

**MARCO CONCEPTUAL SOBRE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y LA
HUMEDAD RELATIVA EN LA FERMENTACIÓN SÓLIDA DEL GRANO DE CAFÉ
ARÁBICA SOBRE EL CONTENIDO DEL ÁCIDO 5-O-CAFEOILQUÍNICO.**

ANA MARÍA GARCÍA ZAPATA

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA

ESCUELA DE INGENIERÍA

FORMACIÓN AVANZADA

MAESTRÍA EN INGENIERÍA

MEDELLÍN

2016

MARCO CONCEPTUAL SOBRE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y LA HUMEDAD RELATIVA EN LA FERMENTACIÓN SÓLIDA DEL GRANO DE CAFÉ ARÁBICA SOBRE EL CONTENIDO DEL ÁCIDO 5-O-CAFEOILQUÍNICO.

ANA MARÍA GARCÍA ZAPATA

Magister en Ingeniería

Asesor

JUAN CAMILO OVIEDO LOPERA

Ms.C Biotecnología, Ph D en Ingeniería

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA

ESCUELA DE INGENIERÍAS

FORMACIÓN AVANZADA

MEDELLÍN

2016

(Noviembre 16 de 2016)

(Yo, Ana María García Zapata)

“Declaro que esta tesis (o trabajo de grado) no ha sido presentada para optar a un título, ya sea en igual forma o con variaciones, en esta o cualquier otra universidad” Art 82 Régimen Discente de Formación Avanzada.

Firma

A la memoria de mi familia y amigos que estuvieron conmigo en todo momento. Totalmente
agradecida con Dios.

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos a los profesores Juan Camilo Oviedo Lopera, Alan Hill Betancur, Cesar Isaza Roldán, Cesar Nieto Londoño, Ana Elisa Casas Botero, y todos mis amigos que dedicaron su tiempo y apoyo en la realización de este trabajo.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
GLOSARIO	10
RESUMEN	13
INTRODUCCIÓN	14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
CAPITULO 1. MARCO TEÓRICO	20
1.1. GENERALIDADES DEL CAFÉ ARÁBIGO	20
1.1.1. Especies y variedades de café en Colombia	20
1.2. COMPOSICIÓN DEL FRUTO DE CAFÉ	23
1.2.1 Composición bioquímica de la pulpa	24
1.2.2 Composición bioquímica del mucílago	26
1.2.3 Composición fisicoquímica de la cascarilla de café	27
1.2.4 Composición bioquímica de la película plateada de café	29
1.2.5 Composición bioquímica del grano de café	31
1.3. COMPUESTOS VOLÁTILES DE INTERÉS BIOLÓGICO EN EL CAFÉ VERDE	35
1.4. COMPUESTOS NO VOLÁTILES DE INTERÉS BIOLÓGICO EN EL CAFÉ VERDE	35
1.4.1 Fibra dietaria soluble	36
1.4.2 Agua	36
1.4.3 Carbohidratos	36
1.4.4 Proteínas, péptidos y aminoácidos libres.	37
1.4.5 Minerales	37
1.4.6 Lípidos	38
1.4.7 Cafeína	39
1.4.8 Trigonelina	39
1.4.9 Cafestol y Kahweol	40
1.4.10 Ácidos alifáticos	41
1.4.11 Antioxidantes y Ácidos clorogénicos	42

1.5.	GENERALIDADES DEL BENEFICIO DEL CAFÉ	44
1.6.	GENERALIDADES DE LA FERMENTACIÓN DE CAFÉ	50
1.6.1.	Fermentación láctica	50
1.6.2.	Fermentación acética	51
1.6.3.	Fermentación alcohólica	51
1.6.4.	Formación de ácidos del café según la fermentación	51
1.7.	SISTEMAS DE FERMENTACIÓN DEL CAFÉ	52
1.8.	FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO	54
1.9.	MEDICIONES EN LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO	54
1.9.1	Procesamiento digital de imágenes (PDI)	55
1.9.2	Método de balance de gas metabólico	55
1.9.3	Modelación matemática	58
CAPÍTULO 2. FACTORES BIÓTICOS Y ABIÓTICOS QUE INFLUYEN EN EL CONTENIDO DE 5-O-CAFEOILQUÍNICO		59
2.1	FERMENTACIÓN CONTROLADA EN CAFÉ	61
2.2	PARÁMETROS DEL BIOPROCESO DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO	62
2.2.1	Relación de agua en el sistema	62
2.2.2	Propiedades termo-físicas	64
2.2.3	Temperatura	66
2.2.4	pH del sustrato	67
2.2.5	Aireación y agitación	68
2.2.6	Mezclado	68
2.2.7	Tamaño de partícula y uniformidad de la biomasa	68
2.2.8	Condiciones asépticas e Inóculo microbiológico	69
2.2.9	Morfología de los microorganismos	69
2.3	MICROORGANISMOS Y ENZIMAS PARA EL DESARROLLO DE CUALIDADES EN EL CAFÉ	71
2.4	DESCOMPOSICIÓN DE ÁCIDOS CLOROGÉNICOS DURANTE EL PROCESO DE INDUSTRIALIZACIÓN	79
2.4.1	Análisis fisicoquímicos de ácidos clorogénicos.	81
CAPÍTULO 3. TERMODINÁMICA DE LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO		84
3.1	MODELOS TERMODINÁMICOS APLICADOS A BIOPROCESOS	84
3.1.1	Balance de masa general	84

3.1.2	Balance de energía	86
3.1.3	Modelos de cinética de crecimiento empíricos	89
3.1.4	Modelos de ruta metabólica	93
3.1.5	Modelos de formación de producto	94
3.2	CLASES DE BIORREACTORES EN FES	96
3.2.1	Clasificación de los biorreactores en FES	96
3.2.1.1	<i>Grupo I.</i>	96
3.2.1.2	<i>Grupo II.</i>	97
3.2.1.3	<i>Grupo III.</i>	97
3.2.1.4	<i>Grupo IV.</i>	97
	CONCLUSIONES	100
	RECOMENDACIONES	102
	BIBLIOGRAFÍA	103

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición bioquímica de la pulpa de café	25
Tabla 2. Composición bioquímica del mucílago.	26
Tabla 3. Composición físico-química de la cascarilla de café.....	28
Tabla 4. Composición de la película plateada o “silver skin” de café	29
Tabla 5. Composición química de las semillas de <i>C. arabica</i> verde.....	32
Tabla 6. Características físico-químicas del ácido 5-O cafeoilquínico.....	44
Tabla 7. Métodos de beneficio alternativos en el café.....	48
Tabla 8. Tipo de fermentación y ácido de formación asociado	52
Tabla 9. Mínima actividad de agua (aw) para el crecimiento y producción de toxinas por diferentes hongos.	64
Tabla 10. Parámetros termo-físicos de muestras de café orgánico y convencional.....	65
Tabla 11. Microorganismos cultivados en pulpa, cascarilla de café y procesos de beneficio húmedo, seco y semi-seco.....	75
Tabla 12. Gradiente de elución para análisis HPLC.....	82
Tabla 13. Ecuaciones que describen el efecto de la temperatura en X_m y μ_m en el modelo logístico.....	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sección de un fruto de café	24
Figura 2. Localización del embrión en el grano de café y forma del embrión	34
Figura 3. Estructura del isómero 5-O cafeoil-quínico	44
Figura 4. Principales métodos de beneficio y procesado de café.	46
Figura 5. Dos tipos principales de beneficio de café desarrollado en Colombia.....	47
Figura 6. Ruta metabólica del fenilpropanoide.....	61
Figura 7. Procesos FES propuestos para evaluación de la conservación y producción de ácido 5-O-Cafeoilquínico.....	79
Figura 8. Hidrólisis de los ácidos clorogénicos en la tostión.....	80
Figura 9. Clasificación de los biorreactores en FES	99
Figura 10. Biorreactores para FES.....	100

GLOSARIO

ABIOTICO: comprende todos los fenómenos físicos (presión atmosférica, lluvia, aire, suelo, etc.) y químicos (componentes de la rocas, minerales, salinidad del agua, etc.) que afectan a los Organismos.

ANABOLISMO: conjunto de procesos metabólicos de síntesis de moléculas complejas a partir de otras más sencillas.

BIOTICO: comprende todos los seres vivos existentes en un ecosistema, y las interrelaciones que se forman entre ellos, plantas, animales (incluido el hombre) y microorganismo.

BIOMASA: es el peso seco total de todos los organismos que se miden y equivale al cultivo bruto existente.

CAFÉ EN BABA: se denomina de esta manera al café que ha sido despulpado, es decir que se ha retirado el epicarpio o piel externa, y que está impregnado de una sustancia azucarada llamada "mucílago" o "baba".

CATABOLISMO: conjunto de procesos metabólicos de degradación de sustancias para obtener otras más simples.

CREPITACIÓN: sonidos repetidos, rápidos y secos, como el de la sal en el fuego. En el café, este sonido es producido por el efecto del calor, e indica un cambio en la presión interna del grano, su desarrollo como grano tostado y de sus respectivas características fisicoquímicas y organolépticas.

DIFUSIVIDAD TÉRMICA: difusividad térmica de un material, indica la razón a la que el calor se distribuye en un material. Dicha razón depende no solamente de la conductividad térmica del material, sino también de la razón a la cual puede almacenar la energía. Este parámetro de transporte térmico, único para cada material y por ende relacionado con su microestructura y composición química, es de especial interés para la optimización de procesos de almacenamiento, congelación y tostado de alimentos.

EMBRIÓN: es el esbozo de la futura planta contenido en la semilla. Está formado por una raicilla o radícula, un tallo o hipocotilo y una especie de pequeñas hojas llamadas cotiledones.

ENDÓFITO: son distintos organismos que viven dentro de una planta sin que importe la relación que guardan con ella. Se utiliza para referirse a los organismos que en algún periodo de su ciclo de vida habitan dentro de las plantas colonizando sus tejidos sin causar perjuicio aparente. Aunque no hay certeza sobre los mecanismos de acción, los endófitos confieren gran potencial adaptativo a las especies vegetales hospederas frente a condiciones adversas que generen estrés, ya sean de tipo abiótico (salinidad, acidez) o biótico (ataque de plagas).

EXERGÍA: energía máxima de un sistema que se puede transformar en trabajo útil.

FENOTÍPICO: manifestación variable de las características del genoma de un organismo en un determinado ambiente.

GLUTATIÓN: El glutatión (GSH) es un tripéptido que contiene un enlace peptídico inusual entre el grupo amino de la cisteína y el grupo carboxilo de la cadena lateral de glutamato. Es un antioxidante, y protege a las células de toxinas tales como los radicales libres. El glutatión se encuentra casi exclusivamente en su forma reducida, ya que la enzima que lo revierte a partir de su forma oxidada (GSSG), la glutatión reductasa, es constitutivamente activa e inducible bajo estrés oxidativo. De hecho, la proporción de glutatión reducido respecto a la de glutatión oxidado dentro de las células se utiliza a menudo científicamente como una medida de toxicidad celular.

Su fórmula química es $C_{10}H_{17}N_3O_6S$, su masa molar es de 307,3 g/mol, su temperatura de fusión es 185-195°C y su potencial redox 0,24 V.

HIDROLISIS: desdoblamiento de una molécula por la acción del agua.

HIFAS: son una red de filamentos cilíndricos que conforman la morfología del cuerpo de los hongos multicelulares. Están constituidos por una fila de células alargadas y tubulares, envueltas por una pared celular compuesta de quitina. El conjunto de estas hifas se denomina micelios.

HOMEOSTASIS: conjunto de fenómenos de autorregulación, que conducen al mantenimiento de la constancia en la composición y propiedades del medio interno de un organismo.

MICROBIOTA: es el término que se utiliza para designar los microorganismos que viven en un entorno específico, llamado a sí mismo microbioma. Estos microorganismos pueden ser hongos, levaduras, bacterias o virus.

RESUMEN

La investigación busca construir el marco conceptual para comprender el cambio en la composición del café que afecta sus cualidades sensoriales, especialmente por la presencia de ácidos clorogénicos, de acuerdo a las variaciones en los parámetros termodinámicos como la temperatura y humedad relativa, durante una fermentación en estado sólido (FES) de café Arábica.

El compuesto específico a considerar en las reacciones bioquímicas en la FES es el ácido clorogénico (CGA) 5-CQA en el grano, su incidencia en la taza, y la presencia de este ácido en los subproductos como alternativa para agregar valor. La revisión de literatura busca profundizar en el conocimiento de las generalidades del café, los ácidos clorogénicos, así como los avances en procesos FES para la generación o conservación de estos compuestos. Se dedica un capítulo a los microorganismos y enzimas por considerarse uno de los principales parámetros en la FES. De igual manera se presenta una revisión de los principales modelos matemáticos aplicados a FES que permita proponer un modelo que represente el sistema, y en el que se establezcan las relaciones o funciones entre las variables temperatura y humedad para la conservación, potenciación y/o incremento de CGA. Por último se plantean los análisis químicos requeridos para determinar el compuesto de interés, entre los que se encuentra la Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detector UV-Vis y Espectroscopía infraroja por transformada de Fourier (FT-IR) para la identificación cualitativa y cuantitativa de los ácidos orgánicos presentes en el café verde.

**PALABRAS CLAVE: FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO,
MICROORGANISMOS, ENZIMAS, MODELOS MATEMÁTICOS.**

INTRODUCCIÓN

La especie *Coffea arabica* y sus variedades V. Colombia, V. Castillo®, V. Caturra, V. Typica, V. Bourbon, y otras introducidas recientemente con el objetivo de mejorar las características organolépticas y sensoriales del grano, componen el total de la producción de café en Colombia que, para el año cafetero 2016, se reportó cercana a los 14,5 millones de sacos de 60 kg, según cifras de la Organización Internacional del Café (OIC). De esta producción, la participación de cafés especiales estuvo alrededor del 23,5 %, cifra que no se consolidaba en los años cafeteros anteriores, pero que evidencia un creciente interés del mercado internacional y nacional sobre el café diferenciado, así como de los productores del grano por la mejora significativa de su precio. Un café especial en términos sencillos es aquel que se diferencia por sus atributos sensoriales en la bebida, que tiene una puntuación mayor a 86 en la escala de la SCAA (Specialty Coffee Association of America) y por el cual el mercado está dispuesto a pagar precios superiores a los transados en calidad de *commodity* (mercancía genérica o no diferenciada) en las principales bolsas de valores del mundo.

Con el objetivo de encontrar mecanismos a través de los cuales se pueda dar la diferenciación del café, se ha realizado la consulta sobre estudios que relacionan los procesos poscosecha del café, las características sensoriales y el contenido de compuestos de importancia biológica como los ácidos clorogénicos en el grano; con esta finalidad se hace especial énfasis en este trabajo en el beneficio y el proceso de fermentación en estado sólido (FES) buscando conservar, potenciar y/o incrementar los compuestos conocidos como ácidos clorogénicos, especialmente el ácido 5-O-Cafeoilquínico.

Los ácidos clorogénicos, pertenecientes al grupo de compuestos fenólicos, son actualmente de alto interés puesto que se consideran antioxidantes, anticancerígenos, con efectos antimicrobiales y de interés en el tratamiento de diversas enfermedades (Baeza et al., 2014; Erk et al., 2012; Igho, Rohini, & Edzard, 2011; Mikami & Yamazawa, 2015; Sato et al., 2011; Shimoda, Seki, & Aitani, 2006; Suzuki, Kagawa, Ochiai, Tokimitsu, & Saito, 2002; Thom, 2007; Watanabe et al., 2006). La producción de estos ácidos en las plantas se presenta como respuesta del metabolismo

secundario activado para la adaptación a factores bióticos y abióticos, y para el caso de una FES, por acción de los microorganismos (a través de rutas metabólicas secundarias en interacción con la pulpa de café) o por la liberación de estos fenólicos de la matriz del sustrato por acción enzimática extracelular que se inicia posteriormente en el mismo grano (Dey, Chakraborty, Jain, Sharma, & Kuhad, 2016; Schwan & Fleet, 2014). Entre los factores ambientales, precursores en la formación y conservación de estos compuestos en el café, se incluyen la temperatura y humedad de las regiones productoras en alta montaña. Por lo tanto, las condiciones propicias de humedad, temperatura y del agente de fermentación en el proceso FES, dan lugar a la conservación y evidencian la producción de estos compuestos en la fermentación.

Una de las principales ideas a desarrollar, basada en la información obtenida de diversos estudios, es plantear la etapa experimental en un proceso FES para determinar el efecto de cambios en la temperatura y humedad en el sistema durante el proceso, y si estas modificaciones influyen en la conservación e incluso en el incremento de los ácidos clorogénicos, específicamente el 5-O-cafeoilquinico. Se espera lograr en primer lugar el desarrollo de sabores y aromas en la bebida o taza de café que agreguen valor y lo incluyan en el rango de cafés especiales. En otro contexto se plantea el café y/o el sustrato (pulpa de café) de la FES como materia prima potencial en industrias como la cosmética, farmacéutica y alimentaria ante el incremento de compuestos de interés y de origen metabólico como son los antioxidantes; además de encontrar alternativas para disminuir la presión que ejerce en los ecosistemas, el uso intensivo del recurso hídrico ampliamente difundido en la producciones cafeteras, al desarrollar métodos de fermentación con menor consumo de agua, estableciendo los parámetros humedad y temperatura en FES. Se busca desarrollar lo expuesto anteriormente en coherencia con las buenas prácticas de beneficio del fruto y/o semilla del café.

El trabajo que se presenta a continuación, se divide en tres capítulos. En el primer capítulo se presenta el marco teórico sobre las generalidades del café, los componentes de importancia biológica en el grano, incluidos los ácidos clorogénicos, los principales métodos de beneficio y los principales sistemas de fermentación. El capítulo dos incluye una relación de los trabajos recientes encontrados sobre fermentación en estados sólido (FES) en café, los hallazgos con respecto a los microorganismos y enzimas investigados en el proceso del café y su relación con la producción de compuestos fenólicos, grupo químico al que pertenece el ácido 5-O-Cafeoilquinico. En el tercer

capítulo se plantean las ecuaciones para el balance de masa y energía en FES, con posibilidad de ser aplicadas al café y al diseño de biorreactores para llevar a cabo procesos FES eficientes.

Con el fin de describir los principales hallazgos en el proceso FES y su incidencia en el contenido de ácidos clorogénicos se llevó a cabo una revisión de la literatura y la construcción del estado del arte, a través de consulta en las Bases de datos PubMed, EBSCOhost, Web of Knowledge, ScienceDirect, Scopus y SciELO. Los términos empleados fueron “Coffee”, “Coffee Chlorogenic acids”, “Chlorogenic acids”, “coffee solid fermentation”, “solid fermentation”. Las principales restricciones fueron la fecha de publicación y los temas Ciencia de alimentos, biotecnología, microbiología aplicada y microbiología, en relación al café y su contenido de antioxidantes, específicamente el ácido clorogénico 5-O-cafeoilquinico.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La industria del café en Colombia se encuentra en un proceso de cambio que incluye todos los niveles de la cadena productiva. Desde la producción primaria, se encuentra un incremento del 83% en la producción de sacos de café pergamino verde de 60 kg, al pasar de 7,7 millones en 2012 a 14,2 millones de sacos en 2015 (Fedecafé, 2016). En el aspecto de mercado, el café no transformado está sometido a fluctuaciones ligadas a las condiciones del precio internacional, y por ser catalogado como un *commodity*, es susceptible a la especulación. Esto hace que se planteen nuevas alternativas para agregar valor a la producción.

En aspectos de calidad, Colombia se ha caracterizado por producir un café bajo la denominación de suave lavado colombiano, participando en cifras aproximadas con US\$ 2.500 millones, en un mercado mundial cercano a los US\$ 30.000 millones de dólares transados en el año 2015 (Trademap, 2015). Para el año 2013, Colombia exportó US\$1,2 millones en cafés especiales, dentro de un segmento de mercado que representa aproximadamente el 12% del consumo mundial y en volumen similar al de toda la cosecha de café en Colombia. En este sentido, la producción y comercialización de cafés especiales se ha catalogado como una estrategia que contribuye a mejorar el precio del grano y la rentabilidad de la producción cafetera (Fedecafé, 2013).

El término “café especial”, es atribuido a la noruega Erna Knutsen, experta tostadora de café, quien empleó por primera vez este término en la conferencia internacional de café, celebrada en Montruil (Francia) en 1978 (Ponte, 2003, 2004). Este concepto hace alusión a la geografía y a los microclimas, que permiten la producción de granos de café con sabor único y de características particulares que preservan su identidad. En 1982, se creó la Asociación Americana de Cafés Especiales (SCAA), y ésta definió el término “café especial” como “un café de buena preparación, de un origen único y sabor distintivo” (Cague, R.; Hube A.; Gibson, 2002; Farfan, 2011). Según la definición actualizada el café en grano verde especial, es aquel que no tiene defectos y tiene un carácter distintivo en la taza, con una puntuación de 87 o más cuando se califica de acuerdo a las Normas de la SCAA (SCAA, 2012). Bajo este concepto, todos los atributos que tenga un buen café se deben entonces a una suma de factores que van desde el manejo de una variedad durante

la etapa de cultivo, pasando por la poscosecha (beneficio y secado), hasta la adecuada preparación de la bebida.

En términos de condiciones de producción, la caficultura colombiana, se localiza en altitudes que varían entre los 1.000 y los 2.000 m, en las cuales la temperatura mínima fluctúa entre 12,2 y 18,1°C y la temperatura máxima entre 22,4 y 28,2°C respectivamente (Jaramillo, 2005). Teniendo como referencia estos valores, el Centro de Investigaciones e Innovación en el Café (CENIFCAFE), evaluó el efecto de la temperatura externa de la fermentación en la calidad del café, en los compuestos químicos del mucílago y en los volátiles del café tostado. Se realizaron fermentaciones sólidas y sumergidas de café a temperaturas constantes de 15±1 y 20±1°C, y a temperaturas entre la noche y el día de 18 a 26°C (promedio 23°C) en sistemas abiertos y cerrados. Los resultados mostraron mejoras en taza atribuibles al control de la temperatura (Puerta, 2015), lo que indicaría la relación directa de la temperatura tanto en beneficios tradicionales en alta montaña como en sistemas de fermentación controlados.

Se ha corroborado que las características organolépticas en las bebidas de café se deben a la interacción y transformación de los componentes presentes en el grano producto de los procesos que ocurren desde el cultivo hasta el beneficio y preparación de la bebida. Los componentes que interactúan en la modificación de las características organolépticas o de taza son los polisacáridos, la sacarosa, los azúcares reductores, las proteínas, los aminoácidos, la cafeína, la trigonelina, los lípidos, los ácidos alifáticos, los ácidos clorogénicos, los minerales y los compuestos aromáticos. Entre estos compuestos, los ácidos clorogénicos (CGA) son ácidos orgánicos que se encuentran en gran cantidad de plantas, cumplen funciones de protección y como antioxidante para la planta, son termolábiles y son los principales constituyentes entre los ácidos orgánicos del grano de café verde (T. W. Baumann, 2005). Han sido reconocidos más de 70 tipos de CGA en los granos de café verde (Kuhnert, N., Karaklose, H., & Jaiswal, 2012) y son responsables de impartir sabores y sensaciones organolépticas en la bebida de café. El contenido de CGA en el grano verde varía entre 4.0–8.4% materia seca en *Coffea arabica* (Arabica) y 7.0-14.4% materia seca en *Coffea canephora* (Robusta) (Bicho, Leitão, Ramalho, de Alvarenga, & Lidon, 2013; Ky, C. L., Louarn, J., Dussert, S., Guyot, B., Hamon, S., & Noirot, 2001; Upadhyay & Mohan Rao, 2013). En estudios recientes se ha encontrado que tienen un efecto antimicrobial, neuroprotector y de regulación del metabolismo de los azúcares en el cuerpo humano (Baeza et al., 2014; Bajko, Kalinowska,

Borowski, Siergieczyk, & Lewandowski, 2015; Erk et al., 2012; Igho et al., 2011; Mikami & Yamazawa, 2015; Sato et al., 2011; Shimoda et al., 2006; Suzuki et al., 2002; Thom, 2007; Watanabe et al., 2006)..

Por su importancia biológica, se han empleado técnicas instrumentales químicas para detectar, identificar y cuantificar los CGA como son la espectroscopía con Infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR), espectroscopía con Infrarrojo por transformada de Fourier y acople ATR (FT-IR ATR), espectroscopia Raman por transformada de Fourier (FT-Raman), espectroscopía con Infrarrojo cercano (NIRS), Cromatografía líquida de alto rendimiento con acople a Ultravioleta visible (HPLC-UV-Vis), entre otras, obteniendo datos más aproximados especialmente del 5-CQA (Bajko et al., 2015)

Desde la perspectiva de la producción y transformación de CGA en las plantas de café, se ha encontrado que está asociado a las reacciones del metabolismo celular tanto en su fase de cultivo como en la postcosecha, y relacionadas con factores bióticos y abióticos que influyen principalmente en la formación de estos ácidos durante la respiración (maduración/respiración de la planta y desarrollo del fruto) y el metabolismo secundario (activado como respuesta de defensa de la planta) (T. Baumann, 2005; Rivera, J. A., & Díaz, 2009).

Con el empleo de cambios en la temperatura y humedad que disminuyan la velocidad metabólica para prolongar el estado de maduración de la semilla, que regulen la actividad de la microbiota natural, que influyan en la activación de enzimas de los metabolismos asociados, y considerando una fermentación en estado sólido, se busca consolidar información, a manera de marco conceptual, que permita determinar en posteriores estudios si existe un incremento o conservación de los ácidos clorogénicos, específicamente el 5-O-cafeoliquínico. A partir de la experimentación posterior propuesta a través de procesos tipo FES, se espera el desarrollo de nuevos productos y tazas que agreguen valor al café, por interacción de sus componentes, introduciéndolo en el segmento de cafés especiales, y que potencien tanto el grano y los subproductos como insumo, por su importancia biológica, en otras industrias como la cosmética, farmacéutica y alimentaria. Como parte de los aportes de esta investigación también se plantea la FES como alternativa en el proceso de beneficio del café, que permita disminuir la presión que ejerce en los ecosistemas cafeteros el consumo de agua utilizado en los métodos de beneficio en inmersión.

CAPITULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1. GENERALIDADES DEL CAFÉ ARÁBIGO

1.1.1. Especies y variedades de café en Colombia

El cafeto es una planta tropical denominada como arbusto, se encuentra clasificada entre la familia de las rubiáceas, de los que se desprende la especie “Arábica o Arábica” y “Robusta”. El café Arábica es de mayor valor en los mercados nacionales e internacionales que el café Robusta, porque el café Robusta presenta menos atributos en las propiedades del café en taza. Se denomina atributos en taza a las características tales como: fragancia, aroma, sabor, sabor residual, acidez, cuerpo, balance, dulzor.

La especie *Coffea arabica* es una especie autógama, es decir, se autopoliniza. Como características de las variedades del café Arábica se encuentran las de ser de porte pequeño, mediano y alto con una forma cónica compactada y semi-compacta, con una producción promedio anual, con un manejo adecuado, entre 4.5 a 6.5 kilogramos por planta año.

Las variedades de café Robusta, que aún no se encuentran cultivadas en Colombia, se caracterizan por su vigor y rusticidad, son resistentes a condiciones más precarias y presentan un sabor en taza menos agradable que el arábica; además su tamaño llega a ser tres ó cuatro veces mayor en sus hojas y ramas con respecto al Arábica, aunque curiosamente sus frutos son más pequeños, redondos y de escaso mucílago, aunque más numerosos en cada nudo de la rama. La productividad de las plantas de variedades Robusta varía entre siete y diez kilogramos por planta año.

Entre las variedades de café Arábica se pueden encontrar:

- Colombia y Castillo®: debido a la condición de autogamia, el método de mejoramiento para estas variedades consistió en cruzar dos plantas que se complementan en sus características agronómicas vigor y resistencia a la enfermedad denominada roya. Las variedades comerciales, Colombia y Castillo®, provienen del cruzamiento entre dos plantas (Caturra e Híbrido de Timor) y su selección por caracteres agronómicos en generaciones sucesivas. Dada su resistencia a la roya, el híbrido constituye la principal fuente de resistencia de la mayoría de variedades actuales de América, África y Asia (Cortina, Moncada, & Herrera, 2012).

