

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



ESCUELA DE POSGRADO

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO
EN GESTIÓN PARA EL DESARROLLO SUSTENTABLE**

**CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y QUÍMICA DEL
FERMENTADO ESPONTÁNEO DEL CAFÉ (*Coffea
arabica*) EN AMAZONAS**

Autor: Bach. Jhordy Perez Ocampo

Asesores: Ph.D. Martha Steffany Calderón Ríos

Ph.D. Danilo Edson Bustamante Mostajo

Registro:

CHACHAPOYAS – PERÚ

2022

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS DE MAESTRÍA EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM



ANEXO 6-H

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS DE MAESTRÍA (X)/DOCTORADO () EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM

1. Datos de autor 1

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): Perez Ocampo Jhordy
 DNI N°: 71997736
 Correo electrónico: jhordyperezocampo@gmail.com
 Nombre de la Maestría (X) / Doctorado (): Gestión para el desarrollo sustentable

Datos de autor 2

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): _____
 DNI N°: _____
 Correo electrónico: _____
 Nombre de la Maestría () / Doctorado (): _____

2. Título de la tesis para obtener el grado académico de Maestro (X) / Doctor ()

Caracterización biológica y química del fermentado espontáneo del café (Coffea arabica en Ayacucho)

3. Datos de asesor 1

Apellidos y nombres: Calderón Ríos Martha Stofany
 DNI, Pasaporte, C.E N°: 44890445
 Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>) (<https://orcid.org/0000-0003-3611-440x>)

Datos de asesor 2

Apellidos y nombres: Bustamante Restajo Danilo Edson
 DNI, Pasaporte, C.E N°: 43496105
 Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>) (<https://orcid.org/0000-0002-5979-6493>)

4. Campo del conocimiento según Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos- OCDE (ejemplo: Ciencias médicas, Ciencias de la Salud-Medicina básica-Inmunología)

https://catalogos.concytec.gob.pe/vocabulario/ocde_ford.html
1.02.03- Bioquímica, 1.05.00- Ciencias de la Tierra, ciencias ambientales, 1.06.01- Biología celular, microbiología, 1.06.03- Bioquímica, biología molecular.

5. Originalidad del Trabajo

Con la presentación de esta ficha, el(la) autor(a) o autores(as) señalan expresamente que la obra es original, ya que sus contenidos son producto de su directa contribución intelectual. Se reconoce también que todos los datos y las referencias a materiales ya publicados están debidamente identificados con su respectivo crédito e incluidos en las notas bibliográficas y en las citas que se destacan como tal.

6. Autorización de publicación

El(los) titular(es) de los derechos de autor otorga a la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), la autorización para la publicación del documento indicado en el punto 2, bajo la *Licencia creative commons* de tipo BY-NC: Licencia que permite distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial por lo que la Universidad deberá publicar la obra poniéndola en acceso libre en el repositorio institucional de la UNTRM y a su vez en el Registro Nacional de Trabajos de Investigación - RENATI, dejando constancia que el archivo digital que se está entregando, contiene la versión final del documento sustentado y aprobado por el Jurado Evaluador.

Chachapoyas, 04 de diciembre, 2022

Firma del autor 1

Firma del autor 2

Firma del Asesor 1

Firma del Asesor 2

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida y por haberme guiado en este camino, que muchas veces se tornó oscuro, pero con su luz, puedo seguir adelante.

A mis padres Wilder F. Perez Cachay y Norma I. Ocampo Barrera, y a mi hermano Franz Y. Perez Ocampo por sus consejos, apoyo incondicional y paciencia en todo momento. Por su sacrificio y comprensión que ha hecho posible mi formación como persona y profesional.

A Disleni Hernández Zabaleta por brindarme amor y apoyo incondicional. Gran parte de la persona que soy ahora es gracias a ella.

A todas las personas, amigos, compañeros y docentes que a lo largo de mi formación han aportado de distintas maneras.

Jhordy Perez Ocampo

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por permitirme compartir estos años con excelentes personas de calidad, tanto en amistad, compañerismo y profesionalmente, son mi inspiración para seguir formándome como profesional y buena persona.

A mis asesores, Ph.D. Danilo E. Bustamante Mostajo y Ph.D. Martha S. Calderón Ríos, quienes más que docentes han demostrado ser amigos en cada paso, por su dedicación, tiempo, paciencia y sobre todo consejos para que el proyecto de investigación se desarrolle de la mejor manera.

Al director del INDES-CES, Dr. Manuel Oliva Cruz por las facilidades correspondientes para realizar el proyecto de investigación

Al Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC) por el financiamiento de esta investigación a través del Proyecto Metacafé con contrato N° 30-2018-FONDECYT-BM-IADT-MU “Elaboración de cultivos iniciadores de fermentación de café (*Coffea arabica*) a partir del secuenciamiento metagenómico de comunidades microbianas presentes en la fermentación espontánea de cafés especiales de la Región Amazonas, Perú”.

