

EVALUACIÓN DE UNA ENZIMA PECTINOLÍTICA PARA EL DESMUCILAGINADO DEL CAFÉ

Aída Esther Peñuela-Martínez*; Jenny Pabón-Usaquén*; Nelson Rodríguez-Valencia**;
Carlos Eugenio Oliveros-Tascón*

RESUMEN

PEÑUELA M., A.E.; PABÓN U., J.P.; RODRÍGUEZ V., N.; OLIVEROS T., C.E. Evaluación de una enzima pectinolítica para el desmucilaginado del café. Cenicafé 61 (3):241-250. 2010

Se determinó el efecto de una enzima con actividad pectinolítica sobre la remoción de mucílago, el tiempo para alcanzar remoción mayor que 98%, el contenido de sólidos (Totales y Suspendidos), la Demanda Química de Oxígeno y el valor de pH en las aguas residuales obtenidas, y la calidad final del café a través de la evaluación sensorial. Se realizó un diseño completamente aleatorio en arreglo factorial 5 x 3 (cinco concentraciones de enzima x tres temperaturas) y se tuvo como testigo la fermentación natural. Se determinó que la remoción de mucílago utilizando la enzima Rohapect TPL no depende de la interacción de los factores temperatura y concentración. Así mismo, con el uso de esta enzima se obtuvo un tiempo de remoción de mucílago superior al 98%, en un tiempo de tres horas. Adicionalmente, se determinó que no existe diferencia en la carga orgánica de las aguas residuales, ni en la calidad final del café, con relación a los tratamientos con fermentación natural.

Palabras clave: Mucílago de café, remoción de mucílago, tiempo, temperatura, calidad de café.

ABSTRACT

The effect of an enzyme with pectinolytic activity on the mucilage removal, time to reach greater removal than 98%, solids content (total and suspended), Chemical Oxygen Demand and pH value in wastewater, and the final coffee quality through sensory evaluation were determined. We conducted a completely randomized design in factorial arrangement 5 x 3 (five enzyme concentrations x three temperatures). Natural fermentation was the control. The fact that the removal of mucilage using TPL Rohapect enzyme does not depend on the interaction of temperature and concentration was determined. Likewise, mucilage removal time greater than 98% in a time of three hours was obtained through the use of this enzyme. Additionally, it was determined that there is no difference in the organic load of wastewater, or in the final quality of coffee, compared to treatment with natural fermentation.

Keywords: coffee mucilage, mucilage removal, time, temperature, coffee quality

*Investigador Científico I, Investigador Asociado e Investigador Principal, respectivamente. Ingeniería Agrícola. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé.

**Investigador Científico II. Calidad y Manejo Ambiental. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Manizales, Caldas, Colombia.

La eliminación o remoción del mucílago es necesaria para el café procesado por vía húmeda, con el fin de obtener los llamados cafés “suaves lavados” (11). Esta eliminación se puede realizar por medio de métodos bioquímicos como fermentación natural, con adición de enzimas, o mecánicos a través de la fricción. Tradicionalmente, el método más empleado ha sido la fermentación natural, en la que actúan levaduras, bacterias y enzimas propias del café, que solubilizan los compuestos del mucílago, permitiendo su eliminación por medio del lavado. Según Avallone *et al.* (2), las bacterias pectolíticas que se encuentran frecuentemente en el café son *Erwinia herbicola* y *Klebsiella pneumoniae*; estas bacterias producen las enzimas que desdoblan los compuestos pécticos insolubles en compuestos solubles. En este proceso, el tiempo requerido para degradar el mucílago es afectado por diferentes factores, como son las condiciones ambientales, la variedad de café, los estados de maduración, la calidad de la materia prima, el empleo de agua en el proceso de beneficio y los materiales utilizados en la construcción del tanque, entre otros.

La adición de enzimas pectolíticas al proceso, acelera la transformación del mucílago en compuestos solubles, que son eliminados mediante el lavado del café, y adicionalmente, permite controlar el proceso, evitando la aparición de defectos en la calidad del café, atribuibles a la prolongación excesiva del proceso de fermentación o a la remoción incompleta del mucílago.