Las variedades Castillo® Regionales son el resultado de una selección de componentes específicos (líneas), que tienen un comportamiento agronómico y productivo sobresaliente en determinadas zonas cafeteras con características similares de clima y suelo, también llamados Ecotopos. Como resultado de esta selección se conformaron siete mezclas de componentes, para igual número de zonas agroclimáticas diferentes. A cada mezcla o variedad regional, se le dio el nombre de la Estación Experimental donde fueron seleccionadas. Las variedades Castillo® Regionales disponibles actualmente son: Naranjal, Paraguaicito, Santa Bárbara, Pueblo Bello, El Rosario, La Trinidad y El Tambo (Cortina et al., 2012).

- Catuaí: ésta es la variedad que más productividad genera. Su origen viene de la mezcla de un cruce de Mundo Novo y Caturra, originaria de Brasil, de porte medio (2,25 m), sus ramas (mejor conocidas como Bandolas) forman un ángulo de 45 grados con el eje principal, sus entrenudos son cortos, las hojas terminales presentan un color verde tierno, son resistentes al viento y es una de las variedades arábicas de mayor producción. Adaptable a zonas bajas y medianas (Anacafé, 2013).
- Caturra: variedad originaria de Brasil, de una mutación de Bourbón, de porte bajo (1,80 m), sus ramas (Bandolas) forman un ángulo de 45 grados con el eje principal, sus hojas son de color verde tierno, la forma de las hojas son redondeadas y brillantes. De entrenudo corto, poco resistente al viento, hojas terminales de color bronce y verde, predominando las primeras y muy productivo. Adaptable a zonas bajas y medianas (Anacafé, 2013).

- Mundo Novo: originario de Brasil, es un cruce de Sumatra (Typica) y Bourbon; de porte alto (3,00 m), de ramas de 45 grados con el eje principal, de entrenudos cortos, poco resistente al viento, hojas terminales de color bronce y verde, predominante en las primeras, igualmente muy productivo. Adaptable a zonas altas (Anacafé, 2013).
- Bourbon: variedad de origen francés, de porte alto (3,00 m), de ramas con ángulos de 45 grados con el eje principal, entrenudos más cortos que el Typica, hojas color verde tierno y de forma más redondeada y brillantes que la Typica, de producción alta, poco resistente al viento. Adaptable a zonas altas (Anacafé, 2013).
- Pache: ésta variedad es originaria de Guatemala, su nacimiento fue gracias a la mutación de Typica, con porte bajo (1,80 m) ramas con ángulo de 60 grados con el eje principal, entrenudos cortos, hojas terminales de color bronce (café claro), resistente al viento, soporta bien los suelos arcillosos, y finalmente su producción es alta. Adaptable a zonas bajas y medianas (Anacafé, 2013).
- Typica o Arábigo o Criollo: originario de Etiopía, de porte alto (3,00 m), ramas de 60 grados de ángulo con el eje principal, entrenudos largos, hojas terminales de color bronce (café claro) angostas y de poco brillo, es poco resistente al viento y de productividad media – baja. Adaptable a diferentes zonas (Anacafé, 2013).
- Maragogipe: nació de la mutación del grano Typica o Criollo en el pueblo de Maragogipe en Brasil, de poca producción e irregular, muy sensible a las sequías, de porte bajo (0,80 a 1,25 m), de hojas lanceoladas y puntiagudas. Adaptable a zonas bajas (Anacafé, 2013).
- Geisha: el café Geisha de tipo arábica es un café originario de Etiopía al igual que las demás variedades de café. Al café Geisha se le denominó de esa forma por el lugar donde tuvo su origen y porque así le llaman a los habitantes de la localidad. La travesía que la semilla del tipo arábica Geisha tuvo que pasar fue de Etiopía a Kenia y más tarde a Tanzania. Posteriormente las llevaron a Costa Rica y para 1963 llegaron a Panamá.
- Pacamara: esta variedad es la creación del Instituto Salvadoreño para Investigaciones del Café en 1958, resultado de un cruce de las variedades Pacas y Maragogipe. El Pacas es una mutación natural que proviene de la variedad Bourbon, de acuerdo con una investigación realizada a los científicos de la Universidad de Florida. El árbol del Pacamara es mediano

con un follaje denso, entrenudos cortos y hojas largas, sus frutos son largos y con una pequeña protuberancia, y las semillas son largas y de forma ovalada, su follaje compacto que ayuda a soportar fuertes condiciones del clima como fuertes vientos, rayos de sol y escasez de agua (Karyan, 2016).

Entre las Robustas se encuentran:

- Robusta Tradicional y Romex Mejorada: éstas son de forma robusta, de gran vigor y rusticidad, su tamaño llega a ser tres a cuatro veces mayor que cualquiera de las arábicas; sus hojas y ramas son mayores que la variedad Typica pero no sus frutos, los cuales son más pequeños, redondos y con escaso mucílago, su productividad es en promedio de 7 a 10 kilogramos por planta (Anacafé, 2013).

1.2. COMPOSICIÓN DEL FRUTO DE CAFÉ

El fruto o cereza de café es de forma oval y un tamaño aproximado de 10 mm. El grano o semilla de café está en el interior de la cereza y cubierta por una delgada piel llamada película plateada o “silver skin”, un endocarpio llamado cascarilla o cisco, una capa adhesiva de pectina o mucílago, pulpa y un epicarpio o piel exterior, en este orden (Saenger, M., Hartge E.-U. J., Werther, Ogada T., 2001). La Figura 1 muestra la sección típica de un fruto o cereza de café.

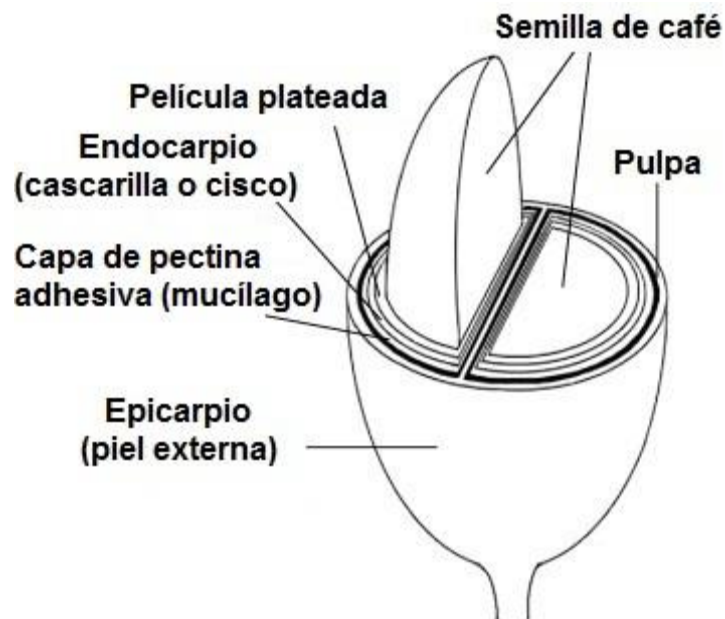


Figura 1. Sección de un fruto de café

Fuente: (Narita & Inouye, 2014).

A continuación se expone los componentes principales del café.

1.2.1 Composición bioquímica de la pulpa

Los elementos del fruto diferentes a la semilla de café son considerados como residuos del proceso. Aunque la naturaleza de los componentes de la pulpa y cascarilla es muy similar, la composición varía dependiendo del tipo de beneficio del café (si es seco o húmedo) y su rendimiento, la variedad del cultivo, madurez del fruto y el tipo de suelo (Elias, 1978). Colmenares, et al., (1998), encontraron diferencias significativas entre la pulpa de frutos amarillos, ricos en taninos (proantocianidinas) y la pulpa de frutos rojos de café y aislaron varias proantocianidinas a partir de la pulpa de café. Las proantocianidinas son polifenoles poliméricos, que inhiben la germinación de *Hemileia vastatrix* in vitro (hongo del orden Pucciniales que causa la roya en las hojas de café) (Colmenares, N.G. , Ramirez-Martinez, J.R. , Aldana, J.O. , Ramos-Nini, 1998; Colmenares, N.G. , Ramirez-Martinez, J.R., Aldana, J.O., Clifford, 1994; Pandey et al., 2000). Los niveles de

retención de agua en la pulpa varían entre 62 y 76 % (Díaz & Fernández, 2011). La Tabla 1 presenta la composición genérica de la pulpa de café.

Tabla 1. Composición bioquímica de la pulpa de café.

Compuesto bioquímico	%/MS
Azúcares reductores	12,4
Glucosa, sacarosa y fructosa (4,2%)	4,7
Azúcares no reductores	2,0
Sustancias pécticas	6,5
Taninos	2,6
Ácidos clorogénicos	2,6
Cafeína	1,3

Fuente: Tomado de Díaz, M y Fernández, M. (2011), citando a Bressani *et al* (1972)

La composición presentada en la tabla 1 muestra un contenido considerable de azúcares reductores (12,4 % MS). La función original de la pulpa es relativa a la evolución de las especies, que busca atraer a los animales para que a partir de su deglución y digestión puedan propagar la semilla. Otras funciones están asociadas a la protección de la semilla contra algunos insectos (e.g la Broca) y microorganismos patógenos (e.g la Roya) por el efecto de los taninos (proantocianidinas en frutos amarillos), clorogénicos y cafeína, presentes en su composición bioquímica. El contenido de agua y azúcares está asociado a la conservación de la semilla porque proporcionan el alimento o fuente de energía para las funciones metabólicas del embrión que se encuentra alojado en el pericarpio o semilla del café.

El contenido de agua además de la composición en azúcares reductores son factores clave en los procesos de fermentación, debido a que permiten el crecimiento de microorganismos propios a estos sistemas.

1.2.2 Composición bioquímica del mucílago

El mucílago de café está compuesto esencialmente por agua, azúcares y sustancias pécticas (Cabrera, S. DE; Calzada, J.F.; GIL, L.A.; Arriola, 1987; Elias, 1978; Martínez N., 1959; Menchu E., J.F.; Rolz, 1973; Rolz, C.; Menchu E., J.F.; Espinosa, R.; García P., 1971). Las cantidades de mucílago en los frutos y granos de café varían con la variedad, madurez del fruto y condiciones de cultivo; es así como los frutos maduros y frescos contienen en promedio 10,4% (entre 1,1% y 27,3%) en peso de mucílago y un 18% en los granos despulpados de los frutos con mayor contenido (Puerta & Ríos, 2011).

El mucílago contiene principalmente levaduras de los géneros *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Candida* y *Rhodotorula*, así como bacterias lácticas *Lactobacillus* y *Streptococcus*, y otras bacterias y hongos (Arias, M.; Ruiz C., 2001; Avallone, S.; Guyot, B.; Brillouet, J.M.; Olguin P., E.; Guiraud, 2001; J. Pee, W. Van; Castelein, 1971; J. M. Pee, W. Van; Castelein, 1972; Puerta, Marín, & Osorio, 1996). Los niveles de retención de agua varían entre 85 y 90% (Díaz & Fernández, 2011). La Tabla 2 presenta la composición genérica del mucílago de café.

Tabla 2. Composición bioquímica del mucílago.

Componente	%/MS ^{a,b}	%/MH ^b	%/MS ^{a,c}	%/MH ^c	%/MS ^{d,e}	%/MH ^{d,e}
Humedad	-	-	-	85,0	-	88,6
Sustancias pécticas	33,0	5,0	17,0	2,6	11,4	1,3
Glúcidos	50,0	7,5	47,0	7,0	-	6,8
Celulosa	17,0	2,5	-	-	6,4	0,7
Ácidos orgánicos	-	-	0,5	0,08	-	-
Lípidos	-	-	-	-	1,1	0,12
Nitrógeno	-	-	-	0,93	-	0,93
Otros	-	-	1,0	0,15	-	1,5

Fuente: Tomado de Díaz, M y Fernández, M. (2011), citando los autores: a. Valores obtenidos considerando una tasa de humedad del mucílago de 85%; b. Picado (1934); c. Menchú y Rolz

(1973), d. Valores reportados considerando la humedad 88,6% base húmeda Puerta y Ríos (2011).

El contenido de los glúcidos o azúcares (carbohidratos) en el mucílago, hace parte de la reserva de energía para el embrión localizado en el grano. La propiedad funcional del mucílago (sustancias pécticas) es la de absorber agua y formar gel, para la reserva del líquido destinado la supervivencia del embrión. El mucílago es en mayor proporción un gel formado por sustancias pécticas (protopectinas, ácidos pécticos, pectatos, ácidos pectínicos, pectinatos y pectinas) y agua, el cual es removido durante la fermentación sumergida empleada comúnmente en las zonas cafeteras. Existen a su vez los microorganismos que degradan estas pectinas por efecto de las pectinasas (protopectinasas, poligalacturonasas, pectinesterasas y pectinaliasas). En el mucílago, se han encontrado pectinasas producidas por bacterias *Pseudomonas* y *Xanthomonas campestris*; y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* que producen poligalacturonasas. Como producto de la degradación de estas sustancias pécticas se generan ácido galacturónico, ramanosa, galactosa, arabinosa, xilosa, fucosa, apiosa, entre otros compuestos (Puerta, 2012a), que son sustancias de reserva para el desarrollo del embrión durante la germinación (Bolivar, 2009; Mazzafera & Purcino, 2004).

1.2.3 Composición fisicoquímica de la cascarilla de café

Después de la fermentación, los granos limpios se secan hasta un contenido de humedad entre 10 a 12% y el endocarpio del fruto pasa a llamarse cascarilla, cisco de café. La cascarilla o también llamada pergamino de café, es la capa amarillenta que cubre el grano verde de café. Este componente del fruto es removido mediante la acción mecánica de la trilla y los residuos sólidos resultantes (pergamino y piel plateada) se denominan colectivamente cáscaras de pergamino (Saenger, Hartge, Werther, Ogada, & Siagi, 2001). La cascarilla de café es un material lignocelulósico con un espesor alrededor de 150 μm y 6,1 % de agua en base húmeda (Mendes, 1942). Se puede obtener en promedio una tonelada de pergamino del proceso de beneficio seco (se

incluye desde la capa externa o epicarpio, hasta el pergamino y película plateada) por cada tonelada de café limpia producida, mientras que, para el procesamiento en húmedo, se generarán un promedio de 0,28 toneladas de cascarilla de pergamino, dos toneladas de pulpa y más de 22 toneladas de aguas residuales (Adams & Dougan, 1987; Rodríguez-Valencia, Zambrano-Franco, & Ramírez-Gómez, 2013; Saenger et al., 2001). La Tabla 3 muestra la composición fisicoquímica de la cascarilla de café.

Tabla 3. Composición físico-química de la cascarilla de café.

Composición físico-química de la cascarilla de café	
Parámetros	Cascarilla de café
Humedad (%)	13,0 ± 0,6
pH (1:10)	5,32 ± 0,05
EC (dS m ⁻¹)	2,24 ± 0,15
C orgánico (%)	54,5 ± 0,4
Total N (%)	1,83 ± 0,03
C a N ratio	29,8 ± 0,7

Fuente: Tomado de (Shemekite et al., 2014). EC: Conductividad eléctrica; C: Carbono; N: Nitrógeno.

El alto contenido de carbono en la composición bioquímica del endocarpio o pergamino de café se debe a que su componente principal es la lignocelulosa. Se ha relacionado su función biológica como de protección de la semilla de café contra las enzimas digestivas del intestino de animales frugívoros (Urbaneja, Ferrer, Paez, Arenas, & Colina, 1996). Durante un proceso de fermentación también puede actuar como barrera para el intercambio de líquidos y gases al interior de la semilla. Debido a que la semilla de café es higroscópica, la función de barrera del pergamino, después del secado del café, permite una mayor duración de la semilla cuando se almacena envuelta en este, y contribuye en retardar o evitar los procesos de blanqueamiento que dan como resultado sabores a

reposo, tierra, polvo característicos de un proceso inadecuado de beneficio y almacenamiento del café.

1.2.4 Composición bioquímica de la película plateada de café

En general, se obtiene más película plateada de granos de café verde procesados por el método en seco que por el método húmedo. El exterior de la piel, pulpa, el mucílago y el pergamino se eliminan por completo de los granos de café verde en estos dos procesos. Sin embargo, una parte de película permanece con los granos de café verde después de la trilla. Los granos de café verde con película plateada adjunta se exportan, los granos se tuestan y la película plateada pasa a ser el único subproducto obtenido en el proceso de torrefacción en los países consumidores. (Narita & Inouye, 2014). Recientemente se ha sugerido la utilización de la película plateada como sustancia bioactiva por sus propiedades de inhibición de la hyaluronidasa, actividad prebiótica y actividad antioxidante. Se continúa la investigación sobre sus propiedades y sus posibles aplicaciones como alimento animal, fertilizante, material de fermentación microbiana para biorefinería o como material energético para combustión (Narita & Inouye, 2014). La Tabla 4 muestra la composición de la película plateada o “silver skin” del café.

Tabla 4. Composición de la película plateada o “silver skin” de café.

Composición de la Película plateada de café (g por 100 g).					
Componente	Película plateada				
	–	De Arábica	De Canephora	De Arábica	–
Proteínas	18.6 ± 0.6	18.6 ± 0.3	17.9–19.0	18.4–19.0	16.2
Grasas	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.5	2.50–2.92	1.56–3.28	N. A.
Carbohidratos	62.1 ± 1.6	65.1 ± 1.2	47.0–80.5	34.6–52.0	N. A.
Azúcares reductores	0.2 ± 0.01	N. A.	N. D. ^b	N. D.	N. A.
Humedad	7.3 ± 0.4	7.1 ± 0.2	N. A.	N. A.	4.7

Composición de la Película plateada de café (g por 100 g).

Componente	Película plateada				
	–	De Arábica	De Canephora	De Arábica	–
Minerales (cenizas)	7.0 ± 0.2	7.0 ± 0.2	N. A.	N. A.	N. A.
Cafeína	N. A. ^a	N. A.	0.81–1.37	0.83–1.16	N. A.
Ocratoxina A	< 4 ppb	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.
Fibra dietaria total	62.4 ± 0.6	62.4 ± 0.5	53.4–69.2	56.4–65.9	N. A.
Fibra dietaria insoluble	53.7 ± 0.2	53.7 ± 0.4	48.5–64.2	50.1–60.7	N. A.
Fibra dietaria soluble	8.8 ± 0.4	8.8 ± 0.6	4.9–9.3	5.0–6.3	N. A.
Glucano	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	17.8
Xilano	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	4.7
Arabinosa	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	2.0
Galatosa	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	3.8
Manosa	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	2.6
Lignina	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	30.2
Grupos Acetil	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	3.0
Extractivos	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	15.0
Referencias	A	B	C	C	D

Fuente: tomado de Narita, Y. y Inouye, K. (2014); referenciando a Borrelli et al. (2004) and Napolitano et al. (2006) (A), Pourfarzad et al. (2013)(B), Napolitano et al. (2007) (C), and Mussatto et al. (2012) (D).

Debido a que la película plateada es un remanente del perisperma (Mendes, 1941). Luego de la fecundación y completada la embriogénesis, el cuerpo del óvulo, formado por la nucela y el saco

embrionario, es ocupado por el embrión y el tejido que almacena las sustancias de reserva (endosperma, perisperma o prótalo). Durante el desarrollo del grano o semilla de café, el tejido nutricio es el perisperma. Una vez madura la semilla, el tejido nucelar o perisperma colapsa y tapizan el endosperma, formando la película plateada del café.

La fibra dietaria presente en la película plateada, consiste en hemicelulosa, celulosa, lignina, oligosacáridos, polisacáridos, pectinas, gomas y ceras. Dentro del contenido de carbohidratos, también están presentes los monosacáridos que se encuentran en menores cantidades. Las proteínas, grasas (fuente de energía para la germinación) y cenizas (minerales) presentes en la película plateada (remanente de perisperma) hacen parte de los componentes de reserva para el embrión durante el crecimiento del endosperma (Narita & Inouye, 2014) y una vez el fruto es cosechado, continúan siendo fuente nutricional y de reserva para este. Se ha sugerido como sustrato en fermentaciones en estado sólido por su composición en fibra y su relación con la actividad prebiótica reportada (Narita & Inouye, 2014). Se presume su utilidad durante los procesos de fermentación principalmente en relación a la actividad metabólica del embrión durante la fermentación natural. No se encuentran reportes sobre la incidencia de este componente del fruto de café en los procesos de fermentación de cafés despulpados afectados por la broca.

1.2.5 Composición bioquímica del grano de café

La composición química del grano de café depende de la especie, la variedad, el estado de desarrollo del fruto y el ambiente o condiciones de producción, entre otros factores. Las dos especies de café, Robusta y Arabica, presentan diferencias importantes en los contenidos de cafeína, trigonelina, lípidos, ácidos clorogénicos (CGA's), oligosacáridos y polisacáridos. La mayoría de estos compuestos tienen relación con las características organolépticas de la bebida (Fedecafé, 2010).

Además de las diferencias inherentes a las especies de café, las variedades guardan relación con la región de origen y con los procesos productivos utilizados (Fedecafé, 2010).

En el caso de la denominación Café de Colombia, se trata de un café que tiene un uso seleccionado y adaptado de variedades exclusivamente de la especie Arábica (es decir, tetraploides de 44 cromosomas), que crece en altas montañas de los Andes colombianos en altura entre los 1.200 y 1.800 metros sobre el nivel del mar, temperaturas templadas que oscilan entre los 17 y los 23 grados centígrados y con precipitaciones cercanas a los 2.000 milímetros anuales, distribuidas a lo largo del año. Es además un café artesanal, procesado a través del beneficio húmedo (Fedecafé, 2010). Los niveles de retención de agua de los granos de café deben ser de entre 10 y 12% para ser comercializados y evitar daños posteriores en proceso después del secado.

En la Tabla 5 se presenta la composición general de las semillas en *C. arabica* verde.

Tabla 5. Composición química de las semillas de *C. arabica* verde.

Componente	Concentración ¹ (g / 100g)
Polisacáridos	34 - 44
Sucrosa	6,0 - 9,0
Azúcares reductores	0,1
Lignina	3,0
Pectina	3,0
Proteína/Péptidos	10,0 - 11,0
Amino ácidos libres	0,5
Cafeína	0,9 - 1,3
Trigonelina	0,6 - 2,0
Aceites de café (triglicéridos con insaponificables, esteroides/tocoferoles)	15,0 - 17,0
Diterpenos (libres y esterificados)	0,5 - 1,2
Minerales	3,0 - 4,2
Ácidos clorogénicos	4,1 - 7,9

Componente	Concentración ¹ (g / 100g)
Ácidos alifáticos	1,0
Ácido quínico	0,4

Fuente: (Farah, 2012), Contenido de acuerdo al cultivo, prácticas agrícolas, clima, composición del suelo, y métodos de análisis. Tomado de Farah, 2012, citando a Clarke and Macrae (1985), Clifford (2000), Trugo and Macrae (1984), Trugo (2003), Clarke (2003), Kölling-Speer and Speer (2005), Speer and Kölling-Speer (2006), Farah et al. (2006), Farah and Donangelo (2006), Holscher et al. (1990), and Fischer et al. (2001).

El grano de café verde está compuesto por el endosperma y el embrión, y representa el 38,9 % y 55,4 % del fruto en base seca y base húmeda, respectivamente (Roa, G., et al., 1999). Las células del endosperma se caracterizan por paredes celulares delgadas que comienzan a espesar entre los 130-190 días después de la floración, debido a la exposición de polisacáridos complejos como arabinogalactanos y galactomananos. En la etapa madura (alrededor de los 230 días después de la floración), el endosperma es dividido en endosperma externo duro (con células en forma poligonal), y un endosperma interno suave con células rectangulares, que rodea al embrión. Las paredes de ambos tipos de células están conectadas por plasmodesmas, que permiten el intercambio de solutos componentes entre células (Dentan, E., 1985). El endosperma es un tejido duro debido a la alta concentración de polisacáridos en las paredes celulares (Wolf from, ML., et al., 1961). El principal polisacárido es un β - (1 \rightarrow 4) -D - manano, el cual es pobremente soluble debido a su bajo grado de ramificación de galactosa. Como un tejido de almacenamiento, el endosperma maduro acumula proteínas las cuales representan alrededor de la mitad de las proteínas solubles (Redgwell, LJ., et al., 2003).

El embrión es el esbozo de la futura planta contenido en la semilla. Está formado por una raicilla o radícula, un tallo o hipocotilo y una especie de pequeñas hojas llamadas cotiledones. Tiene entre 3 y 4 mm de longitud y está localizado cerca de la superficie convexa del grano. El embrión contiene pocas reservas almacenadas y depende del endosperma para la nutrición hasta que la

plántula se vuelva autótrofa (Eira et al., 2006). La Figura 2 , presenta el corte transversal y longitudinal de la semilla para una mejor observación del embrión del café (Siermann, 2016).

a)

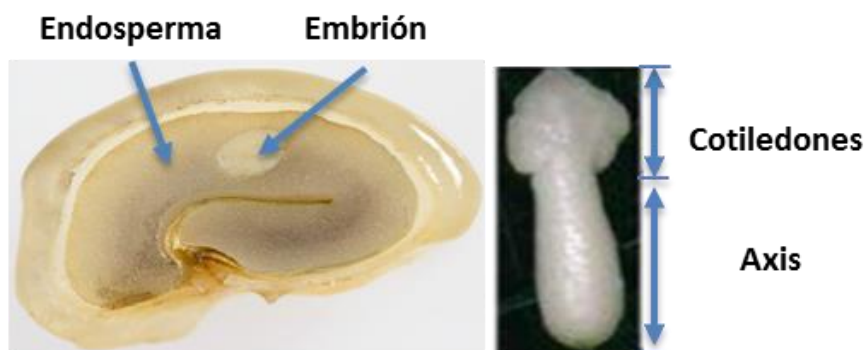


Figura 2. Localización del embrión en el grano de café y forma del embrión. Corte transversal de semilla de café cubierta con mucílago y vista del embrión completo.

Fuente: a) Eira , et al., (2006); b) Siermann L., (2016).

El tejido de endosperma suave permite una textura esponjosa que hace que la semilla sea higroscópica cuando está seca y la parte de tejido duro que retenga los gases generados en la torrefacción de la semilla. Durante los procesos de fermentación, el endospermo o semilla del café será la fuente de alimento y el depósito de compuestos para las reacciones metabólicas secundarias activadas por el embrión. Parte de los compuestos generados por los microorganismos en su metabolismo también migran al grano posiblemente a través de plasmodesmas por las que circulan los nutrientes. Los productos metabólicos que migran o circulan a través del endosperma pueden dar lugar a características positivas o negativas en la bebida dadas las condiciones de almacenamiento del grano.

1.3. COMPUESTOS VOLÁTILES DE INTERÉS BIOLÓGICO EN EL CAFÉ VERDE

En el caso de las semillas de café verde, se han identificado aproximadamente 100 compuestos volátiles diferentes. Esta fracción es mucho menor que en café tostado aunque le da al café verde un aroma débil pero característico (Flament, I., Gautschi, F., Winter, M., Willhalm, B., Stoll, 1968). Las clases más abundantes de los compuestos volátiles son alcoholes, ésteres, hidrocarburos y aldehídos. También se han identificado acetonas, pirazinas, furanos; y minerales como el azufre (Flament, I., Gautschi, F., Winter, M., Willhalm, B., Stoll, 1968; Toci & Farah, 2008).

La etapa de maduración de los frutos de café, es importante para la composición volátil del café verde. Se encontró que al igual que con las semillas, la composición volátil de frutos de café está dominada por altos niveles de alcoholes, principalmente etanol, en todas las etapas de madurez. Los frutos de café sobremaduros, los cuales producen semillas defectuosas de color negro, mostraron altas concentraciones de compuestos volátiles dominados por ésteres, seguido de alcoholes, cetonas, y aldehídos, con niveles muy bajos de monoterpenos (Ortiz, Veja, & Posada, 2004). A partir de este hallazgo se identificaron marcadores potenciales para las semillas de café verde defectuosas generadas a partir de las frutas en diferentes etapas de maduración (Toci & Farah, 2008).

1.4. COMPUESTOS NO VOLÁTILES DE INTERÉS BIOLÓGICO EN EL CAFÉ VERDE

Como se ha mostrado anteriormente, el fruto de café está compuesto por múltiples capas y cada una de ellas tiene una composición amplia de elementos orgánicos e inorgánicos que en conjunto determinan una matriz diversa y compleja.

Dentro de este grupo de compuestos los de mayor interés dentro del café verde, para este trabajo son los ácidos clorogénicos; sin embargo, se plantea una breve descripción de los demás compuestos no volátiles.

