saccharomyces* se mantuvieron en el sistema de fermentación de este mucílago de café. La presencia de *Cryptococcus* sólo a las 4 h de fermentación en esta calidad de mucílago indica que este microorganismo pudo introducirse al sustrato a través de la manipulación y exposición al medio



**Figura 2.** Frecuencia de levaduras *Candida* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis pintolopesii*, *Rhodotorula* spp. y *Cryptococcus terreus* en el mucilago de café, según el tiempo de fermentación y la calidad del mucilago de café procesado.

ambiente. Así mismo, en el mucílago fresco de café maduro y clasificado con zaranda se detectaron en igual proporción levaduras de los géneros *Candida*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* y *Rhodotorula*, que se identificaron como *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis pintolopessi* y *Rhodotorula spp.*

Es de anotar que *Rhodotorula* desapareció desde las primeras 4 h, debido posiblemente a la competencia por el sustrato con las otras levaduras; mientras que las *Candida* se mantuvieron hasta las 52 h y luego desaparecieron. Por su parte, *Torulopsis* creció hasta las 31 h y luego su población disminuyó, pero se mantuvo hasta las 52 h, después no fue detectada en este sistema. De otro lado, *Saccharomyces* creció y se mantuvo más o menos estable hasta las 44 h y luego de este tiempo, fue la única levadura que permaneció hasta las 74 h de fermentación.

Por otra parte, en el mucílago fresco obtenido de frutos y granos sin selección y sin zaranda predominó *Candida spp.*, que representó 40% de la población de levaduras, también se encontraron *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis pintolopessi* y *Rhodotorula spp.*

*Rhodotorula* desapareció desde las primeras 4 h, mientras que *Torulopsis* y *Saccharomyces* crecieron constantemente hasta las 74 h y *Candida* empezó su disminución desde las 31 h, y después de las 52 h no se encontró.

En resumen, las levaduras del género *Rhodotorula* no se mantuvieron en el sustrato o fueron inhibidas por el resto de microorganismos del mucílago. Mientras que *Candida* sobrevivió por más tiempo, pero *Torulopsis* y *Saccharomyces* predominaron en el mucílago independiente de su calidad hasta las 44 h, y definitivamente *Saccharomyces*

predominó y creció continuamente en el mucílago maduro y clasificado por la zaranda.

Avallone *et al.* (4) no registraron a *Saccharomyces* en el mucílago de café, pero sí reportan como principales géneros de levaduras en el mucílago a *Kloeckera*, *Candida* y *Cryptococcus*; además, indicaron que éstas no forman pectinasas. En otros estudios Puerta *et al.* (24) reportaron como principales levaduras en el café a las 4 h y al final de la fermentación a *Candida* y *Torulopsis* y en menor frecuencia a *Saccharomyces*; por su parte, Blandón *et al.* (5) reportaron que *Saccharomyces* y otros microorganismos fueron aportados por el mucílago fresco en las mezclas con pulpa de café que usaron para compostaje.

Kurtzman (1998), citado por Masoud *et al.* (14), encontró a *Pichia kluyveri* en cacao, mientras que Spenser *et al.* (1992) y Abranches *et al.* (2000) registraron esta levadura en frutas. *P. kluyveri*, *P. anomala* y *H. uvarum* son levaduras fermentadoras, frecuentes en suelos, frutas y árboles, según los reportes de Kurtzman (1998) y Smith (1998), citados por Masoud *et al.* (14). Además, Masoud *et al.* (14), afirman que *P. kluyveri* y *P. anomala* crecen en pectina como única fuente de carbón, y por lo tanto, pueden ser importantes en la fermentación del café. Igualmente, estos autores citan a Silva *et al.* (2000), quienes encontraron que *P. anomala* constituye el 39% de las levaduras en el café de Brasil.

El hábitat y tipo de degradación de las levaduras halladas en el mucílago de café en este estudio se resume a continuación: *Saccharomyces cerevisiae* es frecuente en hojas, flores y frutos de vegetales, realiza fermentación alcohólica con la producción de etanol, CO<sub>2</sub>, glicerina, ésteres y otros alcoholes y compuestos, esta levadura es muy



usada en la industria de bebidas alcohólicas, vinos cerveza y en la panadería.