En varios países productores de café, principalmente africanos y centroamericanos, se han realizado investigaciones utilizando diferentes preparaciones enzimáticas para acelerar la remoción de mucílago, con disminución del tiempo de proceso y calidad aceptable en la bebida (10). Actualmente, algunas de las enzimas evaluadas son usadas

para clarificar cerveza y jugo de manzana, pero no para el desmucilaginado de café, debido a que fueron desarrolladas especialmente para los productos anteriormente mencionados (4). En Colombia, Calle (3), reportó el uso de un producto llamado Benefax, de la empresa Standart Brands, con buenos resultados. Según el autor, con el empleo de este producto se contribuye al mejoramiento de la calidad del café por la eliminación de fermentaciones indeseables.

Puerta (10), reportó los resultados de una investigación orientada a la evaluación de la remoción de mucílago por medios enzimáticos, utilizando tres productos de la empresa Novonordisk. Encontró que al utilizar la enzima disminuye el tiempo requerido para la remoción del mucílago, siendo mayor el efecto con la mayor concentración de la enzima y en café despulpado proveniente del estado maduro. Adicionalmente, afirma que el uso de este producto no parece tener un efecto sobre el desarrollo del aroma, la acidez, amargo y cuerpo de la bebida.

Por otro lado, los defectos ocasionados en la etapa de fermentación obedecen, en general, a la ausencia de control y a la aplicación de malas prácticas en el beneficio. El café está expuesto a que se presenten defectos como vinagre y fermento que son ocasionados principalmente por falta de control en la fermentación y en el lavado. El uso de enzimas específicas para el desmucilaginado del café, se convierte en una alternativa no solo para acelerar y controlar el proceso de beneficio del café, evitando deterioro de la calidad, sino que además puede ser una posibilidad para los caficultores que no tienen acceso al uso de la remoción mecánica, por los costos económicos que implica la inversión.

Recientemente, la industria ha desarrollado la enzima Rohapect TPL, una pectinasa que

ha sido calificada para el desmucilaginado de granos de café. Específicamente es una pectin-liasa producida a partir de *Aspergillus niger* que cataliza las reacciones de ruptura de la pectina en moléculas de menor peso molecular. Se ha determinado que su actividad enzimática es máxima a una temperatura de 50°C y un pH de 5,00. En cuanto a la inocuidad y seguridad, este producto cumple con las especificaciones de la FAO y del Codex para enzimas de grado alimenticio (1).

Esta investigación se realizó con el objetivo de evaluar el efecto de la enzima Rohapect TPL, en el proceso de remoción de mucílago de café, conocer las ventajas técnicas, en los aspectos de calidad e impacto ambiental derivados de su uso, así como la concentración más adecuada y el efecto de la variación de la temperatura ambiente sobre el proceso de remoción. Como hipótesis de investigación se planteó que la remoción de mucílago, en una hora, utilizando la enzima Rohapect TPL, no depende de la interacción entre la concentración de enzima y la temperatura ambiente.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el beneficiadero experimental de Cenicafé, ubicado en Manizales (Caldas), a una altitud de 1.310 m, con una temperatura media anual de 21,2°C y humedad relativa del 78% (5). Se utilizó café Variedad Castillo®, procedente de la Estación Central Naranjal, ubicada en Chinchiná (Caldas).

Se evaluó la remoción de mucílago en café despulpado, utilizando cinco concentraciones de enzima y tres condiciones de temperatura (Tabla 1).

La unidad experimental estuvo conformada por 90 kg de café cereza (materia prima). Se procuró que el tiempo transcurrido entre la recolección y el inicio del beneficio fuera menor a seis horas, para reducir los procesos de fermentación del mucílago, que tiene lugar en la cereza del café una vez desprendida del árbol. Por cada tratamiento se tuvieron cinco unidades experimentales. Con los datos obtenidos se corroboró una confiabilidad mayor al 95%, por lo cual

Tabla 1. Descripción de los tratamientos, de acuerdo con la concentración de la enzima y la temperatura ambiente.