1.4.1 Fibra dietaria soluble

Dentro de la fibra dietaria soluble se encuentran los polisacáridos de alto peso molecular que incrementan la viscosidad en la bebida de café (Nunes & Coimbra, 2001). Los tipos más importantes de fibra soluble en el café son los Galactomananos y los Arabinogalactanos tipo II. Los arabinogalactanos tipo II son altamente ramificados y unidos covalentemente a proteínas en las cuales el 10% de las cadenas de aminoácidos son residuos de 4-hidroxiprolina (Toci & Farah, 2008).

Los Galactomananos y los Arabinogalactanos tipo II no son digeridos por los humanos, sin embargo sirven como substratos para la fermentación de colonias microbióticas benéficas.

1.4.2 Agua

Después del lavado, el grano de café tiene un contenido de humedad cercano al 53% (b.h). Como producto del beneficio y secado, el contenido de humedad se reduce a un rango entre 10 -12% (Puerta, 1999). Por encima de este nivel, la humedad no es deseable tanto para relación aroma / sabor de calidad y efectos sobre la salud, ya que aumenta la actividad de agua y por lo tanto la probabilidad de que el crecimiento microbiano. Por otro lado, la baja humedad produce grietas en las semillas y disminuye su viabilidad para germinar (Farah, 2012).

1.4.3 Carbohidratos

Los carbohidratos son el principal constituyente del café llegando a ser más del 50% en peso de materia seca. Los poli-, oligo-, di- y monosacáridos pueden ser divididos en reductores y no reductores (Trugo, 1985). Los polisacáridos (solubles e insolubles) pueden ser cerca del 44% de

la materia seca en el café Arábica. La sucrosa es el más importante para el sabor y la calidad, llegando hasta el 9% de la materia seca en *C. arabica* y la mitad en *C. canephora*. En café verde, se han encontrado pequeñas cantidades de carbohidratos simples como fructosa, glucosa, manosa, arabinosa y ramanosa; oligosacáridos como rafinosa y estaquiosa (Flament, I., Gautschi, F., Winter, M., Willhalm, B., Stoll, 1968; Kölling-Speer & Speer, 2005). Los carbohidratos son precursores de la reacción de Maillard y la caramelización, lo que es importante para el desarrollo del color y aroma. Los carbohidratos también contribuyen en la acidez de la bebida después de la torrefacción. El alto contenido de sucrosa es una de las razones del aroma superior y el sabor del café Arábica (Farah, 2012).

1.4.4 Proteínas, péptidos y aminoácidos libres.

Estos componentes son esenciales para la reacción de Maillard. Sirven como precursores en la formación de compuestos volátiles como son los furanos, piridinas, piroles, aldehídos, y melanoidinas que son responsables del color y parte de la actividad antioxidante en el café tostado. El total de compuestos nitrogenados (sin cafeína y trigonelina) está entre el 9-16% de la composición química del café verde. Sin embargo el café no se cuenta como fuente de proteína porque carece de aminoácidos esenciales (Farah, 2012).

1.4.5 Minerales

Los principales minerales encontrados en el café son el potasio, el azufre, el magnesio, el fósforo y el calcio. El potasio constituye aproximadamente el 40% del mineral contenido en café molido (alrededor de 1-2 g/100g de café verde). El fósforo es otro mineral que se encuentra cercano al 4% de la composición de minerales, y junto al azufre (7,9%), el calcio y el magnesio (3,9%),

conforman entre el 60 - 63% del peso de las cenizas del café (Puerta, 2011). Se han encontrado aproximadamente 30 minerales diferentes entre los que se encuentran también el sodio (Antonio et al., 2011; Clarke, 2003) . De estos elementos solo el contenido de magnesio varía considerablemente entre especies (1–3 mg/100 g para *C. canephora* y 2.5–6 mg/100 g para *C. arabica*) (Clarke, 2003). El perfil de trazas de minerales en el café varía de acuerdo a la composición del suelo, lo cual sugiere que se puede diferenciar los cafés según el perfil mineral de los diferentes tipos de suelo en los que crezca (Costa et al., 2010).

1.4.6 Lípidos

Los lípidos son los mayores componentes en el café y varían considerablemente entre las especies *C. arabica* y *C. canephora*. El total de contenido de lípidos en semillas de Arábicas (~14g/100g materia seca) es dos veces la de Robustas (Stephanucci, P., Hamel, & Kirk-Othmer, 1979). La fracción lipídica del café está compuesta principalmente por triacilgliceroles. (~75%), ácidos grasos libres (1%), esteroides (2,2% no esterificados y 3,2% esterificados con ácidos grasos), y tocoferoles (0,05%), los cuales son aceites vegetales comestibles. Esta fracción también contiene diterpenos en porciones hasta el 20% del total de la fracción lipídica (Folstar, 1985; Kölling-Speer & Speer, 2005; Trugo & R., 1984). Los ácidos grasos en café se encuentran en formas combinadas, la mayoría esterificados con glicerol en la fracción de triacilglicerol, 20% esterificados con diterpenos y una pequeña porción en esteroles. La mayoría de ácidos grasos en café son insaturados (Farah, 2012).

Los ácidos grasos no son solo importantes para la salud, su integridad es importante para mantener la frescura y el evitar los daños causados por la hidrólisis y oxidación de los triacilgliceroles (Toci, Neto, Torres, Calado, & Farah, 2008).

Aunque la mayoría de lípidos están localizados en el endospermo de la semilla del café verde, la cera de café se encuentra en la capa exterior. Esta fracción representa el 0,2% - 0,3% del peso de la semilla del café. Los principales componentes de cera de café son los ácidos-5-hidroxytryptamida carboxílicos, que son amidas de serotoninas y ácidos grasos, y de diferentes longitudes de cadena (Speer, K. & Kölling-Speer, 2006).

1.4.7 Cafeína

La cafeína es un alcaloide estable al calor, es una metilxantina con características amargas; sin embargo, es responsable de no más de 10% de la amargura percibido de la bebida de café. Su concentración en *C. canephora* es aproximadamente el doble de la encontrada en *C. arabica* (Flament, I., Gautschi, F., Winter, M., Willhalm, B., Stoll, 1968).

La cafeína estimula el sistema nervioso central como un antagonista del receptor de adenosina. Aunque la cafeína es la sustancia psicoactiva más consumida y estudiada en la historia, sus efectos sobre la salud son objeto de controversia (Shlonsky, Klatsky, & Armstrong, 2003). El elevado consumo de cafeína tuvo efectos negativos sobre la tolerancia a la glucosa, la utilización de glucosa, y la sensibilidad a la insulina del tipo 2, en ratas delgadas y obesas diabéticas y seres humanos, pero otros compuestos presentes en el café puede contrarrestar este efecto (Shearer, Sellars, Farah, Graham, & Wasserman, 2007).

Los metabolitos de cafeína, especialmente 1-metilxantinas y 1-metilurato del café regular, mostraron que la actividad antioxidante *in vitro*, y la capacidad de hierro-reducción *in vivo*, es mayor que la de café descafeinado (C. Lee, 2000). El efecto antibacteriano de café regular contra microorganismos cariogénicos también fue mayor que la de café descafeinado (Antonio et al., 2010).

1.4.8 Trigonelina

La trigonelina es un alcaloide biológicamente derivado de la metilación enzimática del ácido nicotínico. Contribuye a la amargura de la cerveza y es un precursor para la formación de diferentes clases de compuestos volátiles durante el tueste como pirroles y piridinas, algunos de los cuales puede conferir un "sabor desagradable." (Flament, I., Gautschi, F., Winter, M., Willhalm, B., Stoll, 1968). La cantidad de trigonelina en *C. canephora* es aproximadamente dos tercios que se encuentra en *C. arabica*.

Con respecto a la bioactividad potencial, la trigonelina ha demostrado ser inhibidora de la invasividad de las células cancerosas *in vitro* (Hirakawa, Okauchi, Miura, & Yagasaki, 2005). Además, este compuesto ha sido capaz de regenerar las dendritas y axones en animales, lo que sugiere que puede mejorar la memoria (Tohda, Kuboyama, & Komatsu, 2005). También se ha considerado como un nuevo fitoestrógeno (Allred, Yackley, Vanamala, & Allred, 2009). La desmetilación de la trigonelina durante el tostado del café produce ácido nicotínico, una vitamina del complejo B también conocida como niacina (Trugo, 2003).

1.4.9 Cafestol y Kahweol

Son alcoholes diterpenos pentacíclicos basados en el esqueleto kaurano. Las formas metiladas de Cafestol y Kahweol se han identificado en las semillas *C. Robusta* (Kölling-Speer & Speer, 2005). Estos compuestos bioactivos y sus derivados, que son principalmente sales o ésteres de ácidos grasos saturados (predominante) y ácidos grasos insaturados; representan aproximadamente el 20% de la fracción lipídica de café cadena (Cavin et al., 2002; Speer, K. & Kölling-Speer, 2006; Wattenberg, 1983). El Cafestol es el componente principal de la fracción insaponificable de aceite de café, que representa aproximadamente el 0,2% -0,6% del peso del café. Kahweol es más sensible al calor, oxígeno, luz, y ácidos y por lo tanto es menos abundante (Flament, I., Gautschi, F., Winter, M., Willhalm, B., Stoll, 1968). Niveles más altos de diterpenos se encuentran en *C. arabica* que en *C. canephora*. Los diterpenos del café han exhibido propiedades anticancerígenas y hepatoprotectoras *in vitro* (K. J. Lee, Choi, & Jeong, 2007; Speer, K. & Kölling-Speer, 2006; Wattenberg, 1983) Por otra parte, el alto consumo de estos compuestos se ha asociado con los niveles de homocisteína y lipoproteína de baja densidad elevada en el plasma humano, que pueden aumentar indirectamente el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Olthof, Hollman, Zock, & Katan, 2001). Cantidades considerables de estos compuestos están presentes principalmente en el café sin filtrar, ya que son poco solubles en agua y por lo tanto son atrapados por los filtros de papel (Farah, 2012).

1.4.10 Ácidos alifáticos

Después de los clorogénicos, los ácidos más abundantes del café verde son los carboxílicos alifáticos. Los granos de café verde contienen ácidos no volátiles incluyendo el cítrico (0.5%), oxálico (0.2%), málico y tartárico (0.4%)(Clarke & Macrae, 1985; M. N. Clifford, 1975; Puerta, 2011). En la tostión se forman aproximadamente 34 ácidos alifáticos los cuales comprenden 15 ácidos volátiles monocarboxílicos saturados mientras el resto son no volátiles. Estos últimos incluyen ácidos monocarboxílicos saturados como el glicólico, láctico y pirúvico; ácidos saturados dicarboxílicos como el oxálico, malónico, succínico, málico, tartárico, glutárico; ácidos dicarboxílicos insaturados como el fumárico y maleico, citacrónico, mesaconico e itanoico; el ácido tricarboxílico insaturado, aconítico y el ácido saturado cítrico (Clarke & Macrae, 1985). El ácido fumárico y 2-furónico son producidos probablemente del ácido málico y carbohidratos respectivamente, y el ácido citracónico, itaconico y mesacónico son derivados probablemente del ácido cítrico por deshidratación (M. N. Clifford, 1975).

Los ácidos orgánicos encontrados en el café o producidos a través de su fermentación son los principales responsables de la calidad en taza del café. El sabor y aroma del café están compuestos por un balance y reacción de cientos de diferentes compuestos químicos que pueden ser (Díaz & Fernández, 2011; Rivera, 2013):

- Sintetizados por la planta, en lo que influye variables como la genética, la altitud en la que se encuentra el cultivo, las labores culturales, luminosidad y humedad relativa del ambiente.
- De origen mineral, dado por las características de suelo y minerales adicionados a este.
- Químicamente transformados en el beneficiado y tostado del café, a través de la fermentación y la conversión por calor en combinación con los azúcares disponibles en el grano.

1.4.11 Antioxidantes y Ácidos clorogénicos

Son compuestos fenólicos predominantes y unos de los más fuertes antioxidantes producidos en los tejidos de las plantas de café y de muchas otras especies. Estos compuestos fenólicos (fenilpropanoides) son producidos por las plantas para protegerse de la tensión oxidativa y las infecciones fungosas o bacterianas.

Los antioxidantes principales del café son los ácidos clorogénicos (CGA) especialmente los ácidos cafeoilquínicos (ácido 5-cafeoilquinico como principal componente del café verde), que han mostrado un efecto reductor de hipotensión en ratas (Suzuki et al., 2002), la reducción de la grasa visceral y el peso en el cuerpo (Igho et al., 2011; Shimoda et al., 2006), y según estudios recientes, muestran un rol protector en las neuronas, lo cual indicaría un efecto preventivo de las enfermedades neurodegenerativas (Mikami & Yamazawa, 2015), entre otros efectos positivos en el organismo humano (Igho et al., 2011; Shimoda et al., 2006). Otros compuestos bioactivos con capacidad antioxidante presentes en el café son la cafeína, teofilina y teobromina, tocoferoles, cafestol, kahweol y trigonelina (Jeszka-Skowron, Sentkowska, Pyrzyńska, & De Peña, 2016; Jeszka-Skowron, Zgoła-Grześkowiak, Skowiak, & Grześkowiak, 2015; Kuhnert et al., 2011; Perrone, Farah, Donangelo, de Paulis, & Martin, 2008).

Se ha reportado que la capacidad antioxidante del extracto de café verde de Arábigas está asociada a los niveles de calcio (Stelmach, Pohl, & Szymczycha-Madeja, 2015), y de otras trazas de minerales como cobre, manganeso y selenio, que desempeñan un papel importante en el metabolismo oxidativo, involucradas en los procesos redox, y que son esenciales para muchas vías metabólicas, así como para la defensa celular contra el estrés oxidativo (Brigelius-Flohé, 2006).

Los ácidos clorogénicos se encuentran principalmente en los granos de café como mono-, di-, tri-, tetra ésteres de uno o más ácidos cinámicos y quínicos; algunas veces con un ácido alifático reemplazando un residuo de ácido cinámico (Bajko et al., 2015). Los granos de café verde son los más ricos en estos compuestos (70 tipos diferentes han sido reconocidos) (Kuhnert, N., Karaklose, H., & Jaiswal, 2012) y se ha asociado la acumulación de estos con diferentes estados después de la floración y formación de la semilla, por efecto de la expresión de enzimas del metabolismo del fenilpropanoide (Cheng, Furtado, Smyth, & Henry, 2016). Cada ácido clorogénico presenta

diferentes atributos de aroma y sabor. Se presentan en grupos de isómeros, entre los cuales están tres del ácido quínico: los mono cafeoilquínicos (incluido el 5-CQA), los di-cafeoilquínicos (3di-CQA) y los feruloilquínicos (FQA), que representan aproximadamente el 67%, 20% y 13% del total de CGA en Robustas y el 80%, 15% y 5% CGA en Arábigas (Farah, Monteiro, Donangelo, & Lafay, 2008; Ky et al., 2001). Aunque el contenido de CGA en Arábigas es menor que en Robustas (4.0–8.4% y 7.0-14.4% respectivamente) (Bicho et al., 2013; Upadhyay & Mohan Rao, 2013), el contenido de los di-CQA es menor (0.7-1.0% Arábigas y 1.4-2.5% Robustas) (M. Clifford, 1997) y el contenido de azúcares es mayor en las Arábigas; esto hace que la interacción de todos los componentes, genere unas mejores características organolépticas en la bebida (Cheng et al., 2016).

Los CQA y los di-CQA se descomponen por hidrólisis durante el tueste en la primera y segunda crepitación respectivamente, disminuyendo lentamente el sabor amargo-metálico que generan y aportando cuerpo a la bebida (Rivera, J. A., & Díaz, 2009). En las variedades Arábigas se llegan a descomponer entre una tosti3n clara hasta una tosti3n fuerte entre 60.9% and 96.5% de los CGA (Trugo & R., 1984). Sin embargo, aquellos de la familia de los di-CQA permanecen relativamente estables y son los responsables de impartir sabores amargos y sensaciones aromáticas metálicas. Se encuentran altos niveles de ácidos di-CQA en granos de café inmaduros y muertos (negros), y son la fuente primaria de gustos amargos en los defectos (Cheng et al., 2016).

El principal CGA presente en Arabicas es el is3mero del ácido quínico, 5-O-cafeoilquinico (5-CQA) (Bajko et al., 2015). Este CQA se descompone por hidrólisis en la tosti3n en los ácidos quínico y caféico (Rivera, J. A., & Díaz, 2009), a los cuales se ha atribuido capacidad antioxidante y se han realizado numerosos estudios del potencial benéfico en los humanos (Baeza et al., 2014; Erk et al., 2012; Sato et al., 2011; Thom, 2007; Watanabe et al., 2006).

Debido a que sólo unos pocos compuestos de ácido clorogénico están disponibles o se sintetizan en laboratorios comercialmente, los estudios sobre las propiedades biológicas de los ácidos feruloilquinico y coumaroilquinico son escasos (Farah, 2012). En la Figura 3 se presenta la estructura del principal is3mero encontrado en el café y en la Tabla 6 las características fisicoquímicas del is3mero.

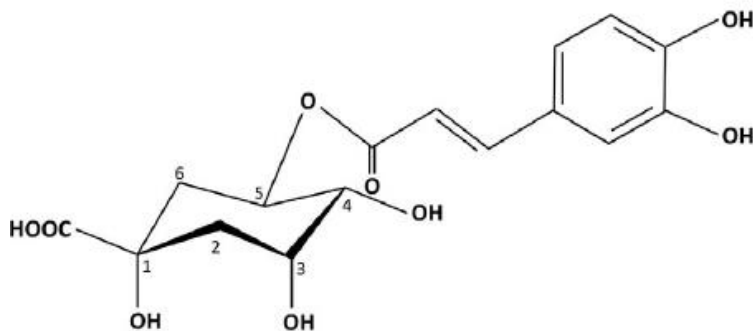


Figura 3. Estructura del isómero 5-O cafeoil-quinico

Fuente: Bajko, E., et al., 2016

Tabla 6. Características físico-químicas del ácido 5-O cafeoilquinico.

INFORMACIÓN FÍSICO-QUÍMICA	CLOROGÉNICO
Fórmula molecular	C ₁₆ H ₁₈ O ₉
Masa molar	354.31 g/mol
Apariencia	Polvo color blanco
Punto de ebullición	207 - 209 °C
Densidad	1.28 g/cm ³
Solubilidad en agua	Si. Solubilidad en etanol.

Fuente: tomado de Sigma-aldrich.

1.5. GENERALIDADES DEL BENEFICIO DEL CAFÉ

Después de la recolección, los frutos de café son procesados por tres métodos diferentes: el método húmedo, seco, y semi-seco.

El proceso húmedo es usado principalmente para el café Arábica: los frutos maduros son despulpados y sumergidos en tanques de agua de 12 a 48 h, donde sucede una fermentación

sumergida. Posteriormente lavados y secados hasta que se logra una humedad final de 10-12% (Murthy PS, 2012; C. Silva, 2014). El café obtenido por este método se denomina "lavado" o "café pergamino" (Leloup, V., Cancel, C., Liardon, R., & Rytz, 2004).

En el proceso seco, los frutos son secados enteros, al sol, en patios o plataformas sin remoción inicial de la pulpa (Silva CF, Batista LR, Abreu LM, Dias ES, 2008) y se obtiene café que se denomina "sin lavar" o "natural"; aunque de forma menos controlada, en este proceso también sucede una fermentación.

El método semi-seco es una combinación de ambos métodos, en el cual los frutos de café son despulpados, pero las reacciones bioquímicas ocurren directamente bajo el sol (Vilela DM, Pereira GVM, Silva CF, Batista LR, 2010). El café obtenido en este proceso se denomina "despulpado natural".

En la Figura 4 se presenta un esquema de los principales métodos de beneficio del café.

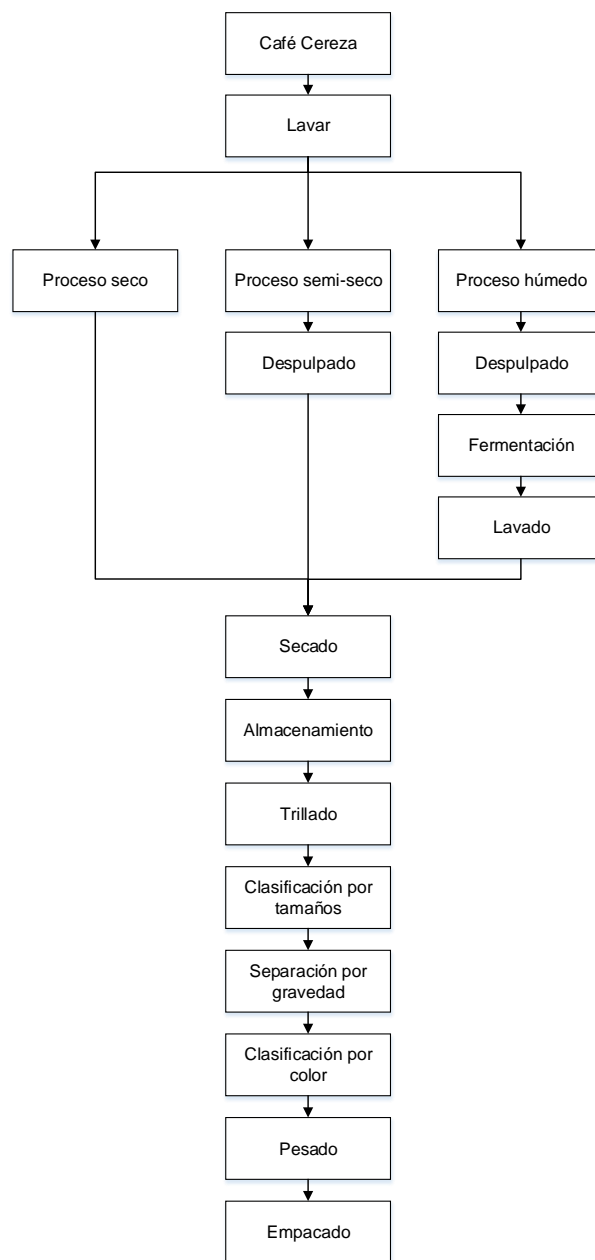
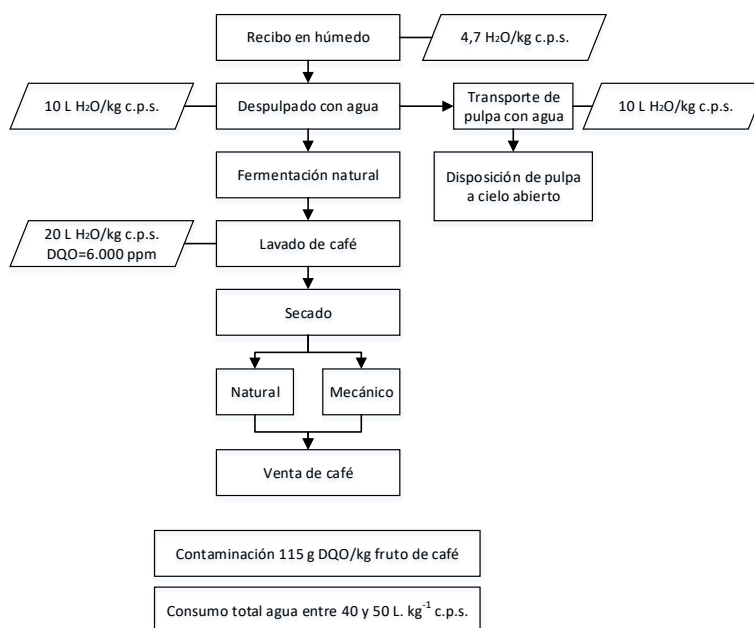


Figura 4. Principales métodos de beneficio y procesado de café.

Fuente: Adaptado (Pandey et al., 2000; Teixeira, A. A., Brando, C. H., & Thomaziello, 2005).

En Colombia, se emplean regularmente tres tipos de beneficio en las producciones cafeteras. La Figura 5 muestra el esquema de proceso de dos tipos de beneficio.

a)



b)

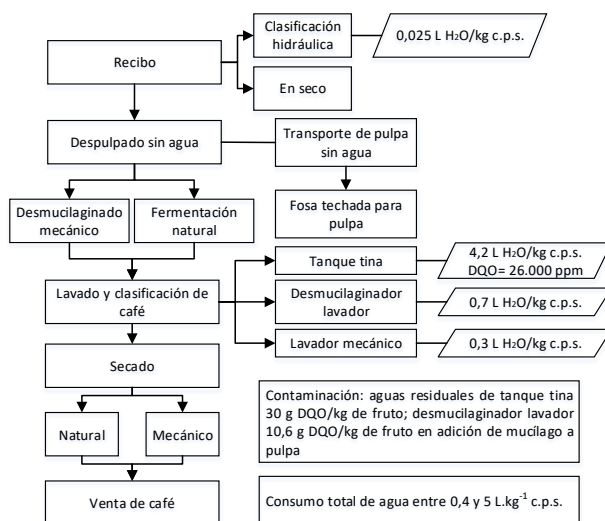


Figura 5. Dos tipos principales de beneficio de café desarrollado en Colombia. a) Beneficio tradicional; b) Beneficio ecológico (ahorro de agua).

Fuente: Cenicafé –Fedecafé, 2015.

Con la adopción del beneficio ecológico en sus variantes Belcosub® y Ecomill®, se logró la disminución del consumo de agua de 40-50 L.kg⁻¹ hasta 0.3-5.0 L.kg⁻¹ de c.p.s (café pergamino seco) (0.4-5.0 L.kg⁻¹ de c.p.s. en Belcosub® y 0,3 y 0,5 L.kg⁻¹ de c.p.s. en Ecomill®)

Se han realizado variaciones a los procesos de beneficio que incluyen o no fermentación. En la Tabla 7 se presentan algunas de estas variaciones en los métodos de beneficio de café.

Tabla 7. Métodos de beneficio alternativos en el café.

Método de beneficio	Despulpado	Fermentación	Lavado	Secado	Notas
Semi-lavado o ecológico S/F	1	0	1	1	Bajo consumo de agua
Semi-lavado o ecológico mini –F	1	1, corta	1	1	Desmucilaginación parcial
Semi-lavado o ecológico F-cereza	1, después de F-cereza	1-2, en cereza y/o despulpado	1	1	Puede tener 2 fermentaciones
Lavado FS	1	1, en seco	1	1	
Lavado FH	1	1, en agua	1	1	Fermentación
Lavado F semi-H	1	1, en seco y en agua	1	1	8-12 h FS y el resto FH
Lavado F-cereza	1, después de F-cereza	2, en cereza y FH (o FS)	1	1	12-24 h F-cereza y FH(FS) corta
Despulpado natural tradicional	1	1, durante 1 ^a fase de secado	0	1	Pergamino amarillo claro

Método de beneficio	Despulpado	Fermentación	Lavado	Secado	Notas
Despulpando natural rojo	1, sobre maduro	2, en cereza y 1 ^a fase secado	0	1	Pergamino amarillo oscuro o rojizo
Despulpado natural negro	1, seco en mata	2, en cereza y 1 ^a fase secado	1, ligera	1	Pergamino café oscuro
Natural tradicional	0	1, limitada	0	1, 3-7 días	Secado en patio o guardiolas
Natural con F-cereza	0	1, 1-3 días	0	1, 15-30 días	Técnica de “enmielado”
Natural, secado discontinuo	0	1, durante 1 ^a fase del secado	0	1, 15-21 días	Método Etiope
Natural, secado	0	2, durante 1 ^a	0	1, 15-30 días	Método Yemení

Fuente: (Díaz, 2014)

Nota: los dígitos 0, 1, 2, corresponden las veces que ocurre cada etapa del proceso de beneficio del café en los métodos alternativos. Fermentación (F), seca (S), húmeda (H).

Las variantes en los métodos de beneficio implican o no fermentaciones que pueden repercuten en cambios en la calidad físico-química, así como las características finales de la bebida de café. Los

diversos métodos de beneficio también involucran diferencias en costos de producción y hacen parte de las características de especialidad con las que se promocionan en el mercado. Las características sensoriales del café procesado con los métodos de beneficio alternativos planteados en la , dependerán en gran medida de la variedad de café que se procese.

Para la comprensión de la fermentación de café, a continuación se presentan las generalidades sobre la fermentación convencional y los sistemas empleados en café.