A los profesionales miembros del jurado Dr. Carlos Eduardo Millones Chanamé, Mg. Santos Triunfo Leiva Espinoza y Dra. Elena Victoria Torres Mamani por sus aportes y recomendaciones con el fin de mejorar el desarrollo del proyecto.

A todas aquellas personas que de una u otra manera me ayudaron con sus aportes en esta investigación, en especial a la Ing. Jani Elisabet Mendoza Merino y al Ing. Jhonsy Omar Silva López.

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS

Dr. Policarpio Chauca Valqui

Rector

Dr. Miguel Ángel Barrena Gurbillón

Vicerrector Académico

Dra. Flor Teresa García Huamán

Vicerrectora de Investigación

Dr. Raúl Rabanal Oyarce

Director de la Escuela de Posgrado

VISTO BUENO DE LOS ASESORES DE TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 6-L

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO (X)/ DOCTOR ()

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM (X)/Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Caracterización biológica y química del fermentado espontáneo del café (Coffea arabica) en Ayacucho;

cuyo autor Jhony Pérez Orango es estudiante del _____ ciclo/egresado (X) de la Escuela de Posgrado, Maestría (X) / Doctorado () en Gestión para el desarrollo sustentable con correo electrónico institucional jhony.perez.rpg@untrm.edu.pe



El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 31 de mayo de 2022


Firma y nombre completo del Asesor

Martha Steffany Calderón Pizarro



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 6-L

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL
GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO () / DOCTOR ()

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM (x) / Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Caracterización biológica y química del fermentado espontáneo del café (Coffea arabica) en Amazoras

cuyo autor Jhordy Pérez Deampo es estudiante del _____
ciclo/egresado (x) de la Escuela de Posgrado, Maestría (x) / Doctorado () en Gestión para el desarrollo sustentable, con correo electrónico institucional jhordy.perez.epg@untram.edu.pe



El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

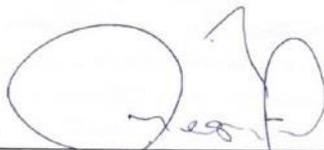
Chachapoyas, 31 de mayo de 2022.

Firma y nombre completo del Asesor
David Bustamante Mastayo

JURADO EVALUADOR



Dr. Carlos Eduardo Millones Chanamé
Presidente



Mg. Santos Triunfo Leiva Espinoza
Secretario



Dra. Elena Victoria Torres Mamani
Vocal

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS



REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 6-0

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO (x) / DOCTOR ()

Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador de la Tesis titulada:

Caracterización biológica y química del fementado espontáneo
del café (Coffea arabica) en Amazonas.

presentada por el estudiante () / egresado (x) Jhordy Pérez Ocampo

de la Escuela de Posgrado, Maestría (x) / Doctorado () en Gestión para el
desarrollo sustentable

con correo electrónico institucional jhordy.perez.epg@untrm.edu.pe

después de revisar con el software Turnitin el contenido de la citada Tesis, acordamos:

- La citada Tesis tiene 13 % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es menor (x) / igual () al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM.
- La citada Tesis tiene — % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es mayor al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM, por lo que el aspirante debe revisar su Tesis para corregir la redacción de acuerdo al Informe Turnitin que se adjunta a la presente. Debe presentar al Presidente del Jurado Evaluador su Tesis corregida para nueva revisión con el software Turnitin.

Chachapoyas, 06 de septiembre del 2022


SECRETARIO


PRESIDENTE


VOCAL

OBSERVACIONES:

.....
.....

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 6-S

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO (X) / DOCTOR ()

En la ciudad de Chachapoyas, el día 29 de setiembre del año 2022, siendo las 16:00 horas, el aspirante Jhordy Perez Ocaupo, Asesorado por Martha Calderón Ríos y Danilo Postamante, defiende en sesión pública presencial (X) / a distancia () la Tesis titulada: Caracterización biológica y química del fermentado espontáneo del café (Coffea arabica) en Amazonas, para obtener el Grado Académico de Maestro (X)/Doctor () en Gestión para el desarrollo sustentable, a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; ante el Jurado Evaluador, conformado por:

Presidente: Carlos Eduardo Millones Characani
Secretario: Santos Trínfo Leiva Espinoza
Vocal: Eleua Victoria Torres Mamani



Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y método, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto de sustentación, para que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida a la sustentación de la Tesis de Maestría (X)/Doctorado (), en términos de:

Aprobado (X) por Unanimidad ()/Mayoría () Desaprobado ()

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en esta misma sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 17:25 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Grado Académico de Maestro (X)/Doctor ().