El género *Candida* es frecuente en mucosas, boca, piel, uñas, intestinos y genitales de mamíferos y en suelos, plantas y forrajes, también produce etanol y CO<sub>2</sub> por fermentación alcohólica, lo mismo que *Torulopsis pintolopesii*, frecuente en intestinos de algunos animales. Mientras que *Cryptococcus terreus* propia de hojas de plantas y suelos no es fermentadora, aunque degrada amiláceos. Por su parte, *Rhodotorula* se encuentra en la piel, pulmones, orina, heces, hojas y suelos, no fermenta, pero produce diversas enzimas y sustancias con aromas frutales y a vainilla, altera cárnicos y se emplea en la producción de grasas (6, 30).

Algunas especies de *Candida* se usan como emulsificadores en la industria de alimentos, otras para producción de proteínas, aunque varias alteran productos ácidos y salados. Así mismo, *Torulopsis* se usa en la producción de manitol como humidificador y xilitol un edulcorante, sin embargo, varias especies alteran la cerveza, la leche, los jugos de frutas y varios alimentos ácidos (6, 30).

**Curvas de crecimiento de microorganismos en el mucílago de café.** En la Figura 3 se representan las curvas de crecimiento de las bacterias en la fermentación del mucílago de café, las cuales correspondieron principalmente a *Lactobacillus*, donde se destaca el efecto de la selección del fruto, clasificación del despulpado y manipulación del mucílago de café.

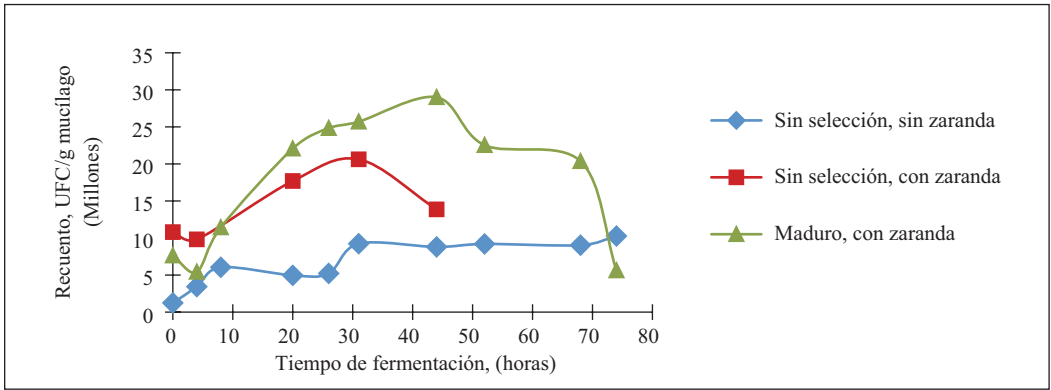
Para el mucílago obtenido de frutos maduros y granos clasificados por zaranda, las lácticas presentaron un crecimiento exponencial, más acelerado en las primeras 20 horas, hasta alcanzar un recuento máximo a las 44 horas de proceso, durante este tiempo estas

bacterias aprovecharon el sustrato maduro disponible y produjeron ácido láctico y la acidificación del medio, como fue demostrado por Puerta (18). Igualmente, el crecimiento de las lácticas en el mucílago de café sin selección fue más acelerado en el material clasificado por la zaranda, que en el proceso sin selección.

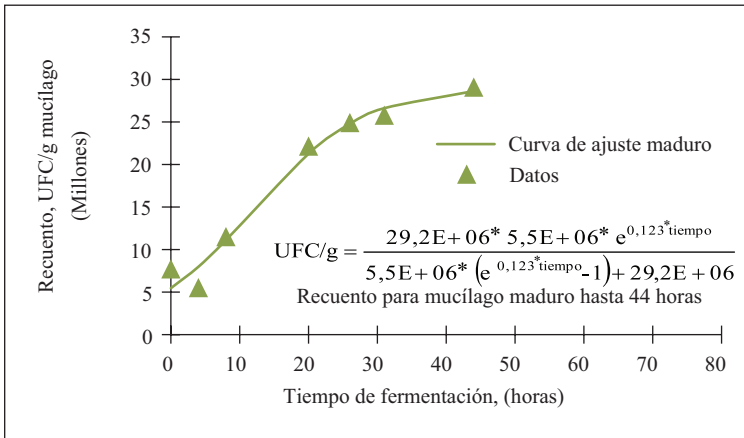
En la Figura 4 se presenta la curva de ajuste y la ecuación para el crecimiento de las bacterias lácticas en el mucílago de café maduro hasta 44 horas, después de este tiempo la población de las bacterias lácticas comenzó a disminuir. La cinética microbiana de las bacterias en el mucílago encontrada en esta investigación confirma y explica también los resultados y ecuaciones de ajuste desarrolladas por Puerta (18), para la producción de acidez, en la cinética química de la fermentación del mucílago de café.