1.6. GENERALIDADES DE LA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

La fermentación del café, se produce en la etapa del beneficio del café y se refiere a la hidrólisis de la pulpa por el crecimiento microbial (Pereira, Soccol, & Soccol, 2016). En la fermentación, los cambios químicos y físicos del mucílago, así como los cambios en sabor y aroma del café, dependen de la temperatura (Puerta, 2015), debido a que es un factor que influye directamente en el crecimiento de los microorganismos que participan en la fermentación y las reacciones bioquímicas.

Entre los tipos de fermentaciones ocurridas en el café, se destacan la fermentación láctica, acética, alcohólica.

1.6.1. Fermentación láctica

En condiciones de glucosa abundante y oxígeno limitado, las bacteria ácido homolácticas cataboliza un mol de glucosa (vía glicólisis Embden-Meyerhof Pathway - EMP) para producir dos (2) moles de piruvato. El balance REDOX intracelular se mantiene a través de la oxidación de NADH, concomitante con la reducción del piruvato al ácido láctico. Este proceso produce dos (2) moles de ATP por glucosa consumida. Las bacterias ácido lácticas más representativas son *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, y el grupo I de lactobacilos. Las bacterias acido-lácticas toleran bajos pH (Díaz & Fernández, 2011).

1.6.2. Fermentación acética

La formación de ácido acético (CH_3COOH) resulta de la oxidación de un alcohol por la bacteria del vinagre, *Acetobacter*, un género de bacterias aeróbicas. La extrema fermentación acética del café produce el defecto agrio y otros sabores desagradables. Sin embargo, a bajas concentraciones aporta un perfil frutal meloso agradable (Díaz & Fernández, 2011).

1.6.3. Fermentación alcohólica

La glucólisis es la primera etapa de la fermentación, al igual que en la respiración celular, esta necesita de enzimas para su completo funcionamiento. Desde el punto de vista energético la fermentación alcohólica es una reacción exotérmica, pues libera energía. La fermentación alcohólica produce gran cantidad de CO_2 , cuya emergencia provoca burbujas. Este CO_2 pesa más que el aire, y puede llegar a crear bolsas que desplazan el oxígeno de los recipientes donde se produce la fermentación (de ahí que convenga cerrar los recipientes de fermentación) (Díaz & Fernández, 2011).

Cada tipo de fermentación tiene asociada la formación de unos productos, entre estos los ácidos asociados a las características detectadas en la bebida. A continuación se relacionan los ácidos generados en cada fermentación.

1.6.4. Formación de ácidos del café según la fermentación

Díaz y Fernández (2011), presentaron una relación entre los diferentes tipos de fermentaciones ocurridas en el café, los principales productos de la fermentación y su efecto en las características

organolépticas (Díaz & Fernández, 2011). En la Tabla 8, se muestra la relación entre el tipo de fermentación y ácido generado en el café.

Tabla 8. Tipo de fermentación y ácido de formación asociado

Tipo de fermentación	Ácido generado	Efecto
Fermentación láctica	Ácido láctico	Sabor mantequilla
	Ácido málico	Sabor manzana, pera, durazno
	Ácido cítrico (subproducto del ciclo respiración--- fotosíntesis)	Sabor fruta inmadura, astringente
Fermentación alcohólico--- acética	Alcohol	
	Ácido acético	Se incrementan considerablemente los niveles preexistentes
Fermentación fenólica	Ácido butírico (oxidación de fenoles)	Sabor a mantequilla rancia, sudor
Fermentación butírica	Ácido propiónico	Sabor a cebolla

Fuente: (Díaz & Fernández, 2011; Rivera, J. A., & Díaz, 2009)

1.7. SISTEMAS DE FERMENTACIÓN DEL CAFÉ

A continuación se presentan los principales factores en la fermentación del café referenciados como influyentes en las características finales en la bebida:

- Fermentaciones sólidas: el proceso de fermentación en estado sólido (SSF) se define como una fermentación casi en ausencia de agua, pero con la humedad suficiente en el sustrato que permita el crecimiento de los microorganismos (Pandey, 2003).
- Fermentaciones sumergidas: el café en baba se deposita en el fermentador y luego se agrega agua, en una cantidad con relación a la masa de café a fermentar; de esta forma se cambian la composición química y microbiológica del sustrato. Los sistemas de fermentación sumergidos son más homogéneos que los de sustrato sólido. Para el café se recomiendan fermentaciones sumergidas en una relación 30:100 (30%. Se tapona el desagüe del fermentador y se adicionan 30 L de agua limpia por cada 100 kg de café baba (Puerta, 2012b).
- Tipo de alimentación del sustrato: las fermentaciones del café se hacen de forma discontinua, debido a los tiempos de recolección del café; así, cada lote de café despulpado se fermenta y seguidamente se lava y se seca. En las fermentaciones continuas industriales se suministra nuevo sustrato después de determinado tiempo de proceso y también microorganismos fermentadores, además simultáneamente se van retirando los productos (Puerta, 2012b).
- Abiertos o cerrados: en las fermentaciones del café abiertas ocurren natural y simultáneamente las fermentaciones lácticas por *Lactobacillus spp.* y *Streptococcus spp.*, y la fermentación alcohólica por las levaduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*. Por el contrario, en los sistemas cerrados, los fermentadores se tapan, lo cual favorece también el desarrollo de fermentaciones mixtas, por las *Enterobacteriaceae* (Puerta, 2012b).
- Aireación: usualmente, en la fermentación discontinua no se agrega ni quita oxígeno y en los sistemas abiertos el CO₂ sale naturalmente del sistema. En los procesos continuos se requiere suministro de oxígeno para mantener el crecimiento de las levaduras y bacterias fermentadoras (Puerta, 2012b).
- Agitación: en la fermentación de los granos de café se recomienda una homogeneización al inicio de la fermentación, y al final, antes del lavado, para la medición de las características del sustrato fermentado y de los granos, pero no se recomienda una agitación

continua del sistema durante el proceso de fermentación del café. Para producir etanol o ácido láctico en las fermentaciones industriales de los residuos se requiere agitación constante del sistema, con el fin de mejorar la homogeneización y los rendimientos (Puerta, 2012b).

1.8. FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

La fermentación en estado sólido (FES) es entendida como un proceso que mejor imita el hábitat natural de la mayoría de los microorganismos, los cuales pueden desarrollarse con el manejo de los parámetros de manera efectiva, para la producción de metabolitos secundarios (Te Biesebeke et al., 2002). Se ha presentado algunas ventajas especialmente en escala de laboratorio, tales como alta productividad en la fermentación, alta concentración y estabilidad de productos finales, menor represión catabólica, cultivo de microorganismos especializados, entre otras (Hölker, Höfer, & J, 2004; J. C. Oviedo, Casas, Valencia, & Zapata, 2014)

1.9. MEDICIONES EN LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

La medición principal en un bioproceso es la síntesis de biomasa durante el tiempo. Este se emplea principalmente en las fermentaciones sumergidas mediante métodos directos. Sin embargo, estos métodos no son aplicables a fermentaciones sólidas, debido a que en este caso la biomasa es parcial o totalmente adherida a la superficie del sustrato (Pandey, Soccol, & Larroche, 2008).

Se han desarrollado métodos para medir la biomasa en fermentaciones sólidas que pueden dividirse en métodos directos e indirectos.

Los métodos directos se basan en la separación de la biomasa seguida de un procedimiento estándar normal como el establecido en fermentaciones sumergidas (conteo celular, etc). La principal desventaja es que necesita una extracción completa de la biomasa mantenida en el sustrato (Pandey et al., 2008).

Los métodos indirectos están basados en la determinación de un compuesto en particular de la célula, o el micelio que no está presente en el sustrato. Estos métodos incluyen: a) determinación del contenido de glucosamina; b) método ergosterol; c) determinación de ADN; d) determinación de proteína. Estos métodos también pueden presentar problemas porque pueden dañar las células o los micelios al tomar las muestras. Algunos autores plantean el método de procesamiento de imágenes (Duan, Wang, & Chen, 2012; Firrao et al., 2010) y el método de balance de gas metabólico (Pandey et al., 2008), como otros métodos indirectos que pueden superar estas dificultades.

1.9.1 Procesamiento digital de imágenes (PDI)

Una alternativa para la medición de la biomasa en FES es el procesamiento digital de imágenes. Las investigaciones del procesamiento digital de imágenes recientemente han tomado fuerza ya que proporcionan una respuesta rápida, económica y menos laboriosa como lo implican los análisis químicos en laboratorios, además de los recursos que estas implican (J. Oviedo, 2014). Para el café, se encontraron reportes del empleo de esta técnica en la evaluación de aromas en café (Chen, Zhang, Zhao, & Ouyang, 2013), en la clasificación de café (Aycheh, 2008) y en la determinación de la afectación de la enfermedad en la planta del café, denominada mancha de hierro (Guzmán, Gómez, Rivillas, & Oliveros, 2003)

1.9.2 Método de balance de gas metabólico

Puede ser considerado como método de medida directa de la cinética. El O_2 consumido o el CO_2 exhalado pueden ser relacionados linealmente con la síntesis de biomasa en un sistema aeróbico. Pero es indirecto para la estimación de biomasa. En el proceso anaeróbico, el CO_2 es un indicador directo de síntesis de biomasa y asociado a formación de productos como es el caso de la fermentación alcohólica. El procedimiento implica un balance de O_2 y CO_2 considerando el flujo

de aire a través del fermentador. El balance de O_2 consumido considerando el sistema es (Pandey et al., 2008):

$$O_2 \text{ consumido} = O_2 \text{ entrada} - O_2 \text{ salida} \quad ,$$

Ecuación (1).

Fuente: (Pandey et al., 2008)

Los flujos volumétricos de entrada son obtenidos así (composición de aire puro se asume como 20.9% O_2 y 79.1% N_2);

$$V_{O_{2e}} = (20,9/100) F_e \quad ,$$

Ecuación (2).

$$V_{N_{2e}} = (79,1/100)F_e \quad ,$$

Ecuación (3).

Fuente: (Pandey et al., 2008)

Donde:

$V_{O_{2e}}$: flujo volumétrico de oxígeno a la entrada del fermentador (l/h).

$V_{N_{2e}}$: flujo volumétrico de nitrógeno a la entrada del fermentador (l/h)

F_e : flujo de aire a la entrada del fermentador (l/h)

Se asume que el aire de salida del fermentador es consumido y tiene como composición solo O_2 , CO_2 y N_2 .

$$V_{O_{2s}} = (\%O_{2s}/100)F_s \quad ,$$

Ecuación (4).

$$V_{CO_{2s}} = (\%CO_{2s}/100)F_s \quad ,$$

Ecuación (5).

$$V_{N_{2s}} = \left(\frac{100 - \%O_{2s} - \%CO_{2s}}{100} \right) F_s ,$$

Ecuación (6).

$$V_{O_{2\text{ consu}}} = (20,9/100)F_e - (\%O_{2s}/100) F_s ,$$

Ecuación (7)

Fuente: (Pandey et al., 2008)

La relación entre F_e y F_s se obtiene considerando que el N_2 no es consumido durante el proceso.

$$V_{N_{2\text{ entra}}} = V_{N_{2\text{ sale}}} ,$$

Ecuación (8)

Fuente: (Pandey et al., 2008)

Donde:

$V_{O_{2s}}$: flujo de oxígeno volumétrico a la salida del fermentador (l/h)

$V_{CO_{2s}}$: flujo de dióxido de carbono volumétrico a la salida del fermentador (l/h)

$V_{N_{2s}}$: flujo de nitrógeno volumétrico a la salida del fermentador (l/h)

F_s : flujo de aire volumétrico a la salida del fermentador (l/h)

La relación entre el flujo de aire de la entrada y la salida del reactor es:

$$F_s = \left(\frac{79,1 F_e}{100 - \%O_2 - \%CO_2} \right) ,$$

Ecuación (9)

El flujo de oxígeno volumétrico consumido es:

$$V_{O_2\ cons} = \left(0,209 - \frac{0,791 \%O_2}{100 - \%O_2 - \%CO_2} \right) F_e \quad ,$$

Ecuación (10)

Asumiendo que no hay CO₂ a la entrada del fermentador, el flujo volumétrico de CO₂ producido es:

$$V_{CO_2\ prod} = \frac{0,791 \%CO_2}{100 - \%O_2 - \%CO_2} F_e \quad ,$$

Ecuación (11)

Fuente: (Pandey et al., 2008)

1.9.3 Modelación matemática

La modelación matemática para la fermentación en estado sólido es la búsqueda de expresiones matemáticas que representen un sistema en consideración, en las que se establezcan las relaciones o funciones entre variables que caractericen el sistema. Esto se hace con el objeto de cerciorarse de la validez del sistema para establecer diferentes parámetros que caractericen un proceso particular y encontrar mecanismos apropiados para desarrollar y controlar el proceso (Pandey, Soccol, Leo, & Nigam, 2001).

En el capítulo tres se tratarán algunos modelos y las ecuaciones que se han reportado en FES y que pueden ser de utilidad para el desarrollo de un proceso de fermentación en estado sólido para el café, teniendo como el objetivo la producción de componentes que enriquezcan la taza como es el caso del 5-O-cafeoilquinico.

A continuación, en el capítulo dos, se incluye una relación de los trabajos recientes encontrados sobre fermentación en estados sólido FES y los hallazgos con respecto a los microorganismos y enzimas investigados en el proceso del café y su relación con la producción de compuestos fenólicos, grupo químico al que pertenecen el ácido 5-O-Cafeoilquinico.

CAPÍTULO 2

FACTORES BIÓTICOS Y ABIÓTICOS QUE INFLUYEN EN EL CONTENIDO DE 5-O-CAFEOILQUÍNICO

En el caso de la planta de café, el principal componente de los ácidos clorogénicos, es el ácido 5-O-cafeoilquínico (5CQA), que cumple también una función ecológica en la planta. Este ácido es un metabolito de la ruta metabólica del fenilpropanoide que es inducida por estrés en relación a factores bióticos (herbívoros, microorganismos patógenos) y abióticos (UV, temperatura, nutrientes y luz). Se cree que la función específica en la planta es defensa contra la infección microbiana y herbívoros, que actúa como una pantalla contra la radiación UV dañina y eliminación de radicales libres y otras especies oxidativas (T. W. Baumann, 2005; Cheng et al., 2016).

Los fenilpropanoides son un grupo de metabolitos secundarios de las plantas, derivados de fenilalanina y que tiene una amplia variedad de funciones, tanto como moléculas estructurales y de señalización. La fenilalanina se convierte primero en ácido cinámico por desaminación. Esta es seguida por hidroxilación y frecuente metilación para generar ácido cumárico y otros ácidos, con una unidad de fenilpropano (C₆-C₃). La reducción de los grupos carboxilo CoA- activados de estos ácidos resultan en los correspondientes aldehídos y alcoholes. Los alcoholes se denominan monolignoles, los compuestos de partida para la biosíntesis de la lignina (DBGET, 2016). La Figura 6 presenta la ruta metabólica de los fenilpropanoides.

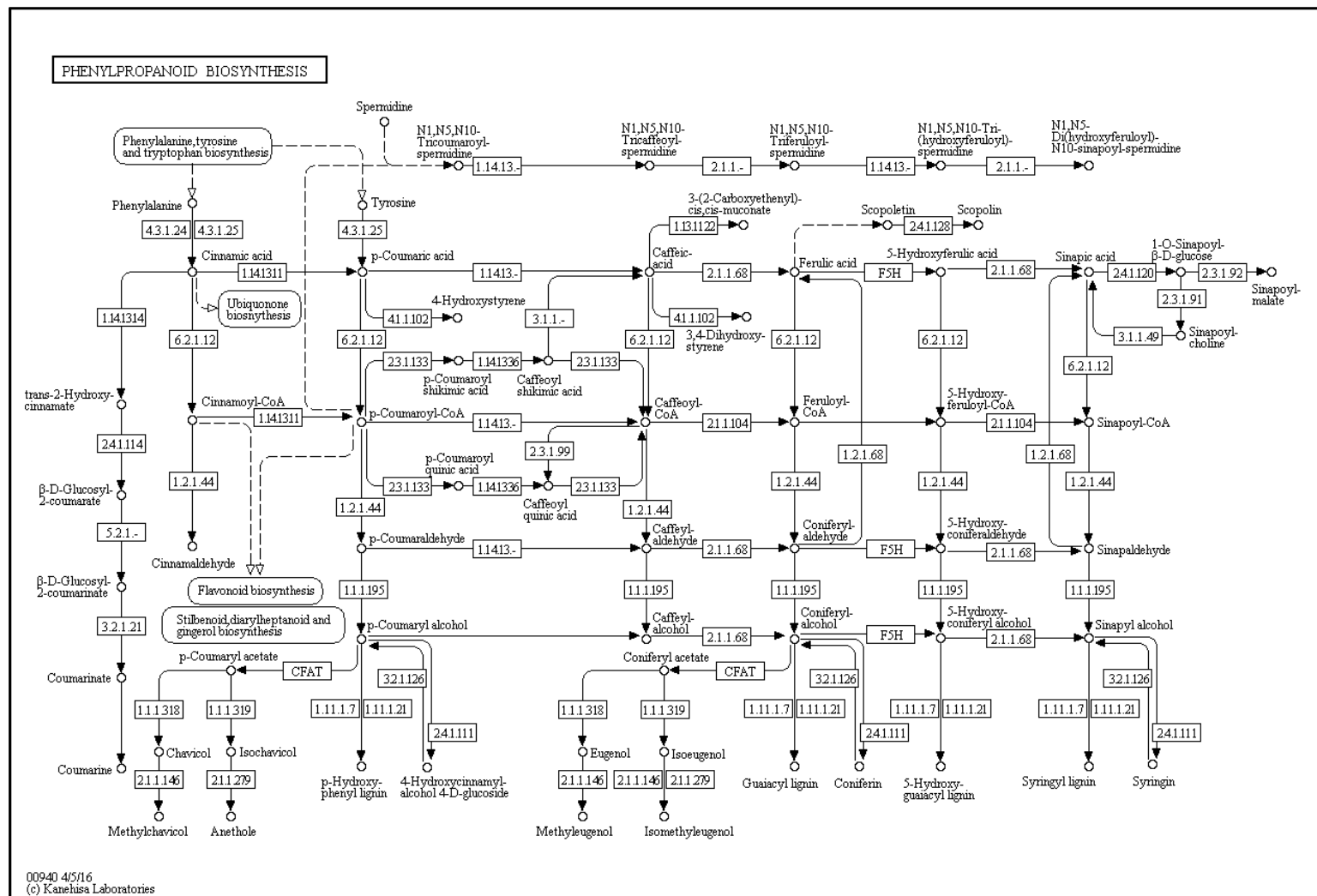


Figura 6. Ruta metabólica del fenilpropanoide.

Fuente: (DBGET, 2016)

Con respecto a los ácidos clorogénicos, se encontró relación entre la expresión de enzimas específicas y la acumulación de estos compuestos en la semilla de café, de acuerdo a sus estados de desarrollo. El incremento del contenido de 5-CQA se relacionó con la expresión de las enzimas codificadas PAL (fenilalanina amonio liasa), C4H (trans-cinamato 4-hidroxilasa), 4CL (4-coumarato: CoA ligasa), C3'H (p-coumaroyl CoA 3-hidroxilasa) y HQT (hidroxicinamoyl-CoA quinato hidroxicinamoyl), durante los 120 a 150 días después de la floración (DAF). Durante la etapa entre los días 150 y 210 DAF, se encontró un retraso en la acumulación en climas más fríos y una correlación positiva con la temperatura (Cheng et al., 2016).

PAL (fenilalanina amonio liasa) es la enzima punto de ramificación entre el metabolismo primario (vía shikimato) y el metabolismo secundario (vía fenilpropanoide) (Dixon & Paiva, 1995). Se ha encontrado que la expresión de PAL y C4H en la regulación de la biosíntesis de CGA está sujeto a cambios ambientales incluidos el estrés biótico y abiótico (Benveniste, Salaün, & Durst, 1978; Tovar, Romero, Girona, & Motilva, 2002), sin embargo, no hay investigaciones sobre el rol de la influencia ambiental en la calidad del café, más allá de los estudios de adaptación de la planta (Cheng et al., 2016).

A continuación, se plantean algunas consideraciones basadas en los reportes encontrados en relación a la interacción de varios factores de relevancia en fermentaciones en estado sólido (FES), entre estos la humedad, la temperatura y los microorganismos y enzimas, que pueden incidir en la conservación, potencial antioxidante y generación de ácidos clorogénicos como el 5-O-cafeoilquinico en el café.

2.1 FERMENTACIÓN CONTROLADA EN CAFÉ

En el caso de la fermentación de café, la emulación controlada de unas condiciones ambientales bióticas y abióticas, darían lugar al estímulo de los mecanismos de defensa de la semilla mediante un estrés oxidativo, similar al que se produce en los cuerpos biológicos como el cuerpo humano. A su vez, el efecto de los productos generados por el metabolismo de los microorganismos y las enzimas generadas, pueden aportar características organolépticas y enriquecer el grano.

Hace menos de diez años se consideraba la fermentación con el objetivo exclusivo de drenar la pulpa para facilitar el secado de las semillas (Pereira et al., 2016). En los años recientes se ha establecido que a partir de los procesos bioquímicos durante la fermentación, las enzimas producidas por los microorganismos presentes en el mismo mucílago, fermentan y degradan los azúcares, lípidos, proteínas y ácidos, y los convierten en alcoholes, ácidos, ésteres y cetonas, que pasan a ser en sustancias que cambian las características de olor, color, pH y composición del sustrato (el mucílago) y también de los granos de café (Puerta, 2010, 2012a).

La velocidad y la clase de productos generados en la fermentación del café dependen de factores que afectan el metabolismo mismo de los microorganismos como la temperatura externa, el tipo de sistema de fermentación, el tiempo de proceso, la calidad del café en baba, la acidez del sustrato, la disponibilidad de oxígeno y la higiene del proceso, entre otros (Puerta, 2015).

2.2 PARÁMETROS DEL BIOPROCESO DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

2.2.1 Relación de agua en el sistema

La relación de agua en un sistema de fermentación sólida es uno de los factores de evaluación crítica en el proceso, porque la actividad de agua (a_w) del sustrato tiene una influencia determinante en la actividad microbiana. El a_w del medio ha sido atribuido como un parámetro fundamental para la transferencia de masa de agua y solutos a través de las células microbianas. El control de este parámetro podría ser usado para modificar la producción metabólica o la excreción de un microorganismo (Rodríguez-León et al., n.d.; Singhanian et al., 2009).

Al igual que la relación de agua en el sustrato, la humedad relativa del aire también afecta el producto de interés en la fermentación. Al respecto se encontró el incremento de un compuesto fenólico producido por *Aspergillus oryzae* en fermentación en estado sólido por 72 h a 30 °C, con monitoreo en el suplemento de oxígeno, transferencia de calor y actividad del agua. En este caso, la circulación de aire humidificado, disipó el calor producido por la fermentación, manteniendo los porcentajes de agua en el sustrato lo que permitió el incremento en el crecimiento del hongo y

la producción de los compuestos fenólicos (Bhanja, Rout, Banerjee, & Bhattacharyya, 2008). La adición de agua al sustrato es extremadamente importante cuando este contiene hemicelulosa y pectina, debido a que absorben más agua, y potencian el incremento del crecimiento de los microorganismos en el sustrato (Madeira Junior et al., 2013; Martínez-Ávila, Aguilera-Carbó, Rodríguez-Herrera, & Aguilar, 2012).

El monitoreo de las condiciones de humedad en la fermentación también puede influir en el control de hongos no benéficos producidos en el café, siendo el caso del hongo *Aspergillus ochraceus* (principal productor de la Ochratoxina A, OTA). Este hongo está ampliamente distribuido en la fincas cafeteras, en ambientes de beneficiaderos, secadores solares, cisco, café pergamino y café almendra (Puerta, 2006). Su presencia causa daño al café sólo cuando ocurren condiciones adecuadas de humedad, temperatura, tiempo y deficiencia en higiene. Otros microorganismos no benéficos para la calidad del café y el a_w para producción de toxinas se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Mínima actividad de agua (a_w) para el crecimiento y producción de toxinas por diferentes hongos.

Microorganismo	Mínima a_w de crecimiento de microorganismo	Mínima a_w para producción de toxina	Toxina
Aspergillus ochraceus	0,76 – 0,83	0,83 – 0,87	Ochratoxina A
A. clavatus	0,85	0,81 – 0,88	A. penicílico
A. flavus	0,78 – 0,80	0,99	Patulina
A. parasiticus	0,78 – 0,82	0,83 – 0,87	Aflatoxina
Penicillium expansum	0,82 – 0,85	0,87	Aflatoxina
		0,99	Patulina

Microorganismo	Mínima a_w de crecimiento de microorganismo	Mínima a_w para producción de toxina	Toxina
P. verrucosum	0,81 – 0,83	0,83 – 0,9	Ochratoxina A

Fuente: (Puerta, 2006).

Las condiciones de a_w , tanto en las relacionadas con el crecimiento del microorganismo, así como para la producción de toxinas debe ser controlada y monitoreada en la FES. La temperatura afecta la movilidad de las moléculas de agua y el equilibrio entre fases de vapor y adsorbente. Un aumento de la temperatura, para actividad de agua constante, provoca un descenso de la cantidad de agua absorbida. Una excepción a esto se presenta en el caso de ciertos azúcares y componentes de baja masa molecular que se disuelven en agua y se vuelven más higroscópicos a temperaturas más altas. Por otra parte, la reactividad química y microbiológica se ve afectada por la relación temperatura-contenido de humedad, ya que un aumento de la temperatura provoca un aumento de la actividad de agua a un contenido de humedad constante (Barbosa-Cánovas, G. & Vega- Mercado, H, 2000).

2.2.2 Propiedades termo-físicas

Las propiedades termo-físicas influyen directamente en el diseño de cualquier proceso térmico ya que están involucradas en la transferencia de masa y de energía térmica, y tienen una estrecha relación con la estructura celular y química de los materiales. Normalmente se utilizan modelos basados en la composición básica de los materiales (alimentos, proteínas, aceites, agua, etc.) para calcular indirectamente estas propiedades (Joseph, 2001). Delgado, et al. (2009), encontraron que los parámetros difusividad, efusividad, conductividad y calor específico cambian apreciablemente cuando se profundiza en el grano de café. La Tabla 10 muestra los parámetros correspondientes a muestras de café orgánico y convencional. Las medidas de difusividad y efusividad térmica fueron obtenidas del ajuste de curvas de intensidad de la señal fotoacústica, mientras que la conductividad térmica y el calor específico fueron calculados.

Tabla 10. Parámetros termo-físicos de muestras de café orgánico y convencional.

Variable	Difusividad térmica (cm ² /s)	Efusividad térmica	Conductividad térmica	Capacidad calorífica	
		(Ws ^{1/2} cm ⁻² K ⁻¹)	(W cm ⁻¹ K ⁻¹)	(J cm ⁻³ K ⁻¹)	
Profundidad (µm) ± µm	0	0,00152 ±	0,094 ±	0,0037 ±	2,4 ± 0,2
		0,00002	0,007	0,0003	
	200	0,00152 ±	0,26 ±	0,0101 ±	6,67 ± 0,09
		0,00002	0,003	0,0001	
	400	0,00184 ±	0,207 ±	0,0089 ±	4,8 ± 0,1
		0,00002	0,005	0,0002	
	600	0,0013 ±	0,197 ±	0,0071 ±	5,5 ± 0,2
		0,00007	0,006	0,0003	
Cultivo	Tradicional	0,00138 ±	0,061 ±	0,00226 ±	1,64 ± 0,06
		0,00002	0,002	0,00008	
	Orgánico	0,00108 ±	0,067 ±	0,00220 ±	2,04 ± 0,04
		0,00002	0,001	0,00004	

Fuente: (Delgado, Vela, & Rincón, 2009)

La difusividad térmica de un material, indica la razón a la que el calor se distribuye en un material. Si se somete a un cambio de temperatura a dicho material su temperatura variará en mayor o menor medida, cuanto mayor sea la variación mayor será su difusividad térmica. Dicha razón depende no solamente de la conductividad térmica del material, sino también de la razón a la cual puede almacenar la energía. Según D. Bicanicm, et al. (2004), S.O. Ferreira, et al., (1998) y G. Ziegler, et al., (1981), este parámetro de transporte térmico es único para cada material y por ende relacionado con su microestructura y composición química, y de acuerdo con O. Ochoa, A., et al., (2006), es de especial interés para la optimización de procesos de almacenamiento, congelación y tostado de alimentos (Delgado et al., 2009). La utilidad de estos parámetros en FES se puede

relacionar con la distribución del calor en la interacción masa (semilla) – sustrato (mucílago), la composición química de la semilla de acuerdo a los compuestos que se pueden acumular, así como con las condiciones de almacenamiento posteriores a la FES. Para desarrollos de FES se deben realizar las mediciones de las propiedades termo-físicas del mucílago.