SECRETARIO

VOCAL

PRESIDENTE

OBSERVACIONES:

El maestrante sustentó el 29 de setiembre de 2022, sin embargo, por hallarse observaciones por parte del jurado, estas fueron levantadas el 07 de noviembre 2022

CONTENIDO

RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIALES Y MÉTODOS	4
2.1. Área de estudio.....	4
2.2. Caracterización biológica	7
2.2.1. Análisis metagenómico.....	7
2.3. Caracterización química	10
2.3.1. Análisis cromatográfico.....	10
2.4. Análisis estadístico de datos	13
III. RESULTADOS	15
3.1. Recuento de resultados obtenidos.....	15
3.2. Parámetros fisicoquímicos.....	16
3.3. Caracterización biológica	16
3.4. Abundancia relativa de microorganismos asociados a parámetros fisicoquímicos temperatura y pH.....	26
3.5. Caracterización química	30
3.6. Análisis estadístico de datos	34
3.7. Implicancias de la investigación en la sostenibilidad del cultivo de café.....	44
3.5.1. El rol de la agricultura sostenible.....	44
3.5.2. Enfoque social: La importancia de las prácticas agrícolas en el cultivo de café ..	44
3.5.3. Enfoque económico: Aplicaciones de conocer los microbiomas del café:	46
3.5.4. Enfoque ambiental: preservación de los ecosistemas Enfocando nuevos horizontes para la preservación de los agroecosistemas.....	47
IV. DISCUSIÓN	49
V. CONCLUSIONES	54
VI. RECOMENDACIONES	56
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXOS	76
Anexo 01: Compuestos volátiles detectados por SPME-GC-MS.	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 01: Resumen dicotómico de resultados obtenidos en los análisis biológico y químico.....	15
Tabla 02: Parámetros fisicoquímicos de temperatura y pH correspondientes al café en proceso de fermentación, de las fincas Laurel, La Palma y Bombón.....	16
Tabla 03. Compuestos volátiles asociados a las características organolépticas identificadas por el espectro de masas (MS) en comparación con la base de datos NIST 17	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Puntos de colecta de material muestral para análisis biológico y químico ubicados en Amazonas (AMI: distrito de La Peca, AM2: distrito de Lonya Grande y AM3: distrito de San Nicolás) y Cajamarca (CJ1: distrito de Chirinos y CJ2: distrito de La Coipa). Se muestran las altitudes a las que fueron colectados.....	4
Figura 2. Colecta de muestras Finca Bombón, distrito de La Peca, Provincia de Bagua, región Amazonas	6
Figura 3. Colecta de muestras Finca La Palma, distrito de Chirinos, Provincia de San Ignacio, región Cajamarca	6
Figura 4. Colecta de muestras Finca Laurel, distrito de La Coipa, Provincia de San Ignacio, región Cajamarca	7
Figura 5. Preparación de la muestra para análisis cromatográfico	12
Figura 6. Abundancia relativa de secuencias de géneros dentro del grupo Bacteria con respecto al inicio de la fermentación larga (IFL), final de la fermentación larga (FFL) y fermentación corta (FC).....	19
Figura 7. Abundancia relativa de secuencias de géneros dentro del grupo Bacteria con respecto al inicio (IFL) (6h-18h) y final de la fermentación larga (FFL) (22h-32h) y fermentación corta (FC) (5h-9h).....	20
Figura 8. Mapa de calor que representa la abundancia relativa de secuencias de géneros con asignación taxonómica (excluyendo el grupo de secuencias no identificadas) dentro del grupo Bacteria con respecto al inicio (IFL)(6h-18h) y final de fermentación larga (FFL) (22h-32h) y fermentación corta (FC) (5h-9h).	21
Figura 9. Abundancia de secuencias de géneros dentro del grupo Fungi con respecto al inicio de la fermentación larga (IFL), final de la fermentación larga (FFL) y fermentación corta (FC).....	22
Figura 10. Abundancia de secuencias de géneros dentro del grupo Fungi con respecto al inicio (IFL) (6h-18h) y final de la fermentación larga (FFL) (22h-32h) y fermentación corta (FC) (5h-9h).....	24