Tratamiento	Concentración de enzima (ppm)	Temperatura ambiente (°C)
1	0 (Fermentación natural)	15
2	100	15
3	200	15
4	300	15
5	400	15
6	0 (Fermentación natural)	20
7	100	20
8	200	20
9	300	20
10	400	20
11	0 (Fermentación natural)	25
12	100	25
13	200	25
14	300	25
15	400	25

no fue necesario reajustar el número de unidades experimentales. Este valor también garantizó el control experimental con el que fue realizada la investigación.

Para garantizar la calidad de los frutos de café procesados, se retiraron los frutos vanos, secos y brocados, utilizando un Separador Hidráulico de Tornillo Sinfín (SHTS), recomendado por Oliveros *et al.* (7). Del café procesado en el SHTS se tomó una muestra compuesta de 1,0 kg para evaluar la calidad de la materia prima en estados de madurez e impurezas.

Los frutos de café clasificados fueron despulpados en una máquina de cilindro horizontal marca JM Estrada, referencia Súper Vencedora No. 4 ½, con tres salidas de café despulpado y un promedio de capacidad de 900 kg/h de café cereza; el café despulpado pasó por una zaranda circular de varillas, con separación de 7 mm, para retirarle los frutos no despulpados, principalmente verdes y algunos pintones, y gran parte de la pulpa. El café despulpado, aproximadamente 50 kg en cada unidad experimental, se depositó en canecas cilíndricas de plástico. Al café contenido en cada caneca se le aplicó la enzima en la concentración definida para cada tratamiento, previamente disuelta en agua destilada a razón de 10 ml de agua por 1,0 kg de café despulpado. Posteriormente, el café se homogeneizó utilizando la paleta diseñada para el lavado del café (12).

Las unidades experimentales fueron asignadas bajo el diseño completamente aleatorio, en arreglo factorial 5 x 3 (cinco concentraciones de la enzima y tres temperaturas).

Una vez dispuestos los tratamientos con las diferentes concentraciones de la enzima, fueron llevados inmediatamente a un cuarto con la temperatura definida para cada uno.

Para cuantificar el mucílago removido, después de 30 min. de estar en contacto el café despulpado con la enzima, de cada tratamiento, se tomó una muestra compuesta de 200 g de café, según el método propuesto por Mejía *et al.* (6). Esta prueba se realizó cada 30 min. hasta obtener, para los tratamientos con aplicación de enzima, el tiempo en el cual se presentó una remoción del mucílago superior a 98%. Para los tratamientos correspondientes a fermentación natural, las evaluaciones se realizaron después de 15 horas y hasta obtener el tiempo en el cual la remoción fuera superior a 97%.

Una vez obtenidos estos valores de remoción, se lavó el café, siguiendo el procedimiento de los cuatro enjuagues propuesto por Zambrano *et al.* (14).

El tiempo requerido para remover el mucílago de un lote de café varía de acuerdo al método empleado, pasando de 18 horas en promedio en la fermentación natural, a menos de seis horas por medios mecánicos, dependiendo de la capacidad del equipo y la cantidad de café a procesar. Por lo anterior, se consideró importante evaluar el porcentaje de remoción de mucílago en una hora para los tratamientos con adición de enzimas, como variable de respuesta.

El porcentaje de remoción de mucílago fue determinado mediante la siguiente fórmula <<1>> :

$$R_m = \left(1 - \frac{m_m - m_t}{r_t} \right) \times 100 \quad \ll 1 \gg$$

Donde:

m_m : Masa de la muestra de café con mucílago parcialmente removido en el tiempo t

m_t : Masa de la muestra de café sin mucílago en el tiempo t

r_t : Masa de mucílago de la muestra en el tiempo t , se estima mediante la <<Fórmula 2>>

$$r_t = r_0 \cdot M_t \quad \langle\langle 2 \rangle\rangle$$

Donde:

r_0 : Remoción inicial de mucílago y se estima mediante la <<Fórmula 3>>.

$$r_0 = \frac{m_{cd} - m_0}{m_0} \quad \langle\langle 3 \rangle\rangle$$

Donde:

m_{cd} : Masa de la muestra de café despulpado

m_0 : Masa de la muestra de café sin mucílago en el tiempo cero

Como variables complementarias se tuvo el tiempo para alcanzar remoción de mucílago superior al 98%. Así mismo, se registró el potencial de hidrógeno – pH, Sólidos Suspendidos Totales – SST, Sólidos Totales – ST y la Demanda Química de Oxígeno – DQO, de las aguas de lavado provenientes del proceso de remoción.