2.2.3 Temperatura

Estudios alrededor de la temperatura demostraron que esta tiene efecto en la velocidad de las degradaciones del mucílago de café. Mediante la refrigeración entre 4 y 8°C se retrasó la velocidad de las fermentaciones alcohólicas y lácticas; así, en refrigeración a las 31 horas se degradó el 20% de los azúcares reductores en comparación con 30% a temperatura promedio de 23°C; por otro lado, a las 20 horas de fermentación el mucílago de café presentó una acidez 3,5 veces mayor que la inicial, mientras que en el mucílago refrigerado por el mismo tiempo esta acidez solo aumentó un 20% con respecto al mucílago fresco (Puerta, 2012b). La condición de temperatura baja genera como efecto la ralentización de los procesos metabólicos en los organismos al igual que en los microorganismos.

Se evaluaron los cambios en los compuestos químicos del mucílago y en los volátiles del café tostado, a partir de fermentaciones sólidas y sumergidas de café a temperaturas constantes de 15 ± 1 y 20 ± 1 °C, y a temperaturas entre la noche y el día de 18 a 26°C (promedio 23°C) en sistemas abiertos y cerrados. Se encontró que la temperatura del ambiente donde se desarrolla la fermentación controlada del café diferencia la proporción y tipo de aromas y sabores de la bebida, así como, las cantidades de sustancias volátiles en el café tostado y en el mucílago fermentado. Las diferencias se atribuyen al efecto de la temperatura en la fermentación, debido a que todos los otros factores como origen geográfico del café, variedad, madurez, agua de proceso, secado y métodos de análisis se mantuvieron constantes (Puerta, 2015).

Cuando la fermentación del café se realizó a 15°C se incrementó la frecuencia de sabores especiales y de café con calidad especial y superior, en comparación a la calidad obtenida en fermentaciones a temperatura ambiente de 18 a 26°C. De otra parte, la presencia de defectos (ásperos, a madera y agrios) es más frecuente en fermentaciones realizadas a temperaturas más

altas, en sistemas cerrados, sólidos y para tiempos de fermentación por encima de 42 horas (Puerta, 2015).

2.2.4 pH del sustrato

El pH del sustrato determina las actividades enzimáticas, debido a que cada una depende de diferentes valores óptimos de pH (Sermanni & Tiso, 2008). Además de un pH óptimo, cada enzima presenta termoestabilidad a diferentes rangos de temperatura, lo que optimiza su efecto hidrolítico según el sustrato (Patel, Singhanian, & Pandey, 2016).

En estudio sobre el efecto del pH en las propiedades antioxidantes en cultivos sumergidos de *Antrodia camphorata*, un hongo medicinal y tradicional Chino (Basidiomiceto), que tiene entre sus componentes químicos potenciales importantes, las lactonas sesquiterpénicas, esteroides, y triterpenoides, entre otros, se reportó que a bajo pH (3.0) se favorece el crecimiento celular, pero altos pH (5.0), favorecen las propiedades antioxidantes, siendo los fenoles totales, los posibles responsables de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de los micelios y los filtrados (Shu & Lung, 2008).

El estrés alcalino es un factor importante en la producción y activación de compuestos fenólicos (Madeira Junior et al., 2013). Se reporta una correlación lineal entre el incremento del pH y la cantidad de ácido Gálico en la fermentación de bagazo de caña y semillas de algodón, debido a las mejores condiciones para la actividad enzimática generadas por el efecto del pH, mejorando la hidrólisis del sustrato e incrementando la producción del compuesto (Ravindran et al., 2011). Aunque el pH es un factor de mayor incidencia en cultivos sumergidos que en los de estado sólido, este parámetro tiene influencia significativa en la fisiología del microorganismo y afecta el rendimiento de los biocompuestos metabolizados (Shu & Lung, 2008).

2.2.5 Aireación y agitación

La aireación y agitación son dos parámetros importantes en el proceso de fermentación en estado sólido, debido a la demanda de O_2 del proceso aerobio, y el fenómeno de transporte de calor y masa en un sistema heterogéneo. Un criterio para expresar la aireación en un sistema particular se obtiene por la intensidad del flujo de aire. Este valor es el flujo de aire expresado por unidad de peso de sustrato ($1 \text{ aire kg}^{-1} \text{ m}^{-1}$). Debe quedar claro si el peso considerado para el cálculo es en base seca o húmeda. Una vez que el nivel de aireación se encuentra como un factor intensivo, este valor podría servir como criterio de aireación para escalas superiores del proceso. Otro punto a tener en cuenta es la calidad del aire, especialmente la humedad del aire que entra al fermentador. En fermentaciones sólidas comúnmente se utiliza aire saturado para evitar deshidratar el sustrato (Pandey et al., 2008).

2.2.6 Mezclado

La agitación o mezclado puede resultar en ocasiones no conveniente porque algunos microorganismos no toleran las fuerzas de rozamiento. Por esta razón se ha empleado con mayor frecuencia la circulación forzada de aire o aireación (Mazaheri & Shojaosadati, 2013).

2.2.7 Tamaño de partícula y uniformidad de la biomasa

Con respecto al tamaño de partícula, se debe tener en cuenta que la superficie de la matriz el sustrato tiende a disminuirse en el caso de la formación del micelio, particularmente cuando se utilizan hongos durante la fermentación. La contracción de la matriz del sustrato puede provocar canalización durante el proceso. Cuando se emplean residuos agroindustriales, es muy frecuente realizar un pretratamiento para lograr una mejor función de los microorganismos. Generalmente se utiliza la reducción de tamaño de partícula para exponer mayor superficie de contacto. Una reducción minúscula del tamaño de partícula también puede crear problemas de canalización y

compactación de la matriz, generando problemas de transferencia de masa y calor (Pandey et al., 2008).

Entre los factores críticos, se expone que son la humedad y la naturaleza del sustrato sólido, los que afectan a los procesos más importantes de la fermentación en estado sólido. La selección de la humedad depende del microorganismo empleado y también la naturaleza del sustrato. Los hongos necesitan una humedad entre 40-60%. La selección de sustrato depende de varios factores, principalmente relacionados con el costo y la disponibilidad, y por lo tanto puede implicar la mezcla de varios residuos agroindustriales (Singhania et al., 2009).

Otros pretratamientos han sido considerados en fermentación, como es el caso de la hidrolización enzimática de la pulpa de café, obteniendo azúcares reductores, para luego ser llevada a fermentación en estado sólido con inoculación de la bacteria termófila *B. coagulans* y producir L(+)-ácido láctico (Pleissner et al., 2016).

2.2.8 Condiciones asépticas e Inóculo microbiológico

El recuento y la clase de microorganismos presentes en un momento dado de la fermentación del café dependen de la población inicial en los frutos y granos despulpados, de las condiciones ambientales como la temperatura, los gases como el CO₂, la actividad del agua, el pH, el potencial redox, la higiene, del tiempo transcurrido y del sistema y la dilución del sustrato. En la fermentación de café, una zaranda en inadecuadas condiciones de higiene puede cambiar los recuentos y tipos de microorganismos del sustrato a fermentar (Puerta, 2012a).

2.2.9 Morfología de los microorganismos

El potencial de la fermentación en estado sólido se encuentra en la compatibilidad del microorganismo cultivado con el sustrato y una alta concentración de sustrato disponible para la fermentación. La fermentación en estado sólido se debe parecer al hábitat natural de

microorganismos (especialmente en los casos de hongos filamentosos), siendo la elección preferida de los microorganismos para crecer y producir productos de valor agregado útil (Singhania et al., 2009).

En el caso específico de la morfología de los hongos, su crecimiento en estado sólido es en forma micelial, donde las hifas son producidas de forma aérea y penetrando el sustrato (Te Biesebeke et al., 2002). Esta característica fenotípica del patrón de crecimiento es común para todos los tipos de FES en comparación con las fermentaciones sumergidas, donde la macro-morfología varía de micelio libremente dispersado, a micelial con formación de grumos y gránulos de micelio densos (Papagianni, 2004).

Se han referenciado varios tratamientos biológicos, que incluyen el uso de microorganismos en la FES con el propósito de producir compuestos bioactivos a partir del uso de la pulpa de café como sustrato. Los microorganismos como los hongos filamentosos han sido los más utilizados (50%), seguidos de las levaduras (30%), los actinomicetos (15%) y las bacterias (5%) (Singhania et al., 2009). La fermentación en estado sólido (SSF) se utilizó específicamente para la destoxificación biológica de la pulpa de café con hongos filamentosos en escala de laboratorio (Orozco, A. L., Pérez, M. I., Guevara, O., Rodríguez, J., Hernández, M., González-Vila, F. J., ... Arias, 2008) y para la producción de antioxidantes fenólicos a partir de residuos agroindustriales y plantas ricas en taninos (Aguilar et al., 2008). Los desarrollos en FES para obtener cualidades en el café son muy recientes. A continuación se tratarán algunas referencias encontradas sobre el tema.

Aunque a la fecha no se encuentran reportes sobre la correlación entre un tipo específico de microbiota y la acumulación de ácidos clorogénicos en el café; se encuentran algunos estudios sobre la incidencia de microorganismos, su relación con el incremento de compuestos fenólicos, grupo al que pertenecen los ácidos clorogénicos como el 5-O-cafeoilquínico, y algunos cambios en las características sensoriales en el café generados a través de la fermentación.

2.3 MICROORGANISMOS Y ENZIMAS PARA EL DESARROLLO DE CUALIDADES EN EL CAFÉ

Los diferentes tipos de bebidas de café están caracterizadas por diversos matices en términos de cuerpo, aroma, acidez y astringencia. Existen varios factores que influyen en la bebida final, y entre estos está la acción de los microorganismos (Esquivel & Jiménez, 2012). Aunque las plantas son la fuente primaria de compuestos fenólicos, estos también se producen como metabolitos secundarios de hongos basidiomicetos (Palacios et al., 2011; F. S. Reis, Martins, Barros, & Ferreira, 2012), levaduras (Banach & Ooi, 2014) y endófitos (de Carvalho, Silva, Chagas-Paula, Luiz, & Ikegaki, 2016).

Se ha planteado que durante el proceso de fermentación, los antioxidantes fenólicos son producidos por dos vías: los microorganismos a través de rutas metabólicas secundarias en interacción con la pulpa de café o la liberación de estos fenólicos de la matriz del sustrato por acción enzimática extracelular que se inician posteriormente en el mismo grano (Schwan & Fleet, 2014). Diferentes enzimas extracelulares son producidas y simultáneamente utilizadas para la extracción y liberación de fenólicos de la matriz del sustrato junto con la producción de nuevos compuestos fenólicos por el metabolismo secundario de microorganismos (Dey et al., 2016).

La síntesis microbiana tiene varias ventajas significativas sobre la síntesis química, la extracción de plantas o los cultivos celulares de plantas por su rápido crecimiento, facilidad de cultivo y flujo del proceso, eficiencia en costos y es más amigable con el medio ambiente (Fowler & Koffas, 2009).

Los microorganismos involucrados en procesos FES pueden ser clasificados en dos grupos principales: los naturales (se encuentran en el ecosistema) y los cultivos puros, usando cepas individuales o una mezcla de cultivos. Los bioprocesos FES, a diferencia del compostaje y el ensilaje, involucran cultivos puros de cepas conocidas (Pandey et al., 2008)

Un estudio que evaluó el contenido de CGA de acuerdo a métodos de beneficio, reportó la disminución en el contenido de los CGA en Arábica en el método húmedo con fermentación por

8 horas, con respecto al método seco y sin manejo de temperaturas; no se encontró cambios significativos entre el método seco y semi-seco para la misma variedad (A. Duarte, 2010).

Con relación a la actividad enzimática por efecto de microorganismos y el contenido de CGA, se reportó el efecto de tres diferentes microorganismos en la FES de salvado de avena como fuente de compuestos fenólicos. Después de la FES, los ácidos caféico y ferúlico incrementaron su solubilidad y se facilitó su extracción, gracias a la hidrólisis producida por diferentes tipos de enzimas microbiales y sus actividades. Entre las enzimas producidas por estos hongos del género *Aspergillus* se encuentran la glucósido hidrolasa, enzimas degradantes de celulosa o xilano y esterasa, que pueden suavizar la estructura del núcleo, descomponer las paredes celulares de los cereales y liberar sustancias nutritivas esterificadas y de cadena insoluble. Esto representa grandes ventajas sobre un proceso que usa altas temperaturas y altos costos energéticos (Cai, Wang, Wu, & Al., 2012). También encontró que las actividades antioxidantes de cereales y pseudocereales fueron más o menos mejoradas a través de la fermentación por bacterias lácticas (*Lactobacillus rhamnosus*) y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) (Dordević, Šiler-Marinković, & Dimitrijević-Branković I., 2010).

Para el caso del café, se ha reportado que las principales levaduras fermentadoras del mucílago encontradas son *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lipolytica*, *C. parasilopsis* y *C. pintolopesii*, que producen etanol y CO₂, y las no fermentadoras como *Cryptococcus terreus*, *Rhodotorula rubra* y *R. glutinis*. Las bacterias lácticas del mucílago son *Lactobacillus acidophilus*, *L. fermentum*, *L. plantarum* y *Streptococcus faecalis*, entre otras, las cuales producen ácido láctico, alcohol, ácido acético, ácido fórmico y dióxido de carbono (Puerta, 2012a). También se reportaron bacterias anaerobias facultativas que producen fermentaciones mixtas como *Enterobacter spp.*, *E. agglomerans*, *E. aerogenes*, *Erwinia sp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella ozaenae*, *Proteus sp.*, *Serratia fonticola* y *Citrobacter freundii*; además, bacterias aerobias del género *Staphylococcus*, actinobacterias del género *Streptomyces*, bacterias anaerobias como *Clostridium butyricum*, y hongos de los géneros *Trichoderma*, *Alternaria* y en ocasiones *Penicillium* y *Aspergillus* (Puerta, 2012a).

La población de levaduras y de algunas bacterias aerobias y aerobias facultativas aumenta en las primeras horas de la fermentación del café en sistemas abiertos y sin agua, sin embargo a medida que el proceso avanza el pH inicial cercano a 5,2 desciende a valores entre 3,5 y 4,0, de esta forma,

se inhibe el crecimiento de coliformes y de otras bacterias del mucílago, aunque se favorece el desarrollo de las levaduras y de las bacterias *Lactobacillus* que son acidófilas. En el mucílago de café maduro *Saccharomyces* crece continuamente durante la fermentación, *Candida* y *Torulopsis* se mantienen hasta las 50 horas, pero *Rhodotorula* y *Cryptococcus* sólo se presentan en las primeras 4 a 8 horas (Puerta, 2012a).

En el caso de los subproductos de café, se reportó que la pulpa de café fermentada con la cepa de bacterias ácido lácticas (BAL) LC-01, podría ser una fuente redituable para la obtención de compuestos fenólicos que son capaces de reducir radicales libres, responsables de la aparición de células dañinas en el cuerpo humano (López et al., 2013).

Los cultivos BAL son comúnmente usados en la industria alimentaria como iniciadores para la producción de gran variedad de alimentos fermentados (Yang, Ji, Baik, Kwak, & McCaskey, 2005). La fermentación láctica es un tipo de cultivo que permite la recuperación de compuestos que actualmente tienen un alto impacto en la salud humana y le pueda dar un valor agregado a la pulpa de café (Cira, Huerta, Hall, & Shirai, 2001). Se ha utilizado la pulpa de café (residuo lignocelulósico) como fuente de carbono en la producción de L(+)- ácido láctico mediante fermentación usando la bacteria *Bacillus coagulans*. El mejor resultado en la producción de L(+)- ácido láctico mediante fermentación sólida, se dio a escala piloto debido posiblemente a la mejor mezcla y homogenización, lo cual los autores sugieren seguir investigando (Pleissner et al., 2016).

Otras alternativas de microorganismos que puedan participar en el metabolismo de los componentes del sustrato en una fermentación sólida del café, pueden estar relacionadas con la búsqueda en la biodiversidad de microbiota costarricense, con los microorganismos que realizan naturalmente la bioconversión de los materiales lignocelulósicos. Uno de los ejemplos más sobresalientes se presenta en los microorganismos que habitan dentro de los intestinos de insectos que se alimentan de madera en descomposición. En este microecosistema existe una simbiosis entre el insecto hospedero y los microorganismos asociados a su tracto digestivo: el insecto les provee protección y un flujo constante de biomasa y los microorganismos degradan los materiales lignocelulósicos proporcionándole a cambio carbohidratos y otros nutrientes (Rojas-Jiménez, Hernández, & Blanco, n.d.), entre ellos la degradación de la lignina, compuesto que pertenece a la ruta metabólica del fenilpropanoide, al igual que los CGA.

Durante la fermentación, diferentes enzimas extracelulares son producidas y simultáneamente utilizadas para la extracción y liberación de compuestos fenólicos de la matriz del sustrato en un proceso simple, junto con la producción de nuevos compuestos fenólicos por el metabolismo secundario de microorganismos (Dey et al., 2016). Se ha encontrado que en la mayoría de los casos, se obtuvieron rendimientos superiores en procesos enzimáticos que en los obtenidos con procesos microbiológicos (Madeira Junior et al., 2013).

La liberación completa de los compuestos fenólicos ligados, es posible por hidrólisis ácida o base, sin embargo las condiciones ácidas y de calor conducen a la degradación de los derivados del ácido cinámico, ácido p-cumárico, ácido caféico y ácidos felurónicos (Robbins, 2003). La degradación y extracción de compuestos fenólicos de las paredes celulares por degradación enzimática, representa una alternativa útil y ecológica mediante el uso de enzimas hidrolíticas como α -amilasa, celulasa, xilanasas and esterasas (Dey et al., 2016)

se ha considerado que los metabolitos producidos en durante los procesos de fermentación pueden difundirse al interior de los granos e influenciar la calidad final de la bebida (Reis-Evangelista, Ferreira-Silva, PedrozodaCruz-Miguel, M.G. deSouza-Cordeiro, Marques-Pinheiro, A.C. Ferreira-Duarte, & Freitas-Schwan, 2014). La diversidad microbiológica en estos procesos es alta y han sido identificadas varias especies de bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Aunque la actividad de la microbiota natural en el café ya ha sido estudiada por algunos autores, sigue siendo necesaria la comprensión de la influencia de diferentes grupos de microorganismos específicos en la calidad de los procesos realizados en seco, semi-seco y húmedo (C. F. Silva, Batista, Abreu, Dias, & Schwan, 2008).

La Tabla 11 presenta algunos reportes de microorganismos cultivados en pulpa, cascarilla y fermentaciones de café y el propósito o resultado de su utilización.

Tabla 11. Microorganismos cultivados en pulpa, cascarilla de café y procesos de beneficio húmedo, seco y semi-seco.

Microorganismo	Propósito	Referencia
<i>Aspergillus sp.</i> ^c	Enriquecimiento proteína	(Penaloza, Molina, Gomez, & Bressani, 1985)

Microorganismo	Propósito	Referencia
<i>A. niger</i> ^a	Producción pectinasa	(Antier, Minijares, Roussos, Raimbault, & Gonzalez, 1993; Minjares-Carranco, Trejo-Aguilar, Aguilar, & Viniegra-Gonzalez, 1997)
<i>A. niger</i> ^c	Producción pectinasa	(Boccas, Roussos, Gutierrez, Serrano, & Vineigra, 1994)
<i>A. Niger NRRL 2001</i> ^c	Ácido cítrico	(Vandenberghe, Soccol, Pandey, & Lebeault, 1999)
<i>Ceratocystis fimbriata</i> ^c	Aroma frutti	(Soares, Christen, Pandey, & Soccol, 2000)
<i>F. moniliforme</i> ^c	Ácido giberélico	(Machado, Oliveira, Pandey, & Soccol, 1999)
<i>G. fujikuroi</i> ^c	Ácido giberélico	(Machado et al., 1999)
<i>L. edodes</i> ^c	Producción champiñón	(Fan, Pandey, & Soccol, 1999b)
<i>P. tannophilus</i> ^c	Compuestos aromas	(Soares, Soccol, Pandey, & Christen, 1999)
<i>P. verrucosum</i> ^c	Degradación caféina	(Roussos, Hannibal, DelosAngeles-Aquiahuatl, Trejo-Hernandez, & Marakis, 1994)
<i>Pleurotus sp.</i> ^c	Producción champiñón	(Martinez & Quirarte, 1984)
<i>P. ostreatus</i> ^c	Producción champiñón	(Fan, Pandey, & Soccol, 1999a; Thielke, 1989)

Microorganismo	Propósito	Referencia
<i>P. ostreatus</i> ^b	Degradación de cafeína	(Fan, Pandey, Vandenberghe, & Soccol, 1999)
<i>Penicillium sp.</i> ^c	Producción pectinasa	(Boccas et al., 1994)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>UFLAYCN727</i> ^d	Producción aroma/sabor	(Reis-Evangelista et al., 2014)
<i>S. cerevisiae</i> UFLA YCN724 ^d	Producción aroma/sabor	(Reis-Evangelista et al., 2014)
<i>Candida parapsilosis</i> <i>UFLAYCN448</i> ^d	Producción aroma/sabor	(Reis-Evangelista et al., 2014)
<i>Pichia guilliermondii</i> UFLA <i>YCN731</i> ^d	Producción aroma/sabor	(Reis-Evangelista et al., 2014)
<i>Staphylococcus warneri</i> ^e	Producción sabor cítrico y herbáceo	(Reis-Evangelista, Ferreira-Silva, PedrozodaCruz-Miguel, M.G. deSouza-Cordeiro, Marques-Pinheiro, A.C. Ferreira-Duarte, & Freitas-Schwan, 2015)
<i>Erwinia persicina</i> ^e	Producción sabor cítrico y herbáceo	(Reis-Evangelista et al., 2015)
<i>Enterobacter asburiae</i> ^e	Producción sabor cítrico, herbáceo y nuez	(Reis-Evangelista et al., 2015)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ^e	Producción sabor cítrico, herbáceo y nuez	(Reis-Evangelista et al., 2015)

Microorganismo	Propósito	Referencia
<i>C. parapsilosis</i> UFLA YCN448 ^f	Producción sabor caramelo	(Evangelista et al., 2014)
<i>S. cerevisiae</i> UFLA YCN727 ^f	Producción sabor caramelo	(Evangelista et al., 2014)
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Producción y modulación de aroma	(L. W. Lee, Cheong, Curran, Yu, & Liu, 2016)

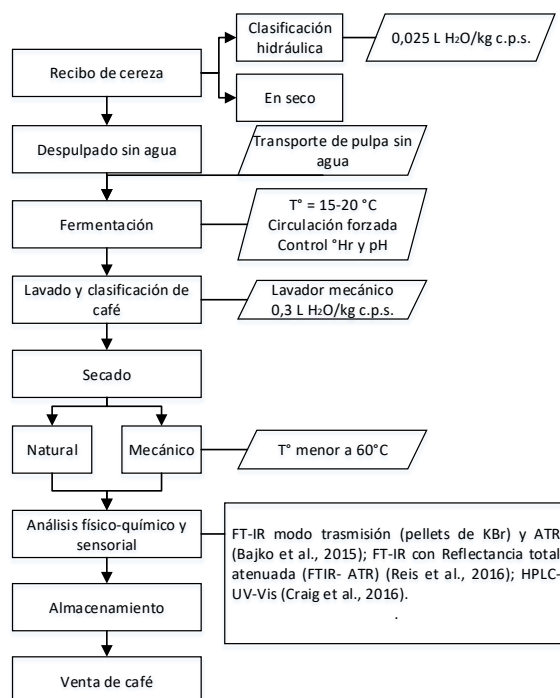
- a. Mutantes
- b. En extracto de cascarilla de café
- c. Pulpa
- d. Proceso fermentación en seco en café
- e. Proceso fermentación húmeda en café
- f. Proceso fermentación semi-seco en café

Fuente: adaptación (Pandey et al., 2000)

Es claro que el efecto de la interacción de diversos microorganismos con los diferentes componentes del fruto de café o procesos de fermentación, da como resultado aromas, sabores o la producción de compuestos útiles para otras industrias, de acuerdo a los reportes de los autores.

Las propuestas del proceso FES con las que se busca evaluar la conservación y producción de ácido 5-O-Cafeoilquínico se plantea en la Figura 7.

a)



b)

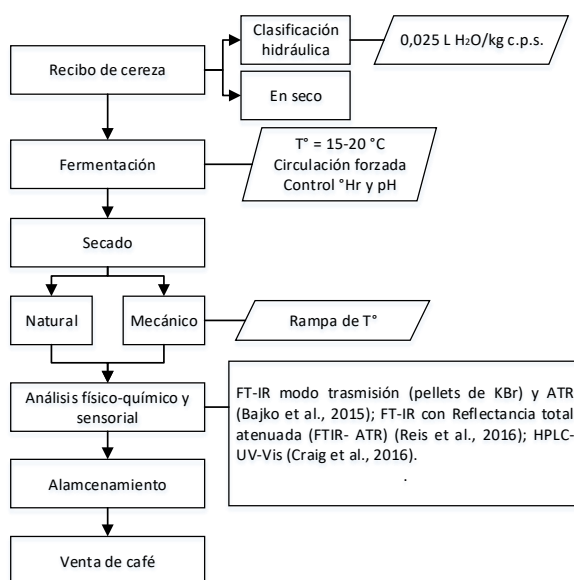


Figura 7. Procesos FES propuestos para evaluación de la conservación y producción de ácido 5-O-Cafeoilquínico. a) Proceso de beneficio propuesto con fermentación control de T°, °Hr y pH; b) Proceso de beneficio natural propuesto con control de T°, Hr° y pH.

En este tipo de fermentación de café puede ocurrir lo siguiente (Díaz & Fernández, 2011):

- Aumento de la población de microorganismos de forma exponencial, al multiplicarse en el mucilago.
- Consumo de dos terceras partes de los azúcares simples del mucilago por los microorganismos.
- Producción de ácido láctico, ácido acético y etanol (en una fermentación normal).
- Disminución del pH de 5.5 hasta cerca de 3.5 (aumenta la acidez) por la producción de estos ácidos orgánicos.
- Aumento de la temperatura de la masa.
- Ruptura de las células que unen al mucilago con el pergamino.

2.4 DESCOMPOSICIÓN DE ÁCIDOS CLOROGÉNICOS DURANTE EL PROCESO DE INDUSTRIALIZACIÓN

Todos los atributos que tenga un buen café son una suma de factores que van desde el manejo de una variedad durante la etapa de cultivo, pasando por la poscosecha (beneficio y secado), hasta la adecuada preparación de la bebida.

Las características organolépticas en las bebidas de café se deben a la interacción y transformación de los componentes presentes en el grano, entre estos, los ácidos clorogénicos (CGA), que aportan cuerpo y propiedades antioxidantes, como es el caso del isómero del ácido quínico, 5-O-cafeoliquínico (5-CQA) (Bajko et al., 2015). Los ácidos clorogénicos en el café, contribuyen al aroma, sabor y pigmentos en el producto (Rivera, J. A., & Díaz, 2009). Aunque los factores genéticos (especie y variedad), aspectos fisiológicos (grado de maduración), condiciones ambientales (clima, composición del suelo y prácticas agrícolas) tienen gran influencia en la composición de los ácidos clorogénicos del café verde (Farah & Donangelo, 2006).

En la etapa de poscosecha, los factores internos que influyen en la conservación del grano de café como semilla son la madurez del fruto y la viabilidad de la semilla. El estado o la viabilidad de la

semilla del café, se refiere a la conservación de las capacidades de esta para que ocurran las reacciones metabólicas asociadas a la germinación. Factores externos como la humedad, la temperatura y los gases, influyen en componentes importantes del metabolismo de la semilla, entre estos el agua para la reactivación del metabolismo y la difusión de los nutrientes dentro de la semilla, la temperatura para activar las enzimas que regulan la velocidad de las reacciones bioquímicas, y la disponibilidad de O₂ y CO₂ para que la semilla mantenga sus actividades metabólicas. Estos factores inciden en la generación y conservación de los compuestos de origen metabólico (Santamaria, García, & Roselló, 2003).