Figura 11. Mapa de calor que representa la abundancia de secuencias de géneros dentro del grupo Fungi con asignación taxonómica (excluyendo el grupo de secuencias no identificadas) con respecto al inicio (IFL) (6h-18h) y final de la fermentación larga (FFL) (22h-32h) y fermentación corta (FC) (5h-9h).....	24
Figura 12. Abundancia relativa de genes encontrados en los metagenomas de microorganismos presentes en inicio, final (IFL-FFL), de la fermentación larga y fermentación corta (FC) utilizando la ortología KEGG (KO), basado en la abundancia de genes implicados en el metabolismo.	26
Figura 13. Dinámica de los cambios en la abundancia relativa del grupo bacteria asociado a la temperatura en las horas (6, 12, 18, 22, 27 y 32 h) en el inicio y final de la fermentación larga. La figura refleja los cambios en la abundancia relativa de los géneros más importantes, <i>Gluconobacter</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Acetobacter</i> y <i>Frateuria</i> . Las cifras se expresan en relación con el tiempo de muestreo, el porcentaje de abundancia relativa de los distintos géneros y los grados centígrados de temperatura.	27
Figura 14: Dinámica de los cambios en la abundancia relativa del grupo bacteria asociado al pH en las horas (6, 12, 18, 22, 27 y 32 h) en el inicio y final de la fermentación larga. La figura refleja los cambios en la abundancia relativa de los géneros más importantes, <i>Gluconobacter</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Acetobacter</i> y <i>Frateuria</i> . Las cifras se expresan en relación con el tiempo de muestreo, el porcentaje de abundancia relativa de los distintos géneros y los valores de pH.....	28
Figura 15. Dinámica de los cambios en la abundancia relativa del grupo fungi asociado a la temperatura en las horas (6, 12, 18, 22, 27 y 32 h) en el inicio y final de la fermentación larga. La figura refleja los cambios en la abundancia relativa de los géneros más importantes, <i>Hanseniaspora</i> , <i>Pichia</i> y <i>Starmerella</i> . Las cifras se expresan en relación con el tiempo de muestreo, el porcentaje de abundancia relativa de los distintos géneros y los grados centígrados de temperatura.....	29
Figura 16. Dinámica de los cambios en la abundancia relativa del grupo fungi asociado al pH en las horas (6, 12, 18, 22, 27 y 32 h) en el inicio y final de la fermentación larga. La figura refleja los cambios en la abundancia relativa de los géneros más importantes, <i>Hanseniaspora</i> , <i>Pichia</i> y <i>Starmerella</i> . Las cifras se expresan en relación con el tiempo de muestreo, el porcentaje de abundancia relativa de los distintos géneros y los valores de pH.....	29

Figura 17: Abundancia relativa de los grupos químicos volátiles detectados en los cafés en el inicio de la fermentación larga (IFL), final de la fermentación larga (FFL) y fermentación corta (FC).....	31
Figura 18: Dinámica de los cambios en la abundancia relativa de los compuestos volátiles según horas de colecta (6, 12, 18, 22, 27 y 32 h) en el inicio y final de la fermentación larga. La figura (a) refleja los cambios en la abundancia relativa del grupo funcional aldehído. La figura (b) expresa los cambios en la abundancia relativa de los compuestos pertenecientes a los grupos funcionales furanos, alcoholes y cetonas. Las cifras se expresan en relación con el tiempo de muestreo y el porcentaje de abundancia relativa de los distintos compuestos.....	33
Figura 19: Mapa de calor del análisis de correlación del grupo Bacteria y los compuestos volátiles presentes en el inicio de la fermentación larga (IFL).	35
Figura 20. Mapa de calor del análisis de correlación del grupo Bacteria y los compuestos volátiles presentes en el proceso final de la fermentación larga (FFL).	36
Figura 21. Mapa de calor del análisis de correlación del grupo Bacteria y las rutas metabólicas presentes en el inicio de la fermentación larga (IFL).	37
Figura 22. Mapa de calor del análisis de correlación del grupo Bacteria y las rutas metabólicas presentes en el final de la fermentación larga (FFL).	38
Figura 23. Mapa de calor del análisis de correlación del grupo Fungi y los compuestos volátiles presentes en el inicio de la fermentación larga (IFL).....	39
Figura 24: Mapa de calor del análisis de correlación del grupo Fungi y los compuestos volátiles presentes al final de la fermentación larga (FFL)	40
Figura 25: Mapa de calor del análisis de correlación del grupo Fungi y las rutas metabólicas presentes en el inicio de la fermentación larga (IFL)	41
Figura 26: Mapa de calor del análisis de correlación del grupo Fungi y las rutas metabólicas presentes en el final de la fermentación larga (FFL)	42
Figura 27: Gráfico del análisis de componentes principales de los compuestos volátiles durante los procesos de fermentación cortos (5h-9h) e inicio (6h-18h) y final de la fermentación larga (22h-32h) con respecto al porcentaje de abundancia relativa: hexanal; benzaldehído; 2-butenal, 3-metil-; furano, 2-pentil-; alcohol feniletílico y 3-pentanona.	43

RESUMEN

El café es una de las bebidas más populares en el mundo y se le atribuye muchos beneficios a la salud, pero se requiere de varias etapas y procesos posteriores a la cosecha para transformar las cerezas en una taza de café. Uno de los procesos más importantes es el de fermentación que constituye un proceso importante en la producción de determinados sabores y olores por la interacción de las bacterias LAB y levaduras con capacidad de degradar macromoléculas y generar metabolitos secundarios como ésteres, alcoholes, cetonas entre otros. En esta investigación se identificaron los microorganismos y los compuestos volátiles asociados al proceso de fermentación. Para ello, se colectaron muestras de café en proceso de fermentación procedentes de las regiones de Cajamarca y Amazonas, cuyos procesos de fermentación fueron largos (32 horas) y corta (10 horas), respectivamente. El análisis metagenómico permitió la identificación de 14 géneros correspondientes al grupo bacteria *Gluconobacter*, *Leuconostoc*, *Acetobacter*, *Frateuria*, *Sphingobacterium*, *Tatumella*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Novosphingobium*, *Mycobacterium*, *Escherichia*, *Stenotrophomonas* y 6 géneros correspondientes al grupo fungi: *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Starmerella*, *Lachancea*, *Penicillium* y *Fusarium*; además de 2 grupos asignados como Ba_Unidentified y Eu_Unidentified, que correspondieron a microorganismos (bacterias y eucariotas cuyas secuencias) sin identificación. El análisis de cromatografía de gases permitió la identificación de 157 compuestos volátiles categorizados en: 3 ácidos, 13 alcoholes, 16 aldehídos, 13 alcanos, 2 hidrocarburos aromáticos, 5 bencenos, 24 ésteres, 1 éter, 2 furanos, 10 cetonas, 2 pirazinas, 9 terpenos y otros 57 compuestos cuyo grupo funcional no fue asignado.