Como variable para determinar la calidad del café, se registró el puntaje final de las tazas evaluadas según muestras, el cual

indica la presencia o no de defectos y la clasificación de las muestras.

Para cada tratamiento se estimó el promedio y la desviación estándar, tanto con la variable de respuesta como con las complementarias.

Se aplicó un análisis de varianza al 5%, con la variable de respuesta, bajo el diseño experimental propuesto.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Remoción de mucílago. En la Tabla 2, se observan los resultados del análisis de la variable de respuesta, de acuerdo a la concentración de enzima adicionada a la masa de café despulpado y a la condición de temperatura ambiente, por separado y en interacción.

En general, los valores promedio de remoción de mucílago encontrados están entre 82,7% y 91,9%, con desviaciones estándar que variaron entre 1,9% y 6,7%. Así mismo, se observa que el promedio de esta variable no muestra una tendencia con relación a la temperatura de trabajo. Los tratamientos que alcanzaron mayores valores de remoción en una hora fueron aquellos en los cuales la concentración de la enzima Rohapect TPL estuvo entre 300 y 400 ppm.

Tabla 2. Promedio (Prom.) y desviación estándar (D.E.) para el porcentaje de remoción de mucílago en una hora, de acuerdo a la concentración y la temperatura.

Concentración Temperatura (°C)	100		200		300		400		Prom. (%)	D.E. (%)
	Prom. (%)	D.E. (%)	Prom. (%)	D.E. (%)	Prom. (%)	D.E. (%)	Prom. (%)	D.E. (%)		
15	82,7	3,9	87,4	4,5	90,4	3,3	91,9	3,2	88,1	5,0
20	86,4	2,8	88,4	2,7	88,7	2,2	89,2	4,0	88,2	3,0
25	85,6	1,9	84,9	6,7	86,1	6,4	89,9	3,3	86,6	5,0
Prom.	84,9		86,9		88,4		90,3			
D.E.	3,2		4,7		4,4		3,5			

Pese a que los valores obtenidos de remoción de mucílago son mayores que 80%, no se alcanza el 98% deseado para la eliminación del mucílago a través del lavado, con el fin de evitar fermentación en etapas posteriores, lo cual se convierte en un riesgo para el deterioro de la calidad, por la generación de sustancias indeseables que alteran el sabor de la bebida.

Para el análisis de cada factor por separado, se observa que no hay efecto de la temperatura sobre la variable de respuesta, no hay diferencias en el porcentaje de remoción de mucílago en las temperaturas de trabajo establecidas. Al analizar la concentración de la enzima, se encontró que ésta afecta el porcentaje de remoción.

Los resultados del análisis de varianza mostraron que no hay efecto de la interacción de los factores sobre la variable de respuesta. El porcentaje de remoción de mucílago en una hora no depende de la interacción Concentración x Temperatura, con lo cual se corrobora la hipótesis de trabajo.

La prueba de contraste al 5% indica una tendencia lineal positiva para la concentración, es decir, a mayor concentración de enzima, mayor remoción de mucílago en una hora.

Tiempo de remoción. En la Tabla 3, se observan los valores de tiempo obtenidos para lograr una remoción de mucílago mayor que 98%. En general, se presentan valores de tiempo entre 2 y 3 horas, independiente de la concentración y la temperatura de trabajo, para los tratamientos con adición de enzimas. Se requiere de mayor tiempo para lograr la condición de remoción en los tratamientos de 100 y 200 ppm a 15°C, mientras que para los tratamientos de 300 y 400 ppm a 25°C el tiempo requerido es de 2 horas, aproximadamente. Así mismo, los tratamientos con fermentación presentaron un tiempo entre 19,6 y 20,4 horas para alcanzar el 96,0% de remoción.