La concentración y composición final de estos compuestos fenólicos dependen fuertemente de las condiciones de procesamiento, encontrándose cambios en la composición en relación al calor al que es sometido el grano, al punto en el que se presenta un decremento significativo entre el 30 y el 70 % después del proceso de torrefacción y molienda del grano; incluso se descomponen hasta el 80% en el “tostado francés” (Rivera, 2013). Esto no significa que se pierda completamente el efecto antioxidante, ya que la gran mayoría de los ácidos clorogénicos se descomponen en más de 30 ácidos orgánicos con un potencial antioxidante menor (Toci & Farah, 2008). La Figura 8 muestra de manera esquemática la hidrólisis de los ácidos clorogénicos por el calor de la tostión del café.

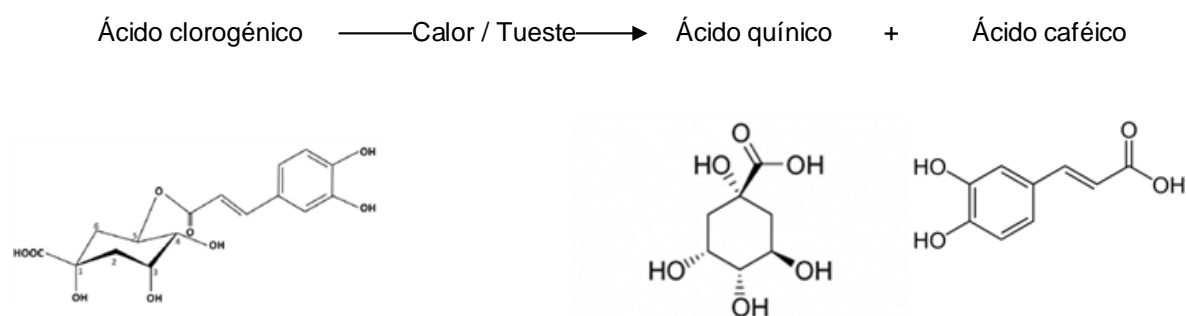


Figura 8. Hidrólisis de los ácidos clorogénicos en la tostión

Fuente: (Bajko et al., 2015; Rivera, 2013)

En cuanto a la variación en la concentración de los ácidos clorogénicos durante la postcosecha se encuentran reportes en los que el 5-O-CQA decrece en el almacenamiento probablemente por la actividad enzimática y no-enzimática y porque actúa como antioxidante minimizando la oxidación de proteínas y lípidos (Rendón, Garcia-Salva, & Bragagnolo, 2014; Rodrigues, Benassi, &

Bragagnolo, 2013), sin embargo se presume la degradación por posibles efectos de contaminación microbiana (Pandey et al., 2000).

Algunos microorganismos como *Bacillus coagulans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *Penicillium rouquifortii*, *Penicillium curtosum*, y *Pleurotus sp.*, han sido reportados con capacidad de degradación de cafeína y polifenoles. Las condiciones para el control de los mismos deben ser dadas para el proceso de fermentación en estado sólido, de tal manera que se pueda conservar los polifenoles durante el proceso (Pandey et al., 2000).

2.4.1 Análisis fisicoquímicos de ácidos clorogénicos.

Por su importancia biológica, se han empleado técnicas instrumentales químicas para detectar, identificar y cuantificar los CGA's como FT-IR, FT-IR ATR (N. Reis, Franca, & Oliveira, 2016), FT-Raman (El-Abassy, Donfack, & Materny, 2011), NIRS, HPLC (G. . Duarte, Pereira, & Farah, 2010; Regazzoni et al., 2016; Wianowska, Typek, & Dawidowicz, 2015), HPLC- UV (Craig, Fields, Liang, Kitts, & Erickson, 2016), entre otras, obteniendo datos más aproximados especialmente del 5-CQA para el análisis FT-IR, tanto el estándar puro como las muestras posteriores a la extracción, en el rango $4000-400\text{ cm}^{-1}$ con resolución espectral de 4 cm^{-1} y usando modo de transmisión (pellets de KBr) y ATR (Bajko et al., 2015). Otros estudios en FT-IR con Reflectancia total atenuada (FTIR- ATR) indicaron esta técnica como más apropiada, y en espectro total entre $4.000 - 700\text{ cm}^{-1}$, permitió un modelo más robusto para la discriminación e identificación de compuestos a través de lectura de rangos de longitud de onda de lípidos, ácidos clorogénicos, cafeína y polisacáridos (N. Reis et al., 2016).

En la cuantificación del ácido clorogénico en café verde, se plantea el siguiente protocolo (Craig et al., 2016):

- Reducir el tamaño de partícula del café verde mediante método mecánico a temperatura lo más cercana a la ambiental y ponerlo en una solución con etanol al 70% (V/V) (50 mL) y agitada por 24 h. Las muestras pueden ser tratadas por el método de Ultra alta presión y puede ser

realizado para la preparación de las muestras pulpa seca, cascarilla y café tostado (Hu et al., 2015).

- Para la preparación de muestras HPLC-UV-Vis, se usa como diluyente el ácido fórmico al 2,0% en Acetonitrilo ACN al 10% (aq) preparado por mezcla de aforo de 50 mL de ACN, 10 mL de ácido fórmico y 440 mL de agua Milli-Q. La fase móvil A esta compuesta por 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) en agua, preparada por adición de 1 mL de TFA a ~ 900 mL de agua Milli-Q en un frasco volumétrico de 1000 mL bien agitado. El frasco se lleva a volumen con agua Milli-Q y se transfiere al contenedor de la fase móvil.
- Para las curvas de calibración se prepara el estándar con un peso de 5 mg de estándar en un frasco volumétrico de 10 mL adicionando 10 mL de diluyente, mezclando la solución y llevando a viales para el análisis. Las muestras de café verde son preparadas con 250 mg del extracto en 50 mL en frasco volumétrico y adicionando 40 mL de diluyente. Las soluciones son sonicadas por 10 minutos y enfriadas a temperatura ambiente y llevándolas a volumen con agua Milli-Q mezclándolas bien. Alicuotas de la solución son filtradas usando filtros de poro 0,45 μm . Los filtrados son llevados a viales HPLC para el análisis.
- Se realiza el análisis en HPLC. El sistema estará equipado con columna C18 y detector UV-Vis. La temperatura es mantenida a 25°C. La fase móvil A es 0.1 % de TFA en agua a fase móvil B es ACN. El volumen de inyección de la muestra es de 3 μL y el flujo se establece en 1,5 mL/min. El gradiente de elución se establece según la Tabla 12. El detector se establece a 330 nm.

Tabla 12. Gradiente de elución para análisis HPLC.

Gradiente General		
Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	95	5
10	80	20
12	80	20

Gradiente General

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
15	95	5
15.1	5	95
16.5	5	95
16.6	95	5
19	95	5

Fuente: (Craig et al., 2016)

A: la fase móvil A es ácido trifluoroacético (TFA) en agua.

B: la fase móvil B es Acetonitrilo (ACN).

CAPÍTULO 3

TERMODINÁMICA DE LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

De acuerdo con Sermanni y Tiso, (2008), los parámetros que afectan un bioproceso como la fermentación en estado sólido son: actividad del agua y contenido de humedad del sustrato, temperatura y calor transferido, pH, aireación, difusión de nutrientes, mezclado, condiciones asépticas, tamaño de partícula-densidad, propiedades físico-mecánicas de la matriz sólida, inóculo microbiológico, uniformidad de la biomasa y morfología de los microorganismos. Todos estos parámetros se encuentran interconectados, sin embargo algunos toman mayor importancia en el desarrollo de un nuevo bioproceso, particularmente en términos del producto a obtener y los aspectos económicos del proceso.

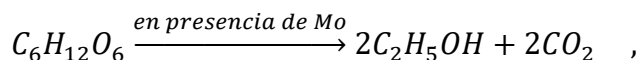
En relación a los principales parámetros en fermentación en estado sólido en café, a continuación tratarán algunos modelos que pueden ser empleados para controlarlos de acuerdo a la naturaleza de este proyecto.

3.1 MODELOS TERMODINÁMICOS APLICADOS A BIOPROCESOS

A continuación se plantearán las ecuaciones de balance de masa y energía a tener en cuenta en la termodinámica aplicada a la FES y se plantean algunos modelos que pueden ser útiles para el diseño y control de procesos FES.

3.1.1 Balance de masa general

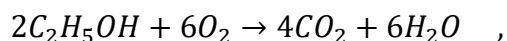
El balance de materia aplicado a un proceso de fermentación en estado sólido, puede ser postulado de manera general, tomando como referencia la fermentación con producción de alcohol:



Ecuación (12)

Fuente: (Sidney, n.d.)

En presencia de oxígeno, la reacción de formación se plantea de la siguiente manera:



Ecuación (13)

Fuente: (Sidney, n.d.)

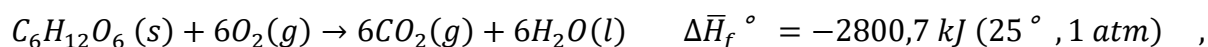
Ambas reacciones producen un calor de reacción equivalente al calor metabólico de la fermentación, o entalpía de formación $\Delta \bar{H}^\circ$ (kJ mol⁻¹). La entalpía de formación será calculada así:

$$\Delta \bar{H}^\circ_{rxn} = \sum n \Delta \bar{H}^\circ_{\text{productos}} - \sum n \Delta \bar{H}^\circ_{\text{reactivos}} \quad ,$$

Ecuación (14)

Fuente: (Sidney, n.d.)

La suma de las entalpías de formación en el ejemplo de las reacciones de fermentación con producción de etanol, como un proceso en dos fases y enunciado en las Ecuaciones (12) y (13), puede verse de manera general como en la fermentación aeróbica de la glucosa así:



Ecuación (15)

Fuente: (ChemPRIME, 2010).

Para el cálculo del calor de reacción, se toman las entalpías de formación $\Delta\dot{H}_f^\circ$ (25°C, 1 atm) (ChemPRIME, 2010; Sidney, n.d.):

$$\Delta\dot{H}_f^\circ \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6(\text{s}) = -1273,3 \text{ kJ mol}^{-1}$$

$$\Delta\dot{H}_f^\circ \text{CO}_2(\text{g}) = -393,5 \text{ kJ mol}^{-1}$$

$$\Delta\dot{H}_f^\circ \text{H}_2\text{O}(\text{l}) = -285,5 \text{ kJ mol}^{-1}$$

$$\Delta\dot{H}_f^\circ \text{O}_2(\text{g}) = 0 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ por definición}$$

Una vez conocida la masa de sustrato que se lleve a FES serían medidos por un método que se establecerá posteriormente la masa de etanol y CO₂ producidos, y O₂ consumido como indicador de eficiencia de la fermentación.

3.1.2 Balance de energía

El balance general de energía para una fermentación en estado sólido, en este caso para el café, se realiza teniendo en cuenta los siguientes mecanismos:

- El calor involucrado que se disipa como calor transferido del sustrato sólido al aire que fluye a través de la cama: se consideran las condiciones del aire como la humedad, temperatura y flujo.
- Calor trasferido de la pared del reactor a los alrededores del reactor: involucra el coeficiente de transferencia de calor a través de la pared del fermentador y el gradiente de temperatura entre el sistema y los alrededores.
- Calor metabólico producido durante la fermentación.

$$E_{\text{entrada}} + E_{\text{metabólica}} = E_{\text{salida}} + E_{\text{alrededores}} \quad ,$$

Ecuación (16)

donde:

E entrada: energía del aire de entrada (kcal/h).

E metabólica: energía liberada por el metabolismo microbial (kcal/h).

E salida: energía del aire a la salida (kcal/h).

E alrededores: energía perdida en los alrededores a través de la pared del fermentador (kcal/h).

Se estima la energía a la entrada y la salida con la entalpia del aire ($\Delta\bar{H}^\circ$) definida como:

$$\Delta\bar{H}^\circ_{\text{aire a determinada humedad}} = C_{p_{\text{aire a determinada humedad}}}T + \lambda H \quad ,$$

$$\Delta\bar{H}^\circ_{\text{aire húmedo}} = (0,24 + 0,45H)T + \lambda H \quad ,$$

Ecuación (17)

Fuente: (Pandey et al., 2008)

donde:

$\Delta\bar{H}^\circ_{\text{aire}}$ = entalpia de aire húmedo (kJ/kg aire seco).

H = humedad absoluta del aire (kg agua/kg aire seco).

λ = calor latente de vaporización del agua (kJ/kg agua).

C_p = calor específico del aire a una condición de humedad determinada (kJ/kg °C)

Calor específico promedio del aire = 0,24 kJ/kg°C

Calor específico promedio de vapor de agua = 0,45 kJ/kg°C

La energía perdida en los alrededores se calcula según la siguiente ecuación:

$$E_{\text{alrededor}} = hA(T_{\text{salida}} - T_{\text{alrededores}}) \quad ,$$

Ecuación (18)

Fuente: (Pandey et al., 2008)

donde:

h: coeficiente de transferencia de calor de la pared del fermentador (kcal/m²h°C)

A: área de la superficie de la pared del fermentador (m^2)

T salida: temperatura del aire de salida ($^{\circ}C$)

T alrededores: temperatura del aire de entrada ($^{\circ}C$)

Al sustituir la ecuación (17) y (18) en (16), reordenando y considerando $E_{metabólica}$ o calor de reacción como Q_m , la ecuación se reduce a:

$$W_g = \frac{Q_m - hA(T_{sal} - T_{ent})}{0,24 (T_{sal} - T_{ent}) + 0,45(T_{sal}H_{sal} - T_{ent}H_{ent}) + \lambda (H_{sal} - H_{ent})} ,$$

Ecuación (19)

Fuente: (Pandey et al., 2008)

En la

Ecuación (19) se consideró que la temperatura del aire de entrada es igual a la de los alrededores del fermentador y que la W_g fue la velocidad de la masa de aire seco (kg aire seco /h). En esta misma ecuación, el término $0,45 (T_{sal}H_{sal} - T_{ent}H_{ent})$, corresponde a la producción del agua metabólica que podría ser tenida en cuenta, sin embargo queda simplificada de la siguiente forma:

$$W_g = \frac{Q_m - hA(T_{sal} - T_{ent})}{0,24 (T_{sal} - T_{ent}) + \lambda (H_{sal} - H_{ent})} ,$$

Ecuación (20)

Fuente: (Pandey et al., 2008)

Ashok Pandey et al., (2008) relaciona el término Q_m con la velocidad de síntesis de biomasa (R_b). Con respecto a la valoración de la síntesis de biomasa para un proceso en particular, se requiere el modelo que describa dicha síntesis.

3.1.3 Modelos de cinética de crecimiento empíricos

Varios modelos han sido reportados para caracterizar el comportamiento en estado sólido y entre estos un modelo básico que describe la fase de crecimiento exponencial; puede ser postulado como:

$$X = X_o e^{\mu t} \quad ,$$

Ecuación (21)

donde:

X: masa de células producida a un tiempo particular (kg)

X_o: masa de células inicial (kg)

μ: velocidad de crecimiento específico en la fase exponencial (h⁻¹)

t: tiempo (h)

por lo tanto:

$$R_b = \frac{dX}{dt} = \mu X_o e^{\mu t} \quad ,$$

Ecuación (22)

Relacionando las ecuaciones (22) y (20) se obtiene:

$$W_g = \frac{\frac{Q_o}{12} \left(\frac{1-\eta}{\eta} \right) \sigma_b \gamma_b \mu X_o e^{\mu t} - hA(T_{sal} - T_{ent})}{\lambda (H_{sal} - H_{ent}) + 0.24(T_{sal} - T_{ent})} \quad ,$$

Ecuación (23)

Fuente: (Pandey et al., 2008)

Los términos en la Ecuación (23) propuesta por A. Pandey et al., 2008, que corresponderían a Q_m y que se relacionan con la velocidad de síntesis de biomasa R_b, están relacionados con el calor generado por la reacción y consumo del sustrato por parte de los microorganismos (Mazaheri &

Shojaosadati, 2013). Los investigadores no describen los coeficientes de la ecuación que acompañan a R_b , sin embargo especifican que la ecuación de crecimiento está escrita para la fase exponencial, y que los cambios deben ser planteados para las otras fases del crecimiento de microorganismos. También consideran la velocidad de crecimiento específico (μ) como una función de la demanda y calidad de aire, y que ambos actúan como factores regulantes.

Uno de los modelos ampliamente utilizado en la fermentación en estado sólido es el modelo logístico. Este modelo empírico se utiliza con más frecuencia que otros modelos empíricos para estudiar la cinética de crecimiento de FES (Mazaheri & Shojaosadati, 2013). El modelo logístico representa los límites de crecimiento y no requiere las relaciones fenómenos de transporte (Mitchell, Krieger, Stuart, & Pandey, 2000), y se basa en el hecho de que el área de superficie disponible está limitada en el proceso de FES y la tasa de crecimiento de la biomasa depende de la biomasa máxima, X_m (Mitchell, von Meien, Krieger, & Dalsenter, 2004). Este modelo también asume que la velocidad de crecimiento específico (μ_m) durante la fase inicial logarítmica, no depende de la concentración del sustrato.

La ecuación diferenciada e integrada del modelo logístico se expresa como:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m X \left(1 - \frac{X}{X_m}\right) ,$$

Ecuación (24)

$$X = \frac{X_m}{1 + \left(\left(\frac{X_m}{X_0}\right) - 1\right) e^{-\mu t}} ,$$

Ecuación (25)

Fuente: (Mazaheri & Shojaosadati, 2013)

donde X_0 es la biomasa de microorganismos inicial.

Los tres parámetros del modelo logístico, X_0 , X_m y μ_m pueden tener dependencia de la temperatura. La cantidad de inóculo al comienzo de la fermentación X_0 es no dependiente de la temperatura, pero en la fase lag pasa a ser dependiente de la temperatura.

Los modelos de cinética de crecimiento pueden ser usados para desarrollar un modelo de biorreactor, con el objeto de describir las condiciones ambientales como temperatura y humedad, en función del tiempo, y predecir los cambios en el comportamiento de los microorganismos en esas condiciones. Como consecuencia del calor generado por la respiración de los microorganismos, existe un gradiente de temperatura que no es fácilmente removible del fermentador. En algunas ocasiones se puede emplear agitación aunque no es lo más conveniente, por lo que se prefiere emplear la circulación forzada de aire o aireación a determinadas condiciones de humedad. Este proceso puede ocasionar pérdidas de humedad, lo que afecta el proceso de fermentación (Mazaheri & Shojaosadati, 2013).

Algunas ecuaciones que describen el efecto de la temperatura en X_m y μ_m en el modelo logístico se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13. Ecuaciones que describen el efecto de la temperatura en X_m y μ_m en el modelo logístico.

Modelo	Equación	Definición de parámetros	Referencia
Essener	$\mu_{max}(T) = \frac{A \exp\left(-\frac{\Delta H_1}{RT}\right)}{1 + k \exp\left(-\frac{\Delta H_2}{RT}\right)}$	μ_m : velocidad máxima de crecimiento; A, k: constantes; ΔH_1 =reacción límite de entalpia de activación; ΔH_2 =reacción de inactivación de cambio de entalpia; R=constante universal de los gases.	(a) (b) (c)
Arrhenius	$\mu_{max}(T) = K_g^0 \exp\left(\frac{-E_g}{RT}\right) - K_g \left(\frac{-E_g}{RT}\right)$	k_g^0 :constante; E_g :energía de activación de crecimiento; E_d :energía	(d) (e)

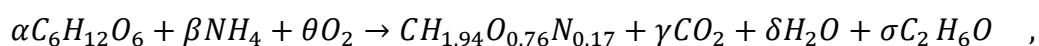
Modelo	Equación	Definición de parámetros	Referencia
		de desactivación térmica.	
Polinomiales	$\mu_{max}(T) = -S_0 + S_1T - S_2T^2 + S_3T^3 - S_4T^4 + S_5T^5$ $\mu_{max}(T) = -b_0 + b_1T - b_2T^2$	s_0, \dots, s_5 : constantes; b_0, b_1, b_2 : constantes.	(a) (f)
Ratkowsky	$\mu_{max}(T) = b(T - T_{min})[1 - \exp(c(T - T_{max}))]^2$	T_{min} : temperatura de crecimiento mínimo; T_{max} : temperatura de crecimiento máximo; b, c : constantes.	(g) (h)
Polinomial	$X_m(T) = -C_0 + C_1T - C_2T^2 + C_3T^3 - C_4T^4$	c_0, \dots, c_4 : constantes.	(a)
Saucedo-Castaneda	$\mu = \frac{2,964 * 10^{11} \exp\left(\frac{-70225}{RT}\right)}{1 + 1,3 * \exp\left(\frac{-283356}{RT}\right)}$ $X_m = -127,08 + 7,95(T - 273) - 0,016(T - 273)^2 + 4,03 * 10^{-3}(T - 273)^3 + 4,73 * 10^{-5}(T - 273)^4$		(a)

Fuente: (Mazaheri & Shojaosadati, 2013).

- (a) (Saucedo-Castaneda, Gutierrez-Rojas, Bacquet, Raimbault, & Viniegra-Gonzalez, 1990).
- (b) (Esener, Roels, & Kossen, 1981).
- (c) (Mitchell & von Meien, 2000)
- (d) (Szewczyk & Myszka, 1994)
- (e) (Ikasari, Mitchell, & Stuart, 1999)
- (f) (Rajagopalan & Modak, 1995)
- (g) (Ratkowsky, Lowry, McMeekin, Stokes, & Chandler, 1983)
- (h) (Weber, Oostra, Tramper, & Rinzema, 2002)

3.1.4 Modelos de ruta metabólica

Autores como Mazutti et al, (2010), reportaron uno de los primeros estudios de fermentación en estado sólido, usando modelo de ruta metabólica y basado en modelo de redes neuronales. Con este modelo se buscó predecir las velocidades de crecimiento microbial en función del tiempo de fermentación, concentración de azúcares reductores iniciales totales, y temperaturas de entrada y salida del fermentador. Los autores consideraron una estequiometría general para el crecimiento microbial aerobio con formación de etanol, de la siguiente forma:



Ecuación (26)

Fuente: (Mazutti et al., 2010)

donde α , β , θ , δ y σ son coeficientes estequiométricos sobre la base de las moles de carbono (C) de biomasa. Los balances de C, H, O y N, las mediciones experimentales de CO_2 y de los azúcares reductores totales se harían con estos coeficientes. En esta estequiometría el metabolismo de una levadura fue considerado aerobio y fue asumido que el oxígeno no es limitado dentro del reactor. Las mediciones de CO_2 en el flujo de salida de aire del biorreactor, el agua metabólica total y el etanol producido en el biorreactor serían calculadas de acuerdo a la estequiometría planteada en la Ecuación (26).

Mazutti et al., utilizó la Ecuación (27) para calcular el crecimiento microbial expresado en términos de la células considerando la velocidad de toma de oxígeno.

$$X_n = \frac{Y_{x/o} \Delta t \left[\frac{1}{2} \left(\frac{dO_2}{dt_{t=0}} + \frac{dO_2}{dt_{t=n}} \right) + \sum_{i=1}^n \frac{dO_2}{dt_{t=i}} \right] + \left(1 - \frac{a}{2} \right) X_0 - a \sum_{i=1}^{n-1} X_i}{1 + \frac{a}{2}},$$

Ecuación (27)

Fuente: (Brand et al., 2001)

donde:

α : $m \cdot Y_{x/o} \cdot \Delta t$

Este modelo basado en redes neuronales puede correlacionar velocidades de metabolismo complejo involucradas en la FES, además de encontrar que los métodos de redes neuronales son aceptados como métodos de modelado para aplicaciones científicas e industriales (J. C. Oviedo et al., 2014).

3.1.5 Modelo de formación de producto

El crecimiento de los microorganismos va acompañado por el consumo de oxígeno, nutrientes y la producción de calor metabólico agua, CO₂ y otros productos. Los modelos para la formación de producto son esenciales para la optimización y escalado de los procesos FES, debido a la dificultades en la separación de los productos formados del medio.

La ecuación general que relaciona el cambio en la biomasa (X) con el cambio en un producto (P) es:

$$\frac{dP}{dt} = Y_{PX} \frac{dX}{dt} + m_p X,$$

Ecuación (28)

Fuente: (Mitchell, von Meien, Krieger, & FDH., 2004)

donde:

Y_{px} : coeficiente estequiométrico

m_p : coeficiente de mantenimiento.

Cuando el producto es un metabolito secundario, la biomasa activa y el sustrato limitante pueden ser descritos por las ecuaciones desarrolladas por Gelmi et al., (2002). En este caso, el modelo logístico no puede ser usado porque no predice completamente el comportamiento del microorganismo durante la fase de muerte. Entre los modelos de formación de producto se pueden encontrar el desarrollado por Gelmi et al., que expresa el crecimiento del hongo *Gibberella fujikuroi* y la producción de ácido giberélico en FES bajo condiciones de nitrógeno limitado (Gelmi, Pérez-Correa, & Agosin, 2002).

Otro modelo es el desarrollado por Hashemi et al., (2011), que aproxima el modelo a las diferentes fases de la curva de crecimiento de bacterial y la producción de α -amylase por *Bacillus sp.* en un proceso FES. Este modelo asume que los cambios en peso medio fermentado seco total (W) corresponde a la velocidad de consumo de sustrato (dS/dt), la velocidad de crecimiento de la biomasa (dB/dt) y a la velocidad de formación (dP/dt) (Hashemi, Mousavi, Razavi, & Shojaosadati, 2011). Hashemi et al, usa la ecuación de Luedeking-Piret para la cinética de producción de α -amilasa (Luedeking & Piret, 2000).

El desarrollo de modelos en fermentación en estado sólido está basado en los principales problemas: la cinética de la actividad microbial, estudio de los problemas de transferencia de calor y masa de los sistemas sólidos, conexión entre los sistemas anteriores, los productos de formación y la selección del mejor tipo de fermentador (Singhania et al., 2009).

3.2 CLASES DE BIORREACTORES FES

Un biorreactor es el equipo en que se desarrolla el bioproceso. Los biorreactores tienen acoplados los elementos que son necesarios para realizar el cultivo de los microorganismos, tales como mezclado, control de temperatura, suministro de oxígeno, entradas para adición de nutrientes, control del pH, entre otros (Ruiz et al., 2007)

3.2.1 Clasificación de los biorreactores en FES

Duran (Durand, 2003), clasificó los biorreactores para FES en dos categorías: (i) a escala de laboratorio, empleado sustrato de gramos hasta unos pocos kilogramos, (ii) piloto y a escala industrial, que va desde varios kilogramos a toneladas. La primera categoría incluye varios diseños más o menos sofisticados, mientras que la segunda categoría, es empleada por el sector industrial, es menos variada.

Mitchell y colaboradores (Mitchell, D. Krieger, N. Berovic, M, 2006), hacen una clasificación más específica de los biorreactores, donde la división se lleva a cabo por grupos de acuerdo al funcionamiento del mismo y a su configuración:

3.2.1.1 Grupo I.

Por lo general el sustrato es estático, o el mezclado no es frecuente, y la circulación del aire se da alrededor del sustrato, sin ser forzado a través de él. Ejemplo de este grupo son los biorreactores de bandeja; la Figura 9 (a) muestra un biorreactor de bandejas.

3.2.1.2 Grupo II.

En este grupo de biorreactores el lecho o sustrato es estático o con movimiento infrecuente (por ejemplo una vez al día). Pertenecen a este grupo, los biorreactores de lecho empacado. Constan de una columna cilíndrica o de sección transversal rectangular, la cual está orientada verticalmente, con una placa base perforada en su parte inferior, la cual es compatible con una cama de sustrato. El aire entra a través de la placa base. Ver la Figura 9 (b).

3.2.1.3 Grupo III.

En este tipo de biorreactores, el sustrato tiene una mezcla intermitente de minutos a horas. El aire se distribuye a través del sustrato. Ejemplos de este son los biorreactores de tambor con agitadores y los biorreactores con tambor giratorio. Ver la Figurar 9 (c).

3.2.1.4 Grupo IV.

En este grupo están los biorreactores en los que el sustrato es agitado y el aire es expulsado con fuerza a través del mismo. Este grupo se puede subdividir en los biorreactores de agitación continua (IVa), y los de agitación intermitentemente con intervalos de minutos a horas entre la mezcla (IVb). Ver la Figura 9 (d).