Palabras clave: Café, cromatografía de gases, fermentación, metagenómica microorganismos

ABSTRACT

Coffee is one of the most popular beverages in the world and its production requires several stages and processes after the harvest to transform the cherries into a cup of coffee. One of the most important process is the fermentation, because of the production of certain flavors and odors due to the interaction of bacteria and yeasts with the capacity to degrade macromolecules and generate secondary metabolites such as esters, alcohols, ketones, among others. In this research, the microorganisms and volatile compounds associated with the fermentation process were identified. For this purpose, coffee samples from two fermentation times were collected, a long fermentation process from Cajamarca (32 hours) and a short fermentation process from Amazonas (10 hours). The metagenomic analysis allowed the identification of 14 genera corresponding to the bacterial group *Gluconobacter*, *Leuconostoc*, *Acetobacter*, *Frateuria*, *Sphingobacterium*, *Tatumella*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Novosphingobium*, *Mycobacterium*, *Escherichia*, *Stenotrophomonas* and 6 genera corresponding to the fungi group: *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Starmerella*, *Lachancea*, *Penicillium* and *Fusarium*; in addition to two groups assigned as Ba_Unidentified and Eu_Unidentified that corresponded to unidentified bacterial and eukaryotic microorganisms. The gas chromatography analysis identified 157 volatile compounds categorized into: 3 acids, 13 alcohols, 16 aldehydes, 13 alkanes, 13 alkanes, 2 aromatic hydrocarbons, 5 benzenes, 24 esters, 1 ether, 2 furans, 10 ketones, 2 pyrazines, 9 terpenes, and 57 other compounds whose functional group was not assigned.

Key words: Coffee, fermentation, gas chromatography, metagenomics, microorganisms

I. INTRODUCCIÓN

Una de las bebidas más populares a nivel mundial es el café, con más de 148 millones de tazas consumidas anualmente (ICO, 2018). Pese a la pandemia generada por la Covid-19, las exportaciones mundiales de café han ascendido a 11,4 millones de sacos en abril del 2021, en comparación con los 11,29 millones de sacos en abril del 2020 (ICO, 2021). Esta producción abarca al alrededor de 170 países productores de café y al consumo del mismo en casi todas las naciones (Rodrigues y Florencio, 2020). Al café, la bebida más popular del mundo, se le atribuye muchos beneficios a la salud, tales como efectos antibióticos, antiinflamatorios, hepatoprotectores y antioxidantes (Janisenn y Huynh, 2018), así como propiedades estimulantes (Ballesteros et al., 2014).

En Sudamérica, los países con mayor producción de café son Brasil y Colombia con 63 400 sacos y 14 300 sacos respectivamente, seguidos de Perú con 3794 sacos de 60 kg (ICO, 2021). En el Perú, según el último censo nacional agropecuario, el café se posiciona como el principal producto agrícola de exportación, destacando las regiones de Junín, San Martín, Cuzco, Huánuco, Pasco, Cajamarca y Amazonas, quienes concentran el 91% del total de productores y del área cultivable (425 400 ha) (INEI, 2012).

Se requieren de varias etapas y procesos posteriores a la cosecha para transformar las cerezas del café hasta una taza de café (Zhang et al., 2019), siendo uno de ellos el proceso de fermentación, el cual tiene como objetivo principal, eliminar el mucílago de las semillas y reducir el contenido de agua (Silva et al., 2013). La fermentación es uno de los pasos primarios asociados al impacto en la calidad del café, incluido el sabor y el aroma (Silva et al., 2000; Knopp et al., 2006), ya que se encuentra relacionado a la formación de precursores de aroma y sabor, mediante la interacción entre las actividades microbianas y el metabolismo endógeno del grano (Vaast et al., 2006).

Diversas investigaciones han demostrado que la ecología microbiana de la fermentación de los granos de café, involucra a una amplia gama de grupos

microbianos que incluyen bacterias ácido láctico (LAB), bacterias de ácido acético (AAB), *Bacillus*, Enterobacterias, levaduras y hongos filamentosos (Vaughn et al., 1958; Masoud et al., 2004; Silva et al., 2008; Vilela et al., 2010; Pereira et al., 2014; De Oliveira et al., 2019; Elhali et al., 2020), además de microorganismos que se originan en el medio ambiente (Evangelista et al., 2015; Lee et al., 2015).