En la Figura 1 se observa el comportamiento del porcentaje de remoción de mucílago a través del tiempo para los tratamientos con adición de enzima, en las concentraciones

Tabla 3. Valores de tiempo para lograr remoción de mucílago mayor que 98% por tratamiento.

Temperatura (°C)	Concentración (ppm)	Tratamiento	Tiempo (h)
15	0	1	20,4
	100	2	3,0
	200	3	3,0
	300	4	2,5
	400	5	2,5
20	0	6	19,6
	100	7	2,9
	200	8	2,8
	300	9	2,6
	400	10	2,6
25	0	11	19,6
	100	12	2,6
	200	13	2,5
	300	14	2,2
	400	15	2,1

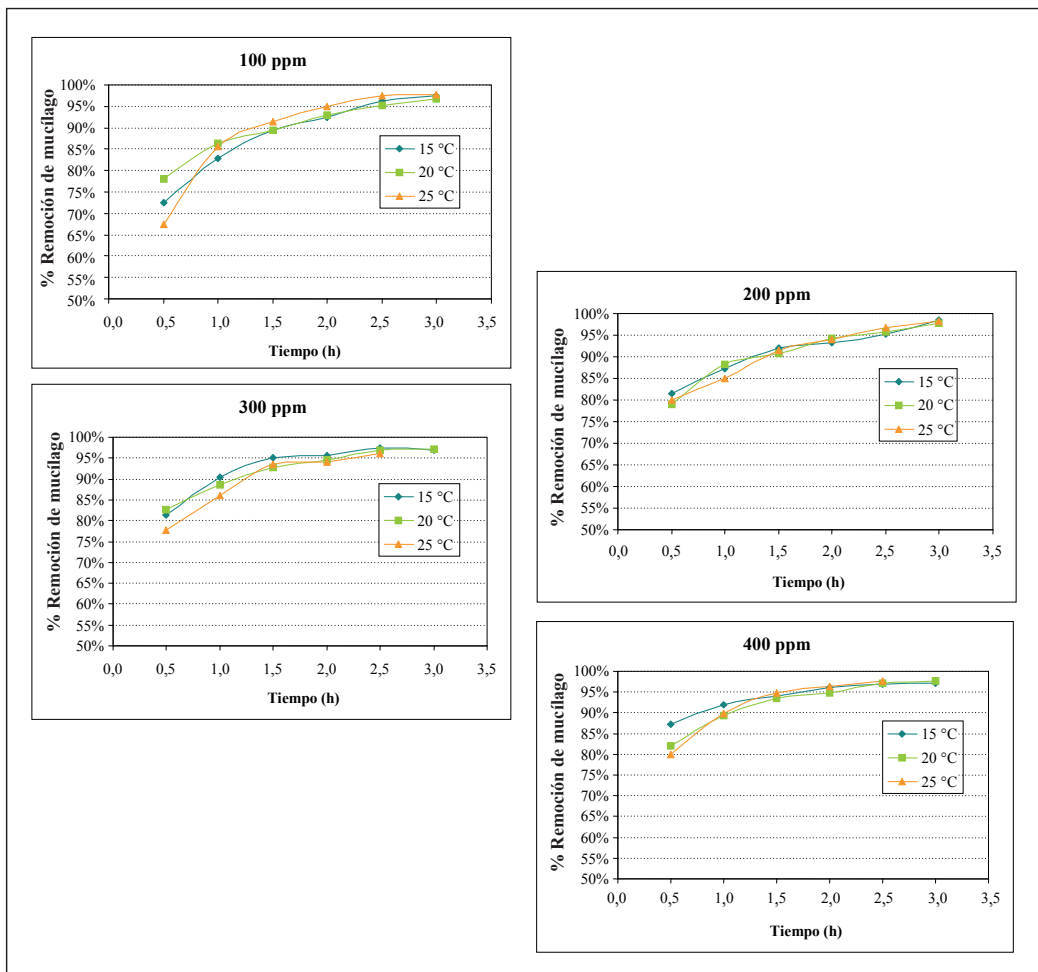


Figura 1. Remoción de mucilago (%) con relación al tiempo de proceso, para las concentraciones evaluadas a diferentes temperaturas.