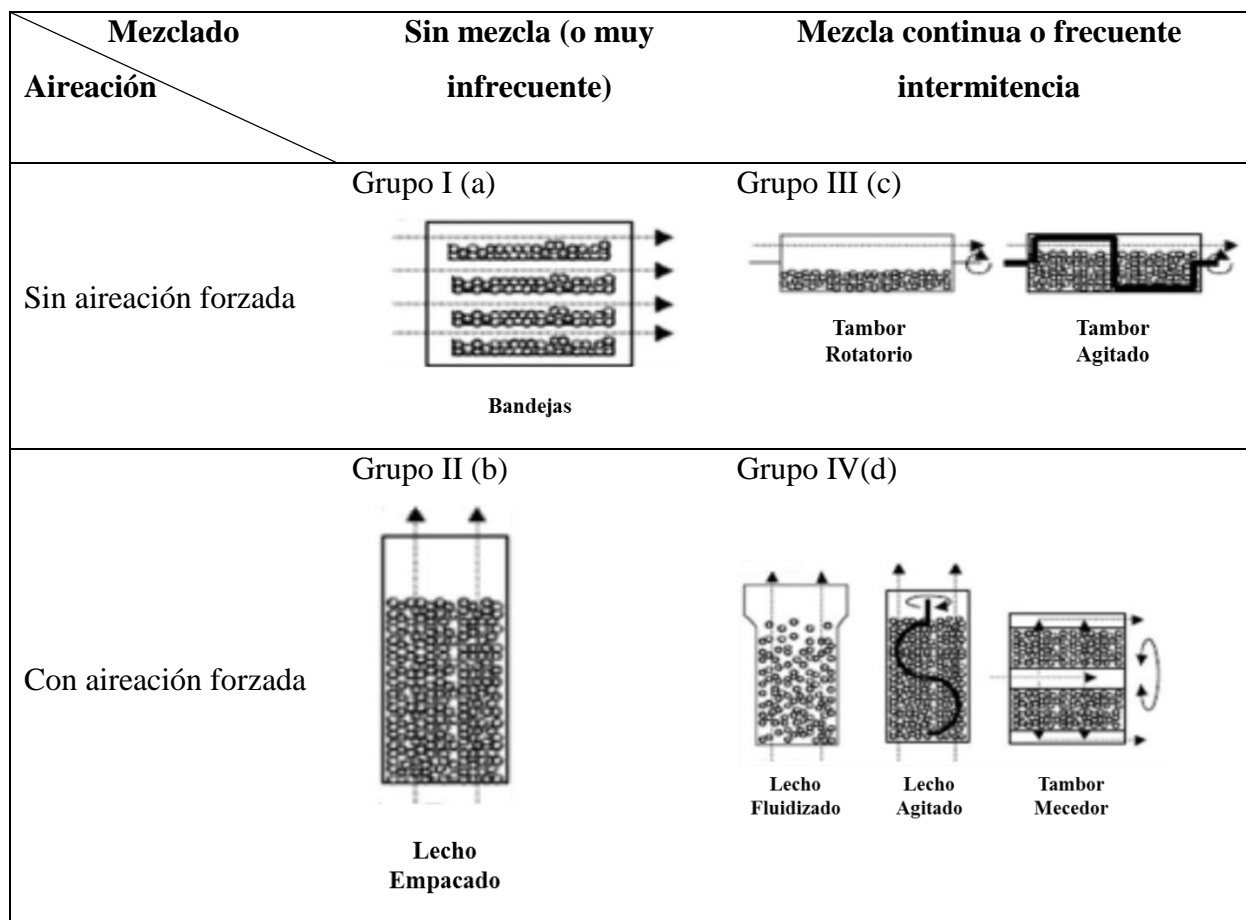


Figura 9. Clasificación de los bioreactores en FES. Fuente: tomado de (J. Oviedo, 2014), modificado de (Mitchell, D. Krieger, N. Berovic, M, 2006)

Como retos en el escalamiento de biorreactores están el proporcionar adecuada transferencia de calor y masa dentro del lecho de sustrato, monitorear en línea varios parámetros de los procesos clave y mezclar adecuadamente el lecho del sustrato sin dañar los microorganismos, así como las partículas de sustrato (Khanahmadia, Mitchell, Beheshtic, Roostaazadc, & Sánchezd, 2006).

La generación de calor debido a las actividades metabólicas de los microorganismos, es deseable en el compostaje pero no deseable para procesos biotecnológicos porque una gran parte de los enzimas producidos durante la fermentación se puede desnaturalizaron por calor al final del proceso (Muller dos Santos, Souza das Rosa, Dal'Boit, Mitchell, & Krieger, 2004). Como resultados se presenta un alto porcentaje de humedad lo cual resulta en una baja porosidad del sustrato e impide la penetración de oxígeno, mientras que un bajo contenido de humedad puede

conducir a una mala accesibilidad de nutrientes que obstaculiza el crecimiento microbiano (Pandey, 2003). Para el caso de la FES en café, se buscará adaptaciones a los grupos II y IV de clasificación realizada por Mitchell y colaboradores, con algunas adaptaciones que permitan la aireación o incluso agitación en algún momento del proceso, de acuerdo a la naturaleza del sustrato.

Aunque la FES ha sido utilizada industrialmente desde hace siglos, los biorreactores instrumentados todavía no están bien establecidos, y se encuentran publicaciones recientes que investigan el uso de varias configuraciones de biorreactores (Castro, Castilho, & Freire, 2015), como de lecho fijo (Rodríguez-Dúran, Contreras-Esquivel, Rodríguez, Prado-Barragán, & Aguilar, 2011; Silveira, Mazutti, & Salau, 2014), bandejas aireadas (Figuerola-Montero et al., 2011), tambores rotativos (Thomas, Larroche, & Pandey, 2013), así como diferentes modos de funcionamiento, por ejemplo, por lotes (Rodríguez-Zúniga, Couri, Neto, Crestana, & Farinas, 2013), lotes alimentados (Astolfi et al., 2011) y continuos (van de Lagemaat & Pyle, 2004), y estrategias de mezcla, por ejemplo mezcla intermitente (Flodman & Nouredini, 2013). En la Figura 10 se presentan el esquema de algunos biorreactores empleados en FES.

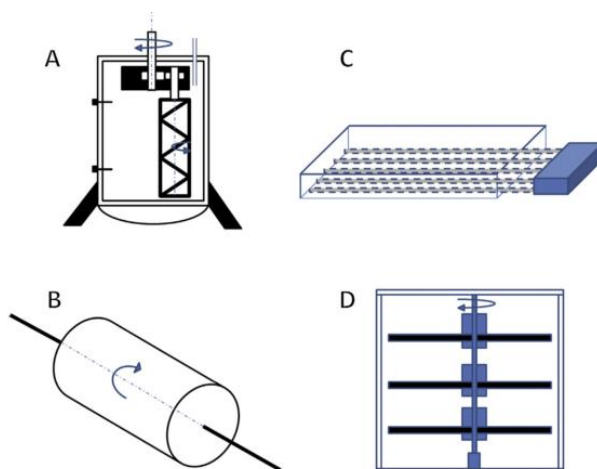


Figura 10. Biorreactores para FES. (A) reactor tambor de pie, diseñado por Lyven, incluye control de temperatura, entrada de sustrato, y la agitación. (B) reactor de rotación de tambor. (C) reactor de lecho empacado y entrada de aire suministrado desde la parte inferior de la bandeja. (D) reactor de bandeja múltiple, con rotación.

Fuente: (Hansen, Lübeck, Frisvad, Lübeck, & Andersen, 2015)

CONCLUSIONES

- Existe interés económico y potencial en la investigación sobre los compuestos de interés biológico como los ácidos clorogénicos, especialmente sobre el compuesto 5-O-Cafeoilquínico, por su efecto biológico en el cuerpo humano como antioxidante y efecto neuroprotector, entre otros efectos que continúan en estudio. La ventaja que presenta el grano de café en cuanto a su composición permite incluirlo como una fuente importante de este antioxidante, y llevarlo al consumidor a través de los diferentes tipos de preparación de la bebida o infusión de café, como método eficiente para ser ingerido por el ser humano.
- El Beneficio del Café se plantea como una actividad de alta importancia que representa uno de los primeros procesos para conservar y potenciar en el grano los compuestos antioxidantes como son los ácidos clorogénicos. El control en etapas como la fermentación y en especial aquella tipo FES, muestran el potencial efecto sobre la conservación y dan indicios del posible incremento de estos compuestos en el grano.
- Existe un gran interés en el proceso FES, debido a que el proceso es generalmente más económico en recursos, por ejemplo el sustrato es el mismo fruto o la pulpa, y presentando así una productividad más alta que las fermentaciones sumergidas. Este tipo de fermentación emerge como una alternativa atractiva para la obtención de compuestos fenólicos con efectos antioxidantes. En el caso de un proceso FES en café, puede resultar más interesante incorporar al grano los componentes de interés a través de una hidrólisis por vía enzimática. De esta manera no solo se lograría mejorar la calidad para alcanzar mejores precios del café en el mercado, sino que se puede llegar a incrementar el valor nutricional de una bebida que es ampliamente consumida en el mundo.
- De acuerdo a la revisión bibliográfica realizada en para la construcción de este documento, los problemas de transferencia de calor en las FES pueden ser mitigados con la incorporación de aire húmedo en el sistema y mejoras en los diseños de los fermentadores. Se recomienda el control de la temperatura del sistema con aire a condiciones de humedad y temperatura apropiadas, según la naturaleza del sustrato, los productos de interés y los microorganismos involucrados.

- El embrión del café está desempeñando un rol de importancia en los procesos metabólicos en el fruto y en la semilla. Es posible que durante el proceso FES, el embrión con toda la información genética de planta en potencia o alguna célula específica con características de totipotencialidad, pueda estar activando los metabolitos primario y secundario mediante la expresión de enzimas involucradas en la formación de nuevos compuestos, entre estos los ácidos clorogénicos. La función del embrión durante todo el proceso de beneficio del café, así como en el almacenamiento, continúa siendo objeto de estudio.

RECOMENDACIONES

Los retos encontradas por los distintos investigadores en el proceso FES para el beneficio de café, se relacionan con las limitaciones en la transferencia de calor y masa, la estimación de la biomasa microbial y la extracción de compuestos de interés del sustrato sólido. Esto indica que se requieren más investigaciones en la cinética de crecimiento de los microorganismos y de formación de producto, el modelo matemático de la transferencia de masa y calor en la FES de acuerdo al objetivo del proceso, la medición del contenido de biomasa, sustrato y la concentración de los metabolitos producidos y otros parámetros según la finalidad del proceso.

Para llevar la investigación a escala piloto, se requiere modelos de formación de producto que obtienen a escala de laboratorio. Aunque algunos investigadores han incluido la producción de un metabolito específico en FES, no se ha incluido la velocidad de formación del producto, lo cual es requerido para establecer la eficiencia de los recursos en el proceso.

Otro aspecto a considerar sobre la producción de metabolitos secundarios a través de FES son los altos costos de los métodos de extracción actuales, que llevan a plantear en su lugar, la incorporación de estos en el café y la pulpa. De la misma manera deben ser considerados los métodos de extracción para medir las eficiencias del proceso, ya que estos continúan siendo mejorados para determinar las composiciones más aproximadas de metabolitos incluidos en el grano.

Es conveniente hacer seguimiento a los estudios sobre la ruta metabólica de generación de los ácidos clorogénicos en el café y el rol que desempeña el embrión en los procesos bioquímicos durante las etapas de fermentación y almacenamiento (maduración) de la semilla. Es claro que siendo el embrión una planta en potencia con todo el material genético, puede ser esta parte de la semilla o una célula específica, la que esté activando todo el mecanismo del metabolismo secundario para la expresión de enzimas que están involucradas en la producción de antioxidantes.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M., & Dougan, J. (1987). Waste products. In C. R.J. & M. R. (Eds.), *Coffee technology* (pp. 257–89). London & New York: Elsevier Applied Science Publishers Ltd.
- Aguilar, C. N., Aguilera-Carbo A., Robledo, A., Ventura, J., Belmares, R., Martinez, D., Rodríguez-Herrera, R., & Contreras-Esquivel, J. (2008). Production of Antioxidant Nutraceuticals by Solid-State Cultures of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel and Creosote Bush (*Larrea tridentata*) Leaves. *Food Technology and Biotechnology*, *46*, 218–222.
- Allred, K. F., Yackley, K. M., Vanamala, J., & Allred, C. D. (2009). Trigonelline is a novel phytoestrogen in coffee seeds. *J. Nutr.*, *139*, 1833–1838.
- Anacafé. (2013). *Variedades de café*. Retrieved from https://www.anacafe.org/glifos/index.php/Variedades_de_cafe
- Antier, P., Minijares, A., Roussos, S., Raimbault, M., & Gonzalez, G. V.-. (1993). No Title. *Biotechnol. Adv.*, *11*, 429–440.
- Antonio, A. G., Iório, N. L. P., Pierro, V. S. S., Candreva, M. S., Farah, A., N., dos S. K. R., & Maia, L. C. (2011). Inhibitory properties of *Coffea canephora* extract against oral bacteria and its effect on demineralisation of deciduous teeth. *Arch. Oral Biol.*, *56*(6), 556–564.
- Antonio, A. G., Moraes, R. S., Perrone, D., Maia, L. C., Santos, K. R. N., Lório, N. L. P., & Farah, A. (2010). Species, roasting degree and decaffeination influence the antibacterial activity of coffee against *Streptococcus mutans*. *Food Chem.*, *118*, 782–788.
- Arias, M.; Ruiz C., A. A. (2001). Fermentación alcohólica de mucílago de café con levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Ciencia Y Tecnología de Alimentos*, *11*(1), 66–74.
- Astolfi, V., Joris, J., Verlindo, R., Oliveira, J. V., Maugeri, F., Mazutti, M. A., ... Treichel, H. (2011). Operation of a fixed-bed bioreactor in batch and fed-batch modes for production of inulinase by solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, *58–59*, 39–49.
- Avallone, S.; Guyot, B.; Brillouet, J.M.; Olguin P., E.; Guiraud, J. P. (2001). Microbiological and

biochemical study of coffee fermentation. *Current Microbiology*, 42, 252–256.

Aycheh, H. (2008). *Image analysis for Ethiopian coffee classification*. Addis Ababa University School of Graduate Studies. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.200490137/abstract>

Baeza, G., Amigo-Benavent, M., Sarriá, B., Goya, L., Mateos, R., & Bravo, L. (2014). Green coffee hydroxycinnamic acids but not caffeine protect human HepG2 cells against oxidativestress. *FoodRes, Int.*62, 1038–1046.

Bajko, E., Kalinowska, M., Borowski, P., Siergiejczyk, L., & Lewandowski, W. (2015). 5-O-Caffeoylquinic acid: a spectroscopic study and biological screening for antimicrobial activity. *LWT - Food Science and Technology*, 65(SEPTEMBER). <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.024>

Banach, A. A., & Ooi, B. G. (2014). Enhancing the yields of phenolic compounds during fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* Strain 96581. *Food and Nutrition Sciences*, 5, 2063–2070.

Baumann, T. (2005). BIOCHEMICAL ECOLOGY. In *Espresso coffee: The science of quality* (pp. 55–86). Elsevier Academic Press.

Baumann, T. W. (2005). Biochemical ecology. In I. A. & R. V. (Eds.), *Espresso coffee: the science of quality* (2nd ed., p. 57). <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Benveniste, I., Salaün, J.-P., & Durst, F. (1978). Phytochrome-mediated regulation of a monooxygenase hydroxylating cinnamic acid in etiolated pea seedlings. *Phytochemistry*, 17(3), 359–363.

Bhanja, T., Rout, S., Banerjee, R., & Bhattacharyya, B. (2008). Studies on the performance of a new bioreactor for improving antioxidant potential of rice. *LWT – Food Sci Technol*, 41, 1459–65.

Bicho, N. C., Leitão, A. E., Ramalho, J. C., de Alvarenga, N. B., & Lidon, F. C. (2013). Impact of roasting time on the sensory profile of Arabica and Robusta coffee. *Ecology of Food and Nutrition*, 52(2), 163–177.

- Biesebeke, R. Te, Ruijter, G., Rahardjo, Y. S. P., Hoogschagen, M. J., Heerikhuisen, M., & A. Levin, et al. (2002). *Aspergillus oryzae in solid-state and submerged fermentations. Progress report on a multi-disciplinary project.* (No. 2).
- Boccas, F., Roussos, S., Gutierrez, M., Serrano, L., & Vinegra, G. G. (1994). No Title. *J. Food Sci. Technol.*, 31, 22–26.
- Bolivar, C. (2009). *Monografía sobre el galactomano del grano de café y su importancia en el procesamiento para la obtención de café soluble.* Universidad Tecnológica de Pereira.
- Brand, D., Pandey, A., Rodriguez-Leon, J., Roussos, S., Brand, I., & Soccol, C. (2001). Packed bed column fermenter and kinetic modeling for up- grading the nutritional quality of coffee husk in solid-state fermentation. *Biotechnol Prog.*, 17(6), 1065–70.
- Brigelius-Flohé, R. (2006). Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biological Chemistry*, 387, 1329–1335.
- Cabrera, S. DE; Calzada, J.F.; GIL, L.A.; Arriola, M. C. D. (1987). Etanol de cerezas y mucílago de café. In ICAITI (Ed.), *SIMPOSIO Internacional sobre la utilización integral de los subproductos del café.* (p. 129–137.). Guatemala: ANACAFÉ PNUMA.
- Cague, R.; Hube A.; Gibson, D. (2002). *Beyond the bean: redefining coffee Production, quality. Quick reference guide to standards for sustainable Agribusiness, systems.* (C. International, Ed.), *Environment and Natural Resource Management and Practice Networks.* Washington.
- Cai, S., Wang, O., Wu, W., & Al., E. (2012). Comparative study of the effects of solid-state fermentation with three filamentous fungi on the total phenolics content (TPC), flavonoids, and antioxidant activities of subfractions from oats (*Avena sativa* L.). *J Agric Food Chem.*, 60, 507–513.
- Castro, A. M., Castilho, L. R., & Freire, D. M. G. (2015). Performance of a fixed-bed solid-state fermentation bioreactor with forced aeration for the production of hydrolases by *Aspergillus awamori*. *Biochemical Engineering Journal*, 93, 303–308. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2014.10.016>
- Cavin, C., Holzhaeuser, D., Scharf, G., Constable, A., Huber, W. W., & Schilter, B. (2002).

- Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. *Food Chem. Toxicol.*, *40*, 1155–1163.
- ChemPRIME. (2010). Energy from Aerobic vs. Anaerobic Fermentation. Retrieved from http://wiki.chemprime.chemeddl.org/index.php/Energy_from_Aerobic_vs._Anaerobic_Fermentation#cite_note-0
- Chen, Q., Zhang, C., Zhao, J., & Ouyang, Q. (2013). Recent advances in emerging imaging techniques for non-destructive detection of food quality and safety. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *52*, 261–274. <http://doi.org/10.1016/j.trac.2013.09.007>
- Cheng, B., Furtado, A., Smyth, H. E., & Henry, R. J. (2016). Influence of genotype and environment on coffee quality. *Trends in Food Science & Technology*, *57*, Part A, 20–30. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2016.09.003>
- Cira, L., Huerta, S., Hall, G., & Shirai, K. (2001). Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry*, *37*, 1359–1366.
- Clarke, R. J. (2003). Coffee: green coffee/roast and ground. In E. Caballero, B., Trugo, L. C., Finglas, P. (Ed.), *Encyclopedia of Food Science and Nutrition* (2nd editio). Oxford: Academic Press.
- Clarke, R. J., & Macrae, R. (1985). *Coffee: Chemistry*. (V1.). London: Elsevier Applied Science Publishers.
- Clifford, M. (1997). The nature of chlorogenic acids. Are they advantageous compounds in coffee?. In *COLLOQUE Scientifique International sur le Cafe?* (pp. 20–25). Nairobi, Kenya: Juillet.
- Clifford, M. N. (1975). The composition of green and roasted coffee beans. *Process Biochemistry*, *5*, 13–19.
- Colmenares, N.G. , Ramirez-Martinez, J.R., Aldana, J.O., Clifford, M. (1994). No Title. *J. Sci. Food Agric.*, *65*, 157–162.
- Colmenares, N.G. , Ramirez-Martinez, J.R. , Aldana, J.O. , Ramos-Nini, M. E. (1998).

- Colmenares, N.G. , Ramirez-Martinez, J.R. , Aldana,J.O. , Ramos-Nini, M.E. *J. Sci. Food Agric.*, 77, 368–372.
- Cortina, H., Moncada, M., & Herrera, J. (2012). Variedad Castillo, Preguntas frecuentes. *Ciencia, Tecnología E Innovación Para La Caficultura Colombiana*, 426, 12.
- Costa, L. L., Toci, A. T., Silveira, C. L. P., Herszkowicz, N., M., Pinto, A., & Farah, A. (2010). Discrimination of Brazilian C. Canephora by location using mineral composition. In *Proc. 23rd Int. Conf. Coffee Sci.* Bali, Indonesia: ASIC.
- Craig, A., Fields, C., Liang, N., Kitts, D., & Erickson, A. (2016). Performance review of a fast HPLC-UV method for the quantifi cation of chlorogenic acids in green coffee bean extracts. *Talanta*, 154, 481–485. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.03.101>
- DBGET, K. databases in. (2016). Phenylpropanoid biosynthesis. Retrieved from http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?map00940
- de Carvalho, P. L. N., Silva, E. O., Chagas-Paula, D. A., Luiz, J. H. H., & Ikegaki, M. (2016). Importance and implications of the production of phenolic secondary metabolites by endophytic ungi: a mini-review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 16, 259–271.
- Delgado, F. G., Vela, J. A. O., & Rincón, F. Z. (2009). Correlación Entre Parámetros Térmicos de Café de Diferente Origen, *41*(1), 168–171.
- Dey, T. B., Chakraborty, S., Jain, K. K., Sharma, A., & Kuhad, R. C. (2016). Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid state fermentation process: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 53, 60–74. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.04.007>
- Díaz, M. (2014). Quality managment in coffee roasting: Best practices Manual for Master Roasters. Medellín.
- Díaz, M., & Fernández, M. (2011). La fermentación del café. In C. ONA (Ed.). Jica.
- Dixon, R., & Paiva, N. L. (1995). Stress-induced phenylopropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7, 1085.
- Dordević, T. M., Šiler-Marinković, S. S., & Dimitrijević-Branković I., S. (2010). Effect of

- fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudocereals. *Food Chem.*, *119*, 957–963.
- Duan, Y., Wang, L., & Chen, H. (2012). Digital image analysis and fractal-based kinetic modelling for fungal biomass determination in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, *67*, 60–67. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2012.04.020>
- Duarte, A. (2010). Chlorogenic acids and other relevant compounds in Brazilian coffees processed. *Food Chemistry*, *118*, 851–855.
- Duarte, G. ., Pereira, A. ., & Farah, A. (2010). Chlorogenic acids and other relevant compounds in Brazilian coffees processed by semi-dry and wet post-harvesting methods. *Food Chemistry*, *118*(3), 851–855. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.042>
- Eira, M. T. S., Silva, E. A. A. D. A., Castro, R. . D. E., Dussert, S., Walters, C., Bewley, J. D., & Hilhorst, H. W. M. (2006). Coffee seed physiology. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *18*(1), 149–163.
- El-Abassy, R. M., Donfack, P., & Materny, A. (2011). Discrimination between Arabica and Robusta green coffee using visible micro Raman spectroscopy and chemometric analysis. *Food Chemistry*, *126*(3), 1443–1448. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.132>
- Elias, L. G. (1978). Composición química de la pulpa de café y otros subproductos. In *Pulpa de café: Composición tecnología y utilización*. (pp. 19–29). Bogotá: CIID.
- Erk, T., Williamson, G., Renouf, M., Marmet, C., Steiling, H., & Dionisi, F. (2012). Dose-dependent absorption of chlorogenic acids in the small intestine assessed by coffee consumption in ileostomists. *Molecular Nutrition & Food Research*, *56*, 1488–1500.
- Esener, A., Roels, J., & Kossen, N. (1981). The influence of temperature on the maximum specific growth rate of *Klebsiella pneumoniae*. *Biotechnol Bioeng.*, *23*(6), 1401–1405.
- Esquivel, P., & Jiménez, V. M. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, *46*(2), 488–495. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.028>
- Evangelista, S. R., da Cruz Pedrozo Miguel, M. G., de Souza Cordeiro, C., Silva, C. F., Marques

- Pinheiro, A. C., & Schwan, R. F. (2014). Inoculation of starter cultures in a semi-dry coffee (*Coffea arabica*) fermentation process. *Food Microbiology*, *44*, 87–95. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2014.05.013>
- Fan, L., Pandey, A., & Soccol, C. R. (1999a). Proceedings of the 3rd International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products and AMGA's 26th National Mushroom Industry Conference. In A. Broderick & T. Nair (Eds.), *Cultivation of Pleurotus sp. on coffee residues* (pp. 293–300). Sydney.
- Fan, L., Pandey, A., & Soccol, C. R. (1999b). Proceedings of the 3rd International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products and AMGA's 26th National Mushroom Industry Conference. In A. Broderick & T. Nair (Eds.) (pp. 301–311). Sydney.
- Fan, L., Pandey, A., Vandenberghe, L. P. S., & Soccol, C. R. (1999). Proceedings of the 9th European Congress on Biotechnology, ECB9/2664,. Brussels, Belgium.
- Farah, A. (2012). Coffee Constituents. *Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention*, 21–58. <http://doi.org/10.1002/9781119949893.ch2>
- Farah, A., & Donangelo, C. (2006). Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *18*, 23–36.
- Farah, A., Monteiro, M., Donangelo, C. M., & Lafay, S. (2008). Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. *The Journal of Nutrition*, *138*(12), 2309–2315.
- Farfan, V. F. (2011). Cafés especiales. *Libro Sistemas Producción de Café En Colombia*, 234–254.
- Fedecafé. (2010). Clasificación de calidad. Retrieved from www.cafedecolombia.org
- Fedecafé. (2016, January). Colombia cerró 2015 con cosecha cafetera récord en últimos 23 años. *Al Grano N° 32*. Retrieved from https://www.federaciondecafeteros.org/algrano-fnc-es/index.php/comments/colombia_cerro_2015_con_cosecha_cafetera_record_en_ultimos_23_anos

- Figueroa-Montero, A., Esparza-Isunza, T., Saucedo-Castañeda, G., Huerta-Ochoa, S., Gutiérrez-Rojas, M., & Favela-Torres, E. (2011). Improvement of heat removal in solid-state fermentation tray bioreactors by forced air convection. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, *86*, 1321–1331.
- Firrao, G., Torelli, E., Gobbi, E., Raranciuc, S., Bianchi, G., & Locci, R. (2010). Prediction of milled maize fumonisin contamination by multispectral image analysis. *Journal of Cereal Science*, *52*(2), 327–330. <http://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.06.017>
- Flament, I., Gautschi, F., Winter, M., Willhalm, B., Stoll, M. (1968). Les composants furanniques de l'arôme café: quelques aspects chimiques et spectroscopiques. In *Proc. 3rd Coll. Int. Coffee Sci.* (pp. 197–215). Paris: ASIC.
- Flodman, H. R., & Nouredini, H. (2013). Effects of intermittent mechanical mixing on solid-state fermentation of wet corn distillers grain with *Trichoderma reesei*. *Biochem. Eng. J.*, *81*, 24–28.
- Folstar, P. (1985). Lipids. In E. Clarke, R. J., Macrae, R. (Ed.), *Coffee* (Vol. 1: Ch, pp. 203–222). London: Elsevier Applied Science.
- Fowler, Z. L., & Koffas, M. A. (2009). Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *83*, 799–808.
- Gelmi, C., Pérez-Correa, R., & Agosin, E. (2002). Modelling *Gibberella fujikuroi* growth and GA3 production in solid-state fermentation. *Proc Bio- Chem.*, *37*(9), 1033–1040.
- Guzmán, O., Gómez, E., Rivillas, C., & Oliveros, C. (2003). Determinar La Severidad De La Mancha De Hierro , *54*(3), 258–265.
- Hansen, G. H., Lübeck, M., Frisvad, J. C., Lübeck, P. S., & Andersen, B. (2015). Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. *Process Biochemistry*, *50*(9), 1327–1341. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.017>
- Hashemi, M., Mousavi, S., Razavi, S., & Shojaosadati, S. (2011). Mathematical modeling of