Generalmente, el proceso de fermentación dura entre 12 y 72 horas (Brando & Brando, 2014) y está conformada por tres fases: mesofílica, termofílica y maduración (Hadiwidodo et al., 2019), dando como resultado no solo un cambio microbiano sino también de la composición química de los granos verdes de café, brindando atributos sensoriales distintos en la taza ya elaborada (De Bruyn et al., 2017; Zhang et al., 2019). Análisis microscópicos y estudios de marcadores moleculares establecen que menos del 1% de los microorganismos pueden identificarse y cultivarse empleando técnicas microbiológicas de rutina (Cocolin et al., 2011, Sharma et al., 2020). Como consecuencia, usar solamente métodos microbiológicos convencionales no es la mejor opción para estudiar la diversidad de organismos en los procesos fermentativos (Rajapaksha et al., 2018; Alam et al., 2021; Saide et al., 2021), debido a que i) se presentan desafíos para aislar únicamente el microorganismo de interés (Lee et al., 2013; Lewis et al., 2020), ii) la gran mayoría de los microorganismos no son cultivables en el entorno del laboratorio (Kaeberlein et al., 2002; Basu et al., 2015; Ma y Kim, 2018), y iii) es difícil reproducir y mantener las estrictas condiciones para el crecimiento (como los requisitos de nutrientes y pH óptimo) (Vartoukian et al., 2010; Stewart, 2012; Duquenne, 2017; Lim et al., 2020).

En los últimos años, el análisis metagenómico ha permitido estudiar comunidades de microorganismos directamente en sus entornos naturales, evitando la necesidad de aislarlos y cultivarlos en laboratorio (Chen y Patcher, 2005; Bilal et al., 2018; Lapidus y Korobeynikov, 2021). Diversas investigaciones basadas en técnicas moleculares demostraron la presencia de levaduras como: *Candida parapsilosis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia*

guilliermondii y *Hanseniaspora opuntiae*, al principio y al final del proceso de fermentación del café lavado y no lavado en Brasil (Evangelista et al., 2014).

La fermentación constituye un proceso importante en la producción y determinación de sabores y aromas del café (Lee et al., 2015), ya que existe interacción de las LAB y levaduras con capacidad de degradar macromoléculas como los polisacáridos, además de la producción de metabolitos secundarios como ésteres, alcoholes, cetonas y otros compuestos aromáticos que contribuyen al sabor y aroma del café (Avallone et al., 2001; 2002). Estos aromas se generan a causa de los compuestos volátiles, cuya formación se debe tanto a los compuestos de los granos inertes y también a los metabolitos microbianos formados durante la fermentación (Yeretzian et al., 2002).

Estos compuestos volátiles pueden ser identificados mediante cromatografía de gases. Evangelista et al., (2014); evaluaron los compuestos volátiles presentes en la fermentación y en el café tostado; encontrando compuestos volátiles como cetonas (2,3-butanodiona; 2-nonanone), alcoholes (methanol; 1-propanol; 1-butanol; 2-heptanol), aldehídos (acetaldehído; butiraldehído; hexanal; octanal) y ácidos (ácido isobutírico; ácido hexanoico; ácido decanoico), donde los alcoholes fueron los compuestos más abundantes (11–27%) seguidos de furanos en granos tostados (~ 27%) y aldehídos (~ 13%) en granos verdes.

En ese sentido, la presente investigación tuvo como objetivo general caracterizar biológica y químicamente el fermentado espontáneo de café (*Coffea arabica*) de la región Amazonas. En referencia a ello, se trabajaron los siguientes objetivos específicos: 1. Determinar la composición de especies bacterianas y fúngicas presentes en el fermentado espontáneo de café usando análisis metagenómicos; 2. Identificar y cuantificar los compuestos volátiles presentes en el fermentado espontáneo de café usando cromatografía; 3. Discutir el impacto de este estudio en la sostenibilidad de la producción de café en Amazonas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Área de estudio

Se incluyeron fincas cafetaleras pertenecientes al distrito de La Peca, en la provincia de Bagua, distrito de Lonya Grande, provincia de Utcubamba y distrito de San Nicolás, y provincia de Rodríguez de Mendoza (región Amazonas), así como las fincas de los distritos de Chirinos y La Coipa, ambos en la provincia de San Ignacio (región Cajamarca) (Figura 1). Se incluyeron muestras de la provincia de San Ignacio, departamento de Cajamarca, por ser considerados cafés de alta calidad en los años 2018 y 2019, además de haber sido galardonados con premios en taza excelencia (CAFELAB, 2018; 2019). Estas muestras sirvieron para comparar las diferencias con los cafés de Amazonas.