evaluadas, en las tres temperaturas de trabajo. Las curvas muestran un aumento progresivo de la remoción de mucilago con el tiempo, sin presentar diferencia por efecto de la temperatura. Se observa que la tasa de remoción de mucilago al final del proceso es menor con relación a la primera hora de trabajo, dado que a las 2 horas se presentan valores de remoción cercanos a 95%, y sólo se alcanza una remoción mayor que 98%

después de la siguiente hora, explicable por la disminución del sustrato al final del proceso.

Adicionalmente, se determinó el contenido de mucilago en el café despulpado, el cual varía de acuerdo al estado de madurez, es así como en promedio en el café despulpado de la Variedad Castillo® los frutos pintones contienen 22,0% de mucilago, los frutos maduros poseen 30,9% y los sobremaduros

27,5% de mucílago (8). Los valores de contenido de mucílago obtenidos presentaron un promedio de 27,7% sobre la masa de café despulpado, con un mínimo de 22,1 y un máximo de 30,8%, que se encuentran dentro del rango determinado para la variedad utilizada (9).

Indicadores de impacto ambiental. Una vez degradado el mucílago, es necesario retirarlo del grano a través del lavado, para esto se utilizó la técnica de los cuatro enjuagues (14), en la cual se requiere 4,2 L de agua por cada kilogramo de café pergamino seco obtenido al final del proceso. Las aguas residuales resultantes presentan una carga orgánica alrededor de 27.000 ppm, expresada en términos de Demanda Química de Oxígeno.

El consumo específico de agua obtenido en cada una de las evaluaciones, presentó un valor promedio de 4,2 L/kg cps, en un rango entre 3,6 y 5,0 L/kg cps, lo cual indica que la operación de lavado utilizando la técnica de los cuatro enjuagues fue efectuada correctamente.

En la Tabla 4 se presentan los promedios de los indicadores físicos y químicos de la

calidad del agua residual, obtenidos para cada uno de los tratamientos evaluados.

En general, se observa que los valores registrados para la variable Sólidos Suspendedos Totales son inferiores a 4.000 mg/L, con un promedio general de 3.040 mg/L. Los promedios de Sólidos Totales se encuentran entre 19.045 y 29.133 mg/L, con un promedio general de 21.295 mg/L. Los valores de D.Q.O. (expresados en mg/L), tienen un promedio de 27.700 mg/L. Estos resultados indican que en las aguas residuales del lavado del café se registraron los valores normales de carga orgánica determinados para este tipo de proceso, siendo adecuados para el ingreso al Sistema Modular de Tratamiento de Anaerobio, S.M.T.A (15). No obstante, debe realizarse el tratamiento posterior de estas aguas residuales, independiente del proceso de remoción (natural o enzimático), con el fin de remover la mayor cantidad de carga orgánica antes de ser liberadas a las fuentes de agua.

Adicionalmente, de acuerdo con el análisis de varianza no hay diferencia estadística entre los tratamientos con adición de diferentes

Tabla 4. Valores promedio (Prom.) y desviación estándar (D.E.) de Sólidos Totales, Sólidos Suspendedos Totales y Demanda Química de Oxígeno por concentración de enzima evaluada.

Indicador	Concentración (ppm)									
	0		100		200		300		400	
	Prom.	D.E.	Prom.	D.E.	Prom.	D.E.	Prom.	D.E.	Prom.	D.E.
Sólidos Totales (mg/L)	23.751	7.682	19.555	4.321	21.469	4.759	21.552	4.149	20.146	2.617
Sólidos Suspendedos Toatales (mg/L)	3.480	625	2.937	714	3.155	1.051	2.835	760	2.792	580
D.Q.O. (mg/L)	27.561	6.810	27.480	4.672	28.352	3.696	28.425	3.248	27.092	4.512

concentraciones de la enzima, ni con los tratamientos por fermentación natural.