- biomass and α -amylase production kinetics by *Bacillus* sp. in solid-state fermentation based on solid dry weight variation. *Biochem Engn J.*, 53(2), 159–164.
- Hirakawa, N., Okauchi, R., Miura, Y., & Yagasaki, K. (2005). Anti-invasive activity of niacin and trigonelline against cancer cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69, 653–658.
- Hölker, U., Höfer, M., & J, L. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64, 175–186.U.
- Hu, W., Guo, T., Jiang, W. J., Dong, G. L., Chen, D. W., Yang, S. L., & Li, H. R. (2015). Effects of ultrahigh pressure extraction on yield and antioxidant activity of chlorogenic acid and cynaroside extracted from flower buds of *Lonicera japonica*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 13(6), 445–453. [http://doi.org/10.1016/S1875-5364\(15\)30038-8](http://doi.org/10.1016/S1875-5364(15)30038-8)
- Igho, O., Rohini, T., & Edzard, E. (2011). The use of green coffee extract as a weight loss supplement: A systematic review and meta-analysis of randomised clinical trials. *Gastroenterology Research and Practice*, 31, 1–6.
- Ikasari, L., Mitchell, D., & Stuart, D. (1999). Response of *Rhizopus oligosporus* to temporal temperature profiles in a model solid-state fermentation system. *Biotechnol Bioeng.*, 64(6), 722–728.
- Jaramillo, R. A. (2005). Clima andino y el café. *Cenicafé*, 192.
- Jeszka-Skowron, M., Sentkowska, A., Pyrzyńska, K., & De Peña, M. P. (2016). Chlorogenic acids, caffeine content and antioxidant properties of green coffee extracts: Influence of green coffee bean preparation. *European Food Research and Technology*. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1007/s00217-016-2643-y> (accepted).
- Jeszka-Skowron, M., Zgoła-Grzeškowiak, Skowiak, A., & Grzeškowiak, T. (2015). Analytical methods applied for the characterization and the determination of bioactive compounds in coffee. *European Food Research and Technology*, 240, 19–31.
- Joseph, I. (2001). *Food processing operations Modeling desing and analysis*. New York.
- Karyan, N. . (2016). Interview: What's So Special About Pacamara? Retrieved from

<http://www.perfectdailygrind.com/2016/08/entrevista-que-tiene-de-especial-el-pacamara/>

- Khanahmadia, M., Mitchell, D. A., Beheshtic, M., Roostaazad, R., & Sánchez, R. L. (2006). Continuous solid-state fermentation as affected by substrate flow pattern. *Chem. Eng. Sci.*, *61*, 2675–2687.
- Kölling-Speer, L., & Speer, K. (2005). The Raw Seed composition. In E. Illy, A., Viani, R. (Ed.), *Espresso Coffee, the Science of Quality*. (pp. 148–178). Italy: Elsevier Academic Press.
- Kuhnert, N., Karaklose, H., & Jaiswal, R. (2012). Analysis of chlorogenic acids and other hydroxycinnamates in food, plants and pharmacokinetic studies. In *Handbook of analysis of active compounds in functional foods* (CRC Press, pp. 461–512). New York: Taylor and Francis Group.
- Kuhnert, N., Jaiswal, R., Eravuchira, P., El-Abassy, R. M., Kammer, B., & Materny, A. (2011). Scope and limitations of principal component analysis of high resolution LC-TOF MS data: The analysis of the chlorogenic acid fraction in green coffee beans as a case study. *Analytical Methods*, *3*, 144–155.
- Ky, C. L., Louarn, J., Dussert, S., Guyot, B., Hamon, S., & Noirot, M. (2001). Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. *Food Chemistry*, *75*, 223–230.
- Ky, C. L., Louarn, J., Dussert, S., Guyot, B., Hamon, S., & Noirot, M. (2001). Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. *Food Chemistry*, *75*(2), 223–230.
- Lee, C. (2000). Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clin. Chim. Acta.*, *295*, 141–154.
- Lee, K. J., Choi, J. H., & Jeong, H. G. (2007). Hepatoprotective and antioxidant effects of the coffee diterpenes kahweol and Cafestol on carbon tetrachloride induced liver damage in mice. *Food Chem. Toxic.*, *45*, 2118–2125.
- Lee, L. W., Cheong, M. ., Curran, P., Yu, B., & Liu, S. . (2016). Modulation of coffee aroma via

- the fermentation of green coffee beans with *Rhizopus oligosporus*: I. Green coffee. *Food Chemistry*, *211*, 916–924. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.076>
- Leloup, V., Cancel, C., Liardon, R., & Rytz, A. &. (2004). Impact of wet and dry process on green composition and sensory characteristics. In Proceedings of 20th colloque coffee. ASIC (Ed.). Bangalore, India.
- López, T., Prado-Barragán, A., Nevárez-Moorillón, G. V., Contreras, J. C., Rodríguez, R., & Aguilar, C. N. (2013). Incremento de la capacidad antioxidante de extractos de pulpa de café por fermentación láctica en medio sólido. *CyTA - Journal of Food*, *11*(4), 359–365. <http://doi.org/10.1080/19476337.2013.773563>
- Luedeking, R., & Piret, E. (2000). A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *Biotechnol Bioeng.*, *67*(6), 636–644.
- Machado, C. M. M., Oliveira, B. H., Pandey, A., & Soccol, C. R. (1999). Proceedings of the Paper Presented at the 3rd International Seminar on Biotechnology in the Coffee Agro-industry (p. 39). Londrina, Brazil,.
- Madeira Junior, J. V., Teixeira, C. B., & Macedo, G. A. (2013). Biotransformation and bioconversion of phenolic compounds obtainment: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, *8551*(January), 1–7. <http://doi.org/10.3109/07388551.2013.803020>
- Martínez-Ávila, G., Aguilera-Carbó, A., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. (2012). Fungal enhancement of the antioxidant properties of grape waste. *Ann Microbiol.*, *62*, 923–930.
- Martinez, D., & Quirarte, M. (1984). No Title. *Boletin de La Sociedad Mexicana de Micologia*, *19*, 207–219.
- Martínez N., N. G. (1959). Coffee mucilage: Its chemical composition. *Coffee and Tea Industries and the Flavor Field*, *82*(8), 17–18.
- Mazaheri, D., & Shojaosadati, S. A. (2013). Mathematical models for microbial kinetics in solid-state fermentation: A review. *Iranian Journal of Biotechnology*, *11*(3), 156–167. <http://doi.org/10.5812/ijb.9426>

- Mazutti, M., Zobot, G., Boni, G., Skovronski, A., de Oliveira, D., Di Lucio, M., & Al., E. (2010). NoMathematical modeling of *Kluyveromyces marxianus* growth in solid-state fermentation using a packed-bed bioreactor. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 37(4), 391–400.
- Mazzafera, P., & Purcino, R. (2004). Post harvest processing methods and physiological alterations in coffee fruit. In P. of 20th colloque coffee. ASIC (Ed.). Bangalore, India.: 20 th International Colloquium on the Chemistry of Coffee.
- Menchu E., J.F.; Rolz, C. (1973). Coffee fermentation technology. *Café and Cacao*, 17(1), 53–61.
- Mendes, A. (1941). Cytological observations in *Coffea*. VI. Embryo and endosperm development in *Coffea arabica* L. *Am. J. Bot.*, 28, 784–789.
- Mendes, A. (1942). Desenvolvimento do embrião e do endosperma em *Coffea arabica* L. *Bragantia*, 2, 115–128.
- Mikami, Y., & Yamazawa, T. (2015). Chlorogenic acid, a polyphenol in coffee, protects neurons against glutamate neurotoxicity. *Life Science*, 139, 69–74.
- Minjares-Carranco, A., Trejo-Aguilar, B. A., Aguilar, G., & Viniegra-Gonzalez, G. (1997). No Title. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 22, 25–31.
- Mitchell, D., Krieger, N., Stuart, D., & Pandey, A. (2000). New developments in solid-state fermentation: II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. *Proc Biochem.*, 35(10), 1211–1225.
- Mitchell, D., & von Meien, O. (2000). Mathematical modeling as a tool to investigate the design and operation of the zymotis packed-bed bioreactor for solid-state fermentation. *Biotechnol Bioeng.*, 68(2), 127–135.
- Mitchell, D., von Meien, O., Krieger, N., & Dalsenter, F. (2004). A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. *Bio- Chem Engrn J.*, 17(1), 15–26.
- Mitchell, D., von Meien, O., Krieger, N., & FDH., D. (2004). A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state

- fermentation. *Bio- Chem Engn J.*, 17(1), 15–26.
- Muller dos Santos, M., Souza das Rosa, A., Dal’Boit, S., Mitchell, D. A., & Krieger, N. (2004). Thermal denaturation: is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes. *Bioresour. Technol.*, 93, 261–268.
- Murthy PS, M. N. M. (2012). Sustainable management of coffee industry by-products and value addition — a review. *Resour Conserv Recycl*, 66, 45–58.
- Narita, Y., & Inouye, K. (2014). Review on utilization and composition of coffee silverskin. *Food Research International*. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.023>
- Nunes, F. M., & Coimbra, M. A. (2001). Chemical characterization of the high molecular weight material extracted with hot water from green and roasted Arabica coffee. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1773–1782.
- Olthof, M. R., Hollman, P. C., Zock, P. L., & Katan, M. B. (2001). Consumption of high disease of chlorogenic acid present in coffee, or of black tea increases plasma total homocysteine concentrations in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73, 532–538.
- Orozco, A. L., Pérez, M. I., Guevara, O., Rodríguez, J., Hernández, M., González-Vila, F. J., ... Arias, M. E. (2008). Biotechnological enhancement of coffee pulp residues by solid-state fermentation with *Streptomyces*, Py-GC/MS analysis. *Journal of Analytic*, 247–252.
- Ortiz, A., Veja, F. E., & Posada, F. (2004). Volatile composition of coffee berries at different stages of ripeness and their possible attraction to the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Agric. Food Chem.*, 52, 5914–5918.
- Oviedo, J. (2014). *Evaluación de la producción de proteína fúngica a partir de Pleurotus pulmonarius empleando residuos de poscosecha de maíz*. Universidad de Antioquia.
- Oviedo, J. C., Casas, A. E., Valencia, J. a, & Zapata, J. E. (2014). Análisis de la Medición de la Biomasa en Fermentación en Estado Sólido empleando el Modelo Logístico y Redes Neuronales. *Información Tecnológica*, 25(4), 141–152. <http://doi.org/10.4067/S0718-07642014000400016>

- Palacios, I., Lozano, M., Moroa, C., D'Arrigo, M., Rostagno, M. A., Martínez, J. A., & Al., E. (2011). Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry*, *128*, 674–678.
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, *13*, 81–84.
- Pandey, A., Soccol, C., & Larroche, C. (2008). *Current developments in Solid State Fermentation*. (A. Pandey, S. Carlos Ricardo, & L. Christian, Eds.). New Delhi: Springer. Asiatech publishers Inc.
- Pandey, A., Soccol, C. R., Leo, J. A. R., & Nigam, P. (2001). *Solid-state Fermentation in Biotechnology*. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc.
- Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., Brand, D., Mohan, R., & Roussos, S. (2000). Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochem. Eng. J.*, *6*, 153–162.
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol. Adv.*, *22*, 189–259.
- Patel, A. K., Singhania, R. R., & Pandey, A. (2016). Novel enzymatic processes applied to the food industry. *Current Opinion in Food Science*, *7*, 64–72. <http://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.12.002>
- Pee, W. Van; Castelein, J. (1971). The yeast flora of fermenting robusta coffee. *East African Agricultural and Forestry Journal*, *36*(3), 308–310.
- Pee, W. Van; Castelein, J. M. (1972). Study of the pectinolytic microflora, particularly the enterobacteriaceae from fermenting coffee in the Congo. *Journal of Food Science*, *37*(1), 171–174.
- Penaloza, W., Molina, M. R., Gomez, R., & Bressani, R. (1985). No Title. *Appl. Environ. Microbiol.*, *49*, 388–393.
- Pereira, G. V. de M., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2016). Current state of research on cocoa and coffee fermentations. *Current Opinion in Food Science*, *7*, 50–57.

<http://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.11.001>

- Perrone, D., Farah, A., Donangelo, C. M., de Paulis, T., & Martin, P. R. (2008). Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffee cultivars. *Food Chemistry*, *106*(2), 859–867. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.053>
- Pleissner, D., Neu, A.-K., Mehlmann, K., Schneider, R., Puerta-Quintero, G. I., & Venus, J. (2016). Fermentative lactic acid production from coffee pulp hydrolysate using *Bacillus coagulans* at laboratory and pilot scales. *Bioresource Technology*, *218*, 167–173. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.078>
- Ponte, S. (2003). Estándares, comercio y equidad: lecciones de la industria de los cafés especiales. *Ensayos Sobre Economía Cafetera*, *16*(19), 131–163.
- Ponte, S. (2004). Estándares y sostenibilidad en el sector cafetero: una Economía, aproximación global a la cadena de valor. *Ensayos Sobre Economía Cafetera* *17* (20):, *17*(20), 31–83.
- Puerta, G. (1999). Influencia del proceso de beneficio en la calidad del café. *Cenicafé*, *50*(1), 78–88.
- Puerta, G. (2006). La humedad controlada del grano preserva la calidad del café. *Cenicafé*, *352*, 1–8. Retrieved from <http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/418/1/avt0352.pdf>
- Puerta, G. (2010). *Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café*. (Avances Técnicos No. 402). Chinchiná.
- Puerta, G. (2011). Composición Química de una taza de café. *Cenicafé*.
- Puerta, G. (2012a). *Factores, procesos y controles en la fermentación del café*. (Avances Técnicos No.422). Chinchiná.
- Puerta, G. (2012b). *Factores, procesos y controles en la fermentación del café*. *Avances Técnicos No. 422*. Chinchiná.
- Puerta, G. (2015). *Fermentación controlada del café*: (Avances técnicos No. 454). Chinchiná.

- Puerta, G., Marín, J., & Osorio, G. (1996). *Composición microbiológica del mucílago de café. INFORME anual de actividades de investigación: Disciplina química industrial*. Chinchiná.
- Puerta, G., & Ríos, S. (2011). Composición química del mucílago de café, según el tiempo de fermentación y refrigeración. *Cenicafé*, 62(2), 23–40.
- Rajagopalan, S., & Modak, J. (1995). Modeling of heat and mass transfer for solid state fermentation process in tray bioreactor. *Bioproc Engn.*, 13(3), 161–169.
- Ratkowsky, D., Lowry, R., McMeekin, T., Stokes, A., & Chandler, R. (1983). Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *J Bacteriol.*, 154(3), 1222–6.
- Regazzoni, L., Saligari, F., Marinello, C., Rossoni, G., Aldini, G., Carini, M., & Orioli, M. (2016). Coffee silver skin as a source of polyphenols: High resolution mass spectrometric profiling of components and antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 20, 472–485. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.027>
- Reis, F. S., Martins, A., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: a comparative study between in vivo and in vitro samples. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 1201–1207.
- Reis, N., Franca, A., & Oliveira, L. (2016). Concomitant Use of Fourier Transform Infrared Attenuated Total Reflectance Spectroscopy and Chemometrics for Quantification of Multiple Adulterants in Roasted and Ground Coffee. *Journal of Spectroscopy*, 2016, 7. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2016/4974173>
- Reis-Evangelista, S., Ferreira-Silva, C., PedrozodaCruz-Miguel, M.G. deSouza-Cordeiro, C., Marques-Pinheiro, A.C. Ferreira-Duarte, W., & Freitas-Schwan, R. (2014). Improvement of coffee beverage quality by using selected yeasts strains during the fermentation in dry process. *Food Research International*, 61, 183–195. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.033>
- Reis-Evangelista, S., Ferreira-Silva, C., PedrozodaCruz-Miguel, M.G. deSouza-Cordeiro, C., Marques-Pinheiro, A.C. Ferreira-Duarte, W., & Freitas-Schwan, R. (2015). International

- Journal of Food Microbiology Microbiological diversity associated with the spontaneous wet method of coffee fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 210, 102–112. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.008>
- Rendón, M. ., Garcia-Salva, T., & Bragagnolo, N. (2014). Impact of chemical changes on the sensory characteristics of coffee beans during storage, 147, 279–286. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.123>
- Rivera, J. A., & Díaz, M. (2009). *Los ácidos orgánicos y la química del café*. Chiapas, México.
- Rivera, J. A. (2013). La “Alquimia” del tueste de café. Una mirada a los ácidos orgánicos. *Traducido Por: Artajo ML. de Coffee Chemistry Para Forum Café. F45.*
- Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2866e2887.
- Rodrigues, N. P., Benassi, M. T., & Bragagnolo, N. (2013). Scavenging capacity of Correlation, coffee brews against oxygen and nitrogen reactive species and the International., with bioactive compounds by multivariate analysis. *Food Research*. <http://doi.org/Http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.028>.
- Rodríguez-Dúran, L. V., Contreras-Esquivel, J. C., Rodríguez, R., Prado-Barragán, L. A., & Aguilar, C. N. (2011). Optimization of tannase production by *Aspergillus niger* in solid-state packed-bed bioreactor. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 960–967.
- Rodríguez-León, J. A., Soccol, C. R., Singhanía, R. R., Pandey, A., Sturm, W., Letti, L. A., ... Rodríguez-Fernández, D. E. (n.d.). Solid-state fermentation. In C. G. D. (Eds. . A. Pandey, C. Larroche, C.R. Soccol (Ed.), *Current Develop- ments in Solid-state Fermentation* (pp. 554–569). New Delhi, India: Asiatech Publishers, Inc.
- Rodríguez-Valencia, N., Zambrano-Franco, D., & Ramírez-Gómez, C. (2013). Manejo y disposición de los subproductos y de las aguas residuales del beneficio del café. In F. Gast & et al. (Eds.), *Manual del cafetero colombiano* (Primera ed, Vol. Tomo 3, pp. 112–136). Chinchiná, Colombia.: Cenicafé - Federación Nacional de Cafeteros de Colombia.
- Rodríguez-Zúniga, U. F., Couri, S., Neto, V. B., Crestana, S., & Farinas, C. S. (2013). Integrated

strategies to enhance cellulolytic enzyme production using an instrumented bioreactor for solid-state fermentation of sugarcane bagasse., *Bioenerg. Res.*, 6, 142–152.

Rojas-Jiménez, K., Hernández, M., & Blanco, J. (n.d.). *Búsqueda de hongos y bacterias con potencial para degradar la lignocelulosa : una alternativa para el aprovechamiento de los desechos agroforestales impulso de proyectos de investigación , cuyos resultados sirvan para el desarrollo.*

Rolz, C.; Menchu E., J.F.; Espinosa, R.; García P., A. (1971). Coffee fermentation studies. In *COLLOQUE International sur la chimie des cafés.* (pp. 259–269). Lisboa, París: ASIC.

Roussos, S., Hannibal, L., DelosAngeles-Aquiahuatl, M., Trejo-Hernandez, M., & Marakis, S. (1994). No Title. *J. Food Sci. Technol.*, 31, 316– 319.

Saenger, M., Hartge E.-U. J., Werther, Ogada T., S. Z. (2001). Combustion of coffee husks. *Renewable Energy*, 23, 103–121.

Saenger, M., Hartge, E.-U., Werther, J., Ogada, T., & Siagi, Z. (2001). Combustion of coffee husks. *Renewable Energy*, 23(1), 103–121. [http://doi.org/10.1016/S0960-1481\(00\)00106-3](http://doi.org/10.1016/S0960-1481(00)00106-3)

Santamaria, M., García, F., & Roselló, J. (2003). *Germinación de Semillas.* Retrieved from http://www.euita.upv.es/varios/biologia/temas/tema_17.htm#Factores externos

Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., & Hirano, T. (2011). Invitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int.J. Pharm.*, 403, 136–138.

Saucedo-Castaneda, G., Gutierrez-Rojas, M., Bacquet, G., Raimbault, M., & Viniegra-Gonzalez, G. (1990). Heat transfer simulation in solid sub- strate fermentation. *Biotechnol Bioeng.*, 35(8).

SCAA, S. C. A. of A. (2012). Coffee Terms & Definitions From the Specialty Coffee Association of America. In *The specialty coffee event of the year* (pp. 1–3). Oregon, Portland. Retrieved from www.scaa.org

Schwan, R., & Fleet, G. (2014). *Cocoa and Coffee Fermentations.* CRC Press.

Sermanni, G. G., & Tiso, N. (2008). Aspects of desing of bioreactors in SSF. In A. Pandey, S.

- Carlos Ricardo, & L. Christian (Eds.), *Current developments in Solid State Fermentation* (pp. 116–144). New Dehli: Springer. Asiatech publishers Inc.
- Shearer, J., Sellars, E., Farah, A., Graham, T. E., & Wasserman, D. H. (2007). Effects of chronic coffee consumption on glucose kinetics in the conscious rat. *Can. J. Phys. Pharm.*, *85*, 823–830.
- Shemekite, F., Gómez-Brandón, M., Franke-Whittle, I. H., Praehauser, B., Insam, H., & Assefa, F. (2014). Coffee husk composting: An investigation of the process using molecular and non-molecular tools. *Waste Management*, *34*(3), 642–652. <http://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.11.010>
- Shimoda, H., Seki, E., & Aitani, M. (2006). Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *17*, 6–9.
- Shlonsky, A. K., Klatsky, A., & Armstrong, A. (2003). Traits of persons who drink decaffeinated coffee. *Ann. Epidemiol.*, *13*, 273–279.
- Shu, C. H., & Lung, M. Y. (2008). Effect of culture pH on the antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, *39*(1), 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.jcice.2007.04.010>
- Sidney, U. of. (n.d.). Energy and Thermodynamics. The University of Sidney. Retrieved from <http://sydney.edu.au/science/chemistry/~george/1405/Wk4-6.pdf>
- Siermann, L. (2016). Grano con pergamino y mucílago. Retrieved from <https://www.facebook.com/CoffeeConsulate/?pnref=story>
- Silva, C. (2014). Microbial activity during coffee fermentation. In *Cocoa and Coffee Fermentations*. In F. G. Edited by Schwan RF (Ed.) (pp. 368–423). CRC Press.
- Silva, C. F., Batista, L. R., Abreu, L. M., Dias, E. S., & Schwan, R. F. (2008). Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. *Food Microbiology*, *25*(8), 951–957.

- Silva CF, Batista LR, Abreu LM, Dias ES, S. R. (2008). Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. *Food Microbiol*, 25, 951–957.
- Silveira, C. L., Mazutti, M. A., & Salau, N. P. G. (2014). Modeling the microbial growth and temperature profile in a fixed-bed bioreactor. *Bioprocess. Biosyst. Eng.*, 37(10), 1945–1954.
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 13–18. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.019>
- Soares, M., Christen, P., Pandey, A., & Soccol, C. R. (2000). No Title. *Process Biochem.*, 35, 857–861.
- Soares, M., Soccol, C. R., Pandey, A., & Christen, P. (1999). Proceedings of the Paper Presented at the 3rd International Seminar on Biotechnology in the Coffee Agro-industry (p. 40). Londrina, Brazil.
- Speer, K., & Kölling-Speer, I. (2006). The lipid fraction of the coffee bean. *Braz. J. Plant Physiol.*, 18, 201–216.
- Stelmach, E., Pohl, P., & Szymczycha-Madeja, A. (2015). The content of Ca, Cu, Fe, Mg and Mn and antioxidant activity of green coffee brews. *Food Chemistry*, 182, 302–308.
- Stephanucci, A., P., C. W., Hamel, M., & Kirk-Othmer. (1979). *Encyclo. Chem. Technol* (Vol 6.). New York: John Wiley & Sons.
- Suzuki, A., Kagawa, D., Ochiai, R., Tokimitsu, I., & Saito, I. (2002). Green coffee bean extract and its metabolites have a hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension Research*, 25, 99–107.
- Szewczyk, K., & Myszka, L. (1994). The effect of temperature on the growth of *A. niger* in solid state fermentation. *Bioproc Engn.*, 10(3), 123–126.
- Te Biesebeke, R., Ruijter, G., Rahardjo, Y. S. P., Hoogschagen, M. J., Heerikhuisen, M., Levin, A., & Al., E. (2002). *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations. *Progress*

report on a multi-disciplinary project, FEMS Yeast Res. 2.

Teixeira, A. A., Brando, C. H., & Thomaziello, R. A. (2005). Processing of the harvest. In R. Illy, A. Viani (Ed.), *Espresso coffee: The science of quality* (Second edi, pp. 91–95). Italy: Academic Press.

Thielke, C. (1989). No Title. *Mushroom Sci.*, *12*, 337–343.

Thom, E. (2007). The effect of chlorogenic acid enriched coffee on glucose absorption in healthy volunteers and its effect on body mass when used long-term in over weight and obese people. *J.Int.Med.Res.*, *35*, 900–908.

Thomas, L., Larroche, C., & Pandey, A. (2013). Current developments in solid-state fermentation,. *Biochem. Eng. J.*, *81*, 146–161.

Toci, A. T., & Farah, A. (2008). Volatile compounds as potential defective coffee seeds' markers. *Food Chem.*, *108*, 1133–1141.

Toci, A. T., Neto, V. J. F. M., Torres, A. G., Calado, V., & Farah, A. (2008). Tryacylglycerols changes during the storage of roasted coffee. In *Proc. 22nd Int. Conf. Coffee Sci.* (pp. 504–507). Campinas, SP, Brazil: ASIC.

Tohda, C., Kuboyama, T., & Komatsu, K. (2005). Search for natural products related to regeneration of the neuronal network. *Neurosignals*, *14*, 34–45.

Tovar, M. J., Romero, M. P., Girona, J., & Motilva, M. J. (2002). L-Phenylalanine ammonia-lyase activity and concentration of phenolics in developing olive (*Olea europaea* L cv Arbequina) fruit grown under different irrigation regimes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *82*(8), 892–898.

Trademap. (2015). List of importing markets for a product exported by Colombia. Retrieved April 15, 2016, from http://www.trademap.org/Country_SelProductCountry_TS.aspx

Trugo, L. C. (1985). Carbohydrates. In R. Clarke R. J., Macrae (Ed.), *Coffee* (1st editio, p. 83). Elsevier Applied Science Publishers.

Trugo, L. C. (2003). Coffee Analysis. In E. Caballero, B., Trugo, L. C., Finglas, P. M. (Ed.),

- Encyclopedia of Food Science and Nutrition* (2nd editio, p. 498). Oxford, UK: Oxford Academic Press.
- Trugo, L. C., & R., M. (1984). A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. *Food Chem.*, *15*, 219–227.
- Upadhyay, R., & Mohan Rao, L. J. (2013). An outlook on chlorogenic acids occurrence, chemistry, technology, and biological activities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *53*(9), 968–984.
- Urbaneja, G., Ferrer, J., Paez, G., Arenas, L., & Colina, G. (1996). Acid hydrolysis and carbohydrates characterization of coffee pulp. *Renewable Energy*, *9*, 1041–1044.
- van de Lagemaat, J., & Pyle, D. L. (2004). Solid-state fermentation: a continuous process for fungal tannase production. *Biotechnol. Bioeng.*, *87*, 924–929.
- Vandenberghe, L. P. S., Soccol, C. R., Pandey, A., & Lebeault, J. M. (1999). No Title. *Biores. Technol.*, *74*, 175–178.
- Vilela DM, Pereira GVM, Silva CF, Batista LR, S. R. (2010). Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). *Food Microbiol*, *27*, 1128–1135.
- Watanabe, T., Arai, Y., Mitsui, Y., Kusaura, T., Okawa, W., & Kajihara, Y. (2006). The blood pressure-lowering effect and safety of chlorogenic acid from green coffee bean extract in essential hypertension. *Clin.Exp.Hypertens.*, *28*, 439–449.
- Wattenberg, L. W. (1983). Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. *Cancer Res.*, *43*, 2448s–2453s.
- Weber, F., Oostra, J., Tramper, J., & Rinzema, A. (2002). Validation of a model for process development and scale-up of packed-bed solid-state bioreactors. *Biotechnol Bioeng.*, *77*(4), 381–393.
- Wianowska, D., Typek, R., & Dawidowicz, A. L. (2015). Phytochemistry How to eliminate the formation of chlorogenic acids artefacts during plants analysis ? Sea sand disruption method

(SSDM) in the HPLC analysis of chlorogenic acids and their native derivatives in plants. *Phytochemistry*, 117, 489–499. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.07.006>

Yang, S. Y., Ji, K. S., Baik, Y. H., Kwak, W. S., & McCaskey, T. A. (2005). Lactic acid fermentation of food waste for swine feed. *Bioresource Technology*, 97, 1858–1864.