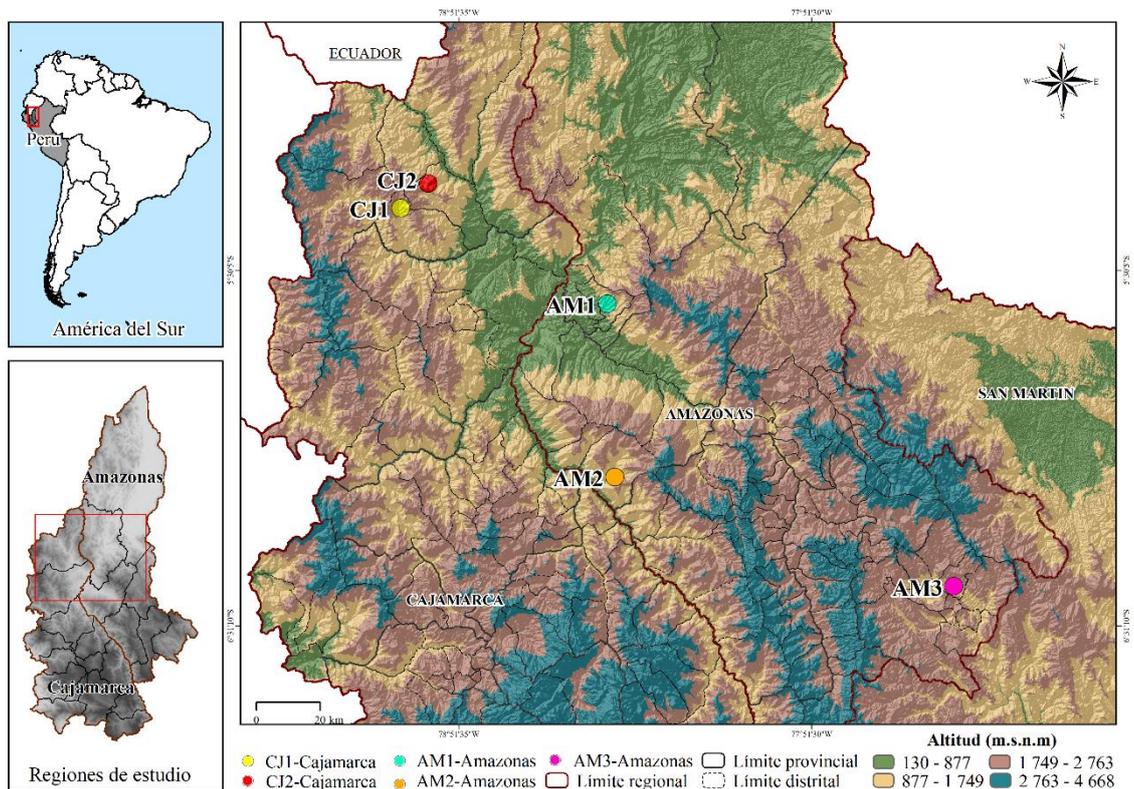


Figura 1. Puntos de colecta de material muestral para análisis biológico y químico ubicados en Amazonas (AM1: distrito de La Peca, AM2: distrito de Lonya Grande y AM3: distrito de San Nicolás) y Cajamarca (CJ1: distrito de Chirinos y CJ2: distrito de La Coipa). Se muestran las altitudes a las que fueron colectados.

El tiempo de fermentación entre Cajamarca y Amazonas no es constante y depende principalmente del criterio del agricultor. Por otro lado, debido a las dificultades logísticas presentadas (p.e., mal estado de las carreteras, mala señal de telefonía para comunicación constatare con agricultores, etc.), se arribó a las fincas cuando el proceso de fermentación ya había comenzado, por lo que las muestras de fermento de café se colectaron a diferentes horas en las regiones de Cajamarca y Amazonas. Sin embargo, se decidió seguir con la colecta de muestras, ya que el objetivo de este estudio fue estudiar la composición de microorganismos (caracterización biológica) y compuestos volátiles (caracterización química) en los fermentos de café, información que es escasa en esta parte del Perú. En Cajamarca, las muestras se colectaron a las 6, 12 y 18 horas (en el distrito de La Coipa) y a las 22, 27 y 32 horas para cafés (en el distrito Chirinos), en tanto, en Amazonas, se colectaron a las 5 y 9 horas en los distritos de La Peca (provincia Bagua) y Lonya Grande (provincia Utcubamba), y a las 22, 27 y 32 horas en el distrito San Nicolás (provincia Rodríguez de Mendoza).

Estas horas corresponden a las horas consideradas propicias para el crecimiento de microorganismos (Avallone et al., 2001), concebidas en las fases de fermentación mesofílica, termofílica y maduración (Hadiwidodo et al., 2019). Se colectaron 600 g de muestras de café en proceso de fermentación, midiendo a su vez los parámetros de temperatura (°C) y pH del fermento. Los granos se homogenizaron en el recipiente de fermentación, posteriormente se colocaron en bolsas de plástico estériles (Evangelista et al., 2014), y fueron conservados en nitrógeno líquido hasta iniciar el proceso de extracción de ADN y de compuestos volátiles en el laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal (FISIOBVEG), Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.