En la Figura 2, se observa el comportamiento del pH, como indicador de acidez del agua. Se obtuvo una diferencia en los valores de los tratamientos con fermentación natural (pH 3,83) con relación con los tratamientos de adición de la enzima (5,64 – 5,96), indicando menor acidez del agua en los últimos. Esta diferencia se debe a que en el agua proveniente de fermentación natural se retiran compuestos como ácidos orgánicos propios del proceso fermentativo de los azúcares y de la degradación de la pectina del mucílago,

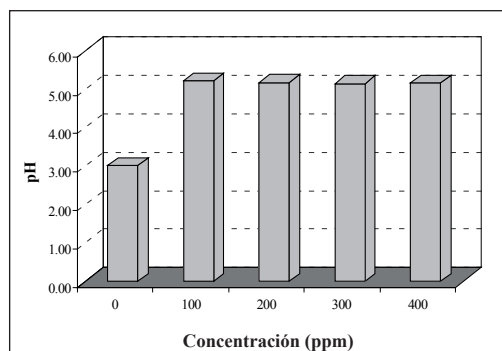


Figura 2. Valores promedio por concentración para el pH del agua residual del lavado del café.

que disminuyen el pH, mientras que en los tratamientos con enzima no ocurren estas reacciones, por lo que se obtienen mayores valores en esta variable.

Calidad del café en taza. Las muestras de café pergamino seco, presentaron una humedad en el rango establecido para conservar la calidad del café (10% – 12% b.h.), con valores entre 10,1% y 11,9% b.h.

Para el análisis se tuvo como criterio de evaluación el puntaje total dado a las tazas por el panel de catación, según la escala SCAA (Asociación Americana de Cafés Especiales, por sus siglas en inglés), la cual clasifica la calidad del café de acuerdo con el puntaje total obtenido (13), como se observa en la Tabla 5.

En total, se obtuvieron 70 muestras, de las cuales ninguna presentó defectos, lo cual indica que la remoción de mucílago por medios enzimáticos o por fermentación natural se realizó correctamente. Las tazas de todos los tratamientos presentaron puntaje entre 62,0 y 87,5. En general, el 76% de las muestras presentó puntaje superior a 70, indicando una clasificación de calidad media. En la Tabla 6, se presentan los valores para el promedio y desviación estándar de

Tabla 5. Escala de clasificación para la catación del café de acuerdo al puntaje total, según SCAA.

Puntaje Total	Descripción de la Especialidad	Clasificación
95 – 100	Ejemplar o único	Especialidad súper premio
90 – 94	Extraordinario	Premio a la especialidad
85 – 89	Excelente	Especialidad
80 – 84	Muy bueno	Premio
75 – 79	Bueno	Calidad usual buena
70 – 74	Pasable	Calidad media
60 – 70		Grado de cambio
50 – 60		Comercial
40 – 50		Abajo del grado
< 40		Fuera de grado

Tabla 6. Promedio (Prom.) y desviación estándar (D.E.) para el puntaje total de las tazas por concentración.

Concentración (ppm)	Prom.	D.E.
0	75,6	6,4
100	77,2	6,7
200	76,6	6,8
300	74,1	6,0
400	77,7	7,1

calificación total obtenido para las muestras correspondientes a cada concentración, con los cuales se observa que la calidad de la bebida no es afectada por la aplicación de la enzima al proceso.

En general, se concluye que:

Con la adición de la enzima se logra la reducción del tiempo de remoción de mucílago entre el 85% y 90% con relación al mayor tiempo obtenido por fermentación natural, lo cual se convierte en una ventaja para la continuidad del proceso de beneficio y reducción del tiempo total de proceso.

Los porcentajes de remoción de mucílago son superiores a 98%, aspecto favorable para tener mayor control en esta etapa del proceso y de esta forma disminuir los riesgos de deterioro de la calidad debidos a fermentaciones incompletas o prolongadas.