Las levaduras se mantuvieron en un crecimiento continuo de forma exponencial (Figura 5) y fue más acelerado en el mucílago de frutos de café sin selección y granos clasificados por zaranda, seguido del maduro y clasificado.

En conclusión, el análisis microbiológico del mucílago de café de Colombia evidencia que es un sustrato propicio para el crecimiento y desarrollo de levaduras del género *Saccharomyces*, *Torulopsis* y *Candida* que fermentan sus azúcares para producir alcohol y CO<sub>2</sub>. Arias y Ruiz (2), realizaron fermentaciones del mucílago de café adicionando levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y pectinasas comerciales para producir etanol. Rodríguez (27) también produjo etanol del mucílago de café mediante adición de *Saccharomyces*. Así mismo, el mucílago de café es un sustrato donde predominan bacterias lácticas, *Lactobacillus*, que producen fermentaciones lácticas. Henao



**Figura 3.** Crecimiento de las bacterias lácticas en la fermentación del mucílago de café, según la clasificación de los frutos y granos en el beneficio.



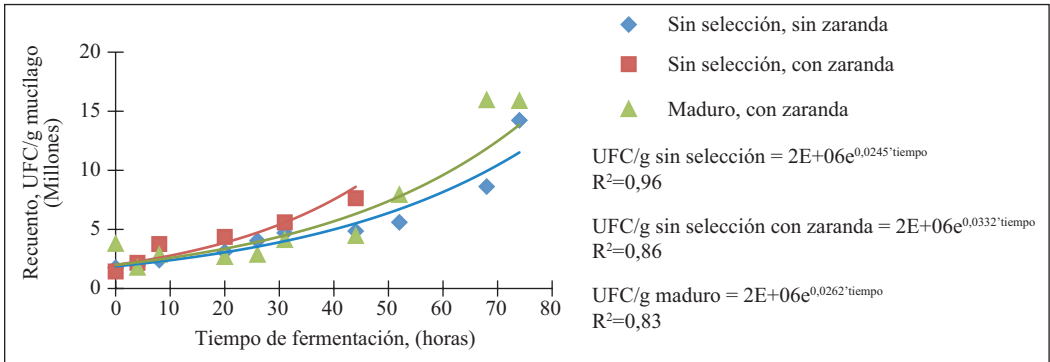
**Figura 4.** Curva y ecuación de ajuste para el crecimiento de bacterias lácticas en la fermentación del mucílago de café obtenido de frutos maduros y granos despulpados clasificados.

et al. (9) fermentaron el mucílago de café con adición de *Lactobacillus bulgaricus* y enzimas comerciales para producir ácido láctico. Éstos son apenas unos de los variados usos que se podrían dar al mucílago de café y a los microorganismos hallados en este sustrato.

Los microorganismos identificados en el mucílago de café poseen la capacidad de metabolizar los azúcares y otros compuestos, mediante diferentes tipos de fermentación y degradaciones, en especial fermentaciones lácticas y alcohólicas, con la consecuente

producción de ácidos, alcoholes, ésteres y diversas sustancias que podrían ser aprovechadas en la industrialización del mucílago.

En general, durante la fermentación natural del mucílago de café, la población de microorganismos crece a una velocidad que depende de la calidad del sustrato. Cuando el café se selecciona, se obtiene un grado de madurez y calidad de sustrato (mucílago) más homogéneos, que favorece el crecimiento y metabolismo fermentativo, en particular de las bacterias lácticas.



**Figura 5.** Curvas y ecuaciones de ajuste para el crecimiento de levaduras en la fermentación del mucilago de café, según la clasificación en el beneficio.