Figura 2. Colecta de muestras en la Finca Bombón, distrito de La Peca, Provincia de Bagua, región Amazonas.



Figura 3. Colecta de muestras en la Finca La Palma, distrito de Chirinos, Provincia de San Ignacio, región Cajamarca.



Figura 4. Colecta de muestras en la Finca Laurel, distrito de La Coipa, Provincia de San Ignacio, región Cajamarca.

2.2. Caracterización biológica

2.2.1. Análisis metagenómico

a) Preparación de la muestra

La preparación de la muestra se realizó en el área de Biología Molecular y Genómica del laboratorio FISIOBVEG de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza. Se agregó 800 μL de agua libre de nucleótidos a las muestras de café en proceso de fermentación y se procedió a homogenizar. Luego se extrajo 600 μL de la muestra y se agregó a un microtubo de 2 mL para realizar la extracción de ADN metagenómico.

b) Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se usó el kit comercial ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (Zymo Research, Irvine, California, USA), según las instrucciones del fabricante.

✓ Se añadió la muestra a los ZR BashingBead Lysis Tubes (0,1 y 0,5 mm) y luego se agregó 750 μL de ZymoBIOMICS Lysis Solution.

✓ Se agitó los tubos por un tiempo mayor o igual a 5 minutos.

✓ Se centrifugó los ZR BashingBead Lysis Tubes (0,1 y 0,5 mm) a $\geq 10000 \times g$ por 1 minuto.

- ✓ Se transfirió 400 μ L del sobrenadante al Zymo-Spin III-F Filter en un tubo de colecta, luego se centrifugó a 8000 x g por 1 minuto, luego se descartó el Zymo-Spin III-F Filter.
- ✓ Se agregó 800 μ L de ZymoBIOMICS DNA Binding Buffer y 400 μ L de etanol al 95% al filtrado en el tubo, se mezcló con la pipeta.
- ✓ Se transfirió 800 μ L de la mezcla a Zymo-Spin IIC-R Column en un nuevo tubo de colecta, se centrifugó a 10000 x g por 1 minuto.
- ✓ Se descartó el líquido sobrante y se repitió el paso.
- ✓ Se agregó 400 μ L de ZymoBIOMICS DNA Wash Buffer 1 al Zymo-Spin IIC-R Column en un nuevo tubo de colecta y se centrifugó a 10000 x g por 1 minuto. Se descartó el sobrante.
- ✓ Se agregó 700 μ L de ZymoBIOMICS DNA Wash Buffer 2 a Zymo-Spin IIC-R Column en el tubo de colección y se centrifugó a 10000 x g por 1 minuto. Se descartó el sobrante.
- ✓ Se procedió a agregar 200 μ L de ZymoBIOMICS DNA Wash Buffer 2 a Zymo-Spin IIC-R Column en el tubo de colecta y se centrifugó a 10000 x g por 1 minuto.
- ✓ Se transfirió la Zymo-Spin IIC-R Column a un tubo para centrifuga de 1,5 mL y luego se añadió 100 μ L (50 μ L mínimo) de ZymoBIOMICS DNase/RNase Free Water, directo hacia la matriz, luego se incubó por 1 minuto. Se centrifugó a 10000 x g por 1 minuto para diluir el ADN.
- ✓ Se colocó Zymo-Spin III-HRC Filter en un nuevo tubo de colecta y se añadió 600 μ L de ZymoBIOMICS HRC Prep Solution. Se centrifugó a 8000 x g por 3 minutos.
- ✓ Finalmente se transfirió todo el eluido de ADN a la Zymo-Spin III-HRC Filter preparado, en un tubo para microcentrífuga limpio de 1,5 mL y luego se centrifugó a 16000 x g por 3 minutos.

c) Secuenciamiento de ADN metagenómico

La calidad del ADN extraído se determinó cuantitativamente mediante corridas en geles de agarosa (1%) (Tineo et al., 2020). Adicionalmente, el ADN genómico extraído fue evaluado cuantitativamente mediante el kit Qubit™ dsDNA BR Assay (Invitrogen, Carlsbad CA) (Tineo et al., 2020). La construcción y secuenciación de la biblioteca PE Illumina de 150 pb fue realizada comercialmente por myGenomics LLC (Georgia, USA). En donde el ADN genómico fue cuantificado mediante mediciones de densidad óptica en NanoDrop y Qubit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA EE. UU.). La calidad del ADN se evaluó en electroforesis en gel de agarosa y en TapeStation Agilent. Para la preparación de las librerías, el ADN genómico fue fragmentado y ligado a adaptadores únicos utilizando el kit de preparación de la biblioteca Swift 2S Turbo DNA (Swift Bioscience, Ann Harbor, MI, EE. UU.). La librería resultante fue probada para la distribución del tamaño y la concentración usando nuevamente Qubit y TapeStation. Las librerías fueron secuenciadas masivamente en una