La calidad final del café no se ve afectada por el uso de la enzima para el desmucilaginado del café, puesto que no se presentaron defectos en ninguno de los tratamientos evaluados y más del 60% de las muestras presentaron calificación mayor que 75 puntos en la sumatoria del puntaje por atributos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos al personal de la disciplina de Ingeniería Agrícola, a la doctora Esther Cecilia Montoya de la Disciplina de Biometría y al personal de la Estación Central Naranjal. Así mismo agradecen a la empresa Ingredientes y Productos Funcionales – IPF y AB Enzymes, cofinanciadoras de esta investigación y al Panel de evaluación sensorial de café de la granja El Agrado del Comité Departamental de Cafeteros de Quindío.

LITERATURA CITADA

1. AB ENZYMES. Rohapect TPL: Description and specification. Darmstadt: AB ENZYMES, 2009. 2 p.
2. AVALLONE, S.; BRILLOUET, J.M.; [et al.]. Involvement of pectolytic micro-organisms in coffee fermentation. *International journal of food science and technology*. 37: 191–198. 2002.
3. CALLE V., H. Curso de café. En: CURSO de materias técnicas y extensión rural [Mayo 6-16 : 1964]. Chinchiná : CENICAFÉ, 1964. 13 p.
4. CALVERT, Ken. The microbiology of coffee processing. [En línea]. New Zealand : RENERTECH, 2011. Disponible en internet: <http://www.coffee.20m.com/Espanoltranslations/MicroSpanish.pdf>. (Consultado el 28 de septiembre de 2011).
5. CENICAFÉ. Anuario meteorológico cafetero 2008 [cd rom]. Chinchiná : CENICAFÉ, 2010. 569 p.
6. MEJÍA G., C.A.; OLIVEROS T., C.E.; [et al.]. Evaluación del desempeño técnico y ambiental de un desmucilagador de café con rotor de varillas. *Cenicafé* 58(2):122-133. 2007.
7. OLIVEROS T., C.E., SANZ U., J.R.; [et al.]. Separador hidráulico de tolva y tornillo sinfin. Chinchiná : CENICAFÉ, 2007. 8 p. (Avances Técnicos No. 360).
8. PEÑUELA M., A.E. Informe anual de actividades septiembre 2007 – octubre 2008. Chinchiná : CENICAFÉ, 2008. 26 p.

9. ------. Estudio de la remoción del mucílago de café a través de fermentación natural. Manizales : Universidad de Manizales, 2010. 82 p. Tesis: Maestría en desarrollo sostenible y medio ambiente.
10. PUERTA Q., G.I. Efecto de enzimas pectolíticas en la remoción del mucílago de *Coffea arabica* L. según el desarrollo del fruto. *Cenicafé* 60(4):291-312. 2009.
11. ROA M., G.; OLIVEROS T., C.E.; [et al.]. Beneficio ecológico del café. Chinchiná : CENICAFÉ, 1999. 273 p.
12. SANZ U., J.R.; OLIVEROS T., C.E.; [et al.]. Paleta plástica para lavar café con menor esfuerzo. Chinchiná : CENICAFÉ, 2007. 4 p. (Avances Técnicos No. 361).
13. SPECIALTY COFFEE ASSOCIATION OF AMERICA. SCAA protocols: Cupping specialty coffee version 21nov2009a. [En línea]. California : SCAA, 2009. 7 p. Disponible en internet: [Http://www.scaa.org/PDF/PR%20-%20CUPPING%20PROTOCOLS%20V.21N OV2009A.pdf](http://www.scaa.org/PDF/PR%20-%20CUPPING%20PROTOCOLS%20V.21N%20OV2009A.pdf). (Consultado el 21 de noviembre de 2009).
14. ZAMBRANO F., D.A.; ISAZA H., J.D. Lavado del café en los tanques de fermentación. *Cenicafé* 45(3):106-118. 1994.
15. ZAMBRANO F., D.A.; RODRÍGUEZ V., N.; [et al.]. Tratamiento anaerobio de las aguas mieles del café. Chinchiná : CENICAFÉ, 2006. 28 p. (Boletín Técnico No. 29).