Sin embargo, los factores externos como la manipulación, la exposición al medio ambiente, la temperatura, la higiene y el sistema mismo de fermentación pueden incrementar y variar la cantidad de bacterias coliformes totales que causan degradaciones y fermentaciones ácido-mixtas, y por lo tanto, productos que pueden afectar la calidad de la bebida de café.

A medida que aumenta el tiempo de fermentación, baja el pH del medio y las bacterias gram-negativas disminuyen hasta desaparecer, en consecuencia este medio ácido favorece el crecimiento de las bacterias *Lactobacillus* y de las levaduras que son los microorganismos predominantes en la fermentación del café.

Es necesario enfatizar la importancia de realizar las Buenas Prácticas Agrícolas y de Higiene en las labores de cultivo, recolección y beneficio del café, para controlar la calidad del café despulpado y del mucilago. En particular, mantener la higiene en las instalaciones, personal, equipos de beneficio y zarandas, además, efectuar las clasificaciones del café en cada etapa del beneficio. De esta forma, con una mejor calidad de café en baba, se

mantendrá control de la fermentación, se evitarán otras degradaciones, se prevendrá el deterioro de la calidad de la bebida. Así mismo, el mucilago que se obtenga por el desmucilagador presentará una composición química y microbiana más homogénea y así, se podrán mejorar rendimientos en fermentaciones industriales.

## AGRADECIMIENTOS

A los colaboradores de Experimentación y de la Estación Central Naranjal por el suministro del café y a Bernardo Chaves Córdoba. Esta investigación fue financiada con recursos de la Federación Nacional de Cafeteros y hace parte del proyecto QIN0800. Caracterización y utilización del mucilago de café.

## LITERATURA CITADA

1. ARCHILA G., M. Análisis bacteriológico de aguas residuales de beneficio de café. Bogotá : Universidad de los Andes. Facultad de Microbiología, 1985. 40 p. Trabajo de grado : Microbiólogo.
2. ARIAS, M.; RUIZ C., A.A. Fermentación alcohólica de mucilago de café con levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Ciencia y tecnología de alimentos 11(1):66-74. 2001.

3. AVALLONE, S.; BRILLOUET, J.M.; GUYOT, B.; OLGUIN, E.; GUIRAUD, J.P. Involvement of pectolytic microorganisms in coffee fermentation. *International journal of food science and technology* 37:191-198. 2002.
4. AVALLONE, S.; GUYOT, B.; BRILLOUET, J.M.; OLGUIN, E.; GUIRAUD, J.P. Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. *Current microbiology* 42:252-256. 2001.
5. BLANDÓN C., G.; DÁVILA A., M.T.; RODRÍGUEZ V., N. Caracterización microbiológica y fisico-química de la pulpa de café sola y con mucílago, en proceso de lombricompostaje. *Cenicafé* 50(1):5-23. 1999.
6. BROCK, T.D.; MADIGAN, M.T. *Biology of microorganisms*. 6a. Ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1991. 874 p.
7. CASTELEIN, J.M.; PILNIK, W. The properties of the pectate-lyase produced by *Erwinia dissolvens*, a coffee fermenting organism. *Lebensmittel wissenschaft und technologie* 9(5):277-283. 1976.
8. FRANK, H.A.; LUM, N.; CRUZ, A.S. DELA. Bacteria responsible for mucilaged-layer decomposition in Kona coffee cherries. *Applied microbiology* 13(2):201-207. 1965.
9. HENAO, L.M.; CASTRILLÓN, J.; ARIAS, M. Fermentación láctica del mucílago de café. *Ciencia y tecnología de alimentos* 11(1):58-65. 2001.
10. KRÄMER, J. *Lebensmittelmikrobiologie*. Stuttgart : Eugen Ulmer, 1987. 270 p.
11. KRIEG, N.R.; SNEATH P., H.A.; STALEY, J.T.; BRYANT, M.P.; PFENNIG, N.; HOLT, J.G. *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 1*. Baltimore : Williams & Wilkins, 1984. 964 p.
12. KRIEG, N.R.; SNEATH P., H.A.; STALEY, J.T.; BRYANT, M.P.; PFENNIG, N.; HOLT, J.G. *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 2*. Baltimore : Williams & Wilkins, 1984. 1599 p.
13. LÓPEZ G., C.I.; BAUTISTA R., E.; MORENO G., E.; DENTAN, E. Factors related to the formation of "overfermented coffee beans" during the wet processing method and storage of coffee. p. 373-384. En: *COLLOQUE Scientifique International sur le Café*. (13 : Aout 21-25 : 1989 : Paipa). Paris : ASIC, 1989. 783 p.
14. MASOUD, W.; CESAR, L.B.; JESPERSEN, L.; JAKOBSEN, M. Yeast involved in fermentation of coffee arabica in east Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. *Yeast* 21:549-556. 2004.
15. PAGNONCELLI M., G.B.; BRAND, D.; ROUSSOS, S.; PERRAUD G., I.; AUGUR, C.; SOCCOL, C.R. Isolation and identification of lactic acid bacteria from mature coffee cherries: Potential application in coffee husk ensiling. p. 321-333. En: *NEW horizons in biotechnology*. Dordrecht : Kluwer academic, 2003. 449 p.
16. PEE, W. VAN; CASTELEIN, J.M. Study of the pectinolytic microflora, particularly the enterobacteriaceae from fermenting coffee in the Congo. *Journal of food science* 37(1):171-174. 1972.
17. PUERTA Q., G.I. Buenas prácticas agrícolas para el café. *Chinchiná : Cenicafé*, 2006. 12 p. (Avances Técnicos No. 349)
18. PUERTA Q., G.I. Cinética química de la fermentación del mucílago del café a temperatura ambiente. En *proceso de editorial*
19. PUERTA Q., G.I. Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café. *Chinchiná : Cenicafé*, 2010. 12 p. (Avances Técnicos 402)
20. PUERTA Q., G.I. La humedad controlada del grano preserva la calidad del café. *Chinchiná : Cenicafé*, 2006. 8 p. (Avances Técnicos No. 352)
21. PUERTA Q., G.I. Riesgos para la calidad y la inocuidad del café en el secado. *Chinchiná : Cenicafé*, 2008. 8 p. (Avances Técnicos No. 371)
22. PUERTA Q., G.I. Sistema de aseguramiento de la calidad y la inocuidad del café. *Chinchiná : Cenicafé*, 2005. 8 p. (Avances Técnicos No. 351)
23. PUERTA Q., G.I.; GALLEGO A., C.P. Informes del proyecto mejoramiento de la calidad del café por medio de la prevención de formación de moho. p.v. En: *INFORME anual de actividades de investigación 2001-2004: Disciplina Química Industrial*. Chinchiná : Cenicafé, 2004. p.v.
24. PUERTA Q., G.I.; PÉREZ L., C.M.; GONZALES M., M.J. Informes de proyectos QIN0504, QIN0505, QIN0506: Estudio del defecto sabor fenólico del café y caracterización microbiológica. En: *Informe anual de actividades 1995-1996: Disciplina Química Industrial*. Chinchiná : Cenicafé, 1996. p.v.

25. PUERTA Q., G.I.; RÍOSA., S. Composición química del mucílago de café, según el tiempo de fermentación y refrigeración. *Cenicafé* 62(2):23-40. 2011.
26. ROA M., G.; OLIVEROS T., C.E.; ÁLVAREZ G., J.; RAMÍREZ G., C.A.; SANZ U., J.R.; DÁVILA A., M.T.; ÁLVAREZ H., J.R.; ZAMBRANO F., D.A.; PUERTA Q., G.I.; RODRÍGUEZ V., N. Beneficio ecológico del café. Chinchiná: Cenicafé, 1999. 273 p.
27. RODRÍGUEZ V., N. Avances del experimento QIN0806: Producción de alcohol carburante a partir de la pulpa y el mucílago del café. En: CENICAFE. Informe anual de actividades 2006-2007: Disciplina de Calidad y Manejo ambiental. Chinchiná : CENICAFÉ, 2007. 78 p.
28. SALGADO C., M.T. Texto guía sobre análisis físicoquímico de leches y microbiológico de alimentos. 5a ed. Manizales : Universidad Católica de Manizales, 1992. p.v.
29. SCHARRER, R. Contribución al estudio de la fermentación del café. *Revista cafetera de Colombia* 8(110):2917-2924. 1942.
30. SCHLEGEL, H.G. *Microbiología general*. Barcelona : Omega, 1979. 448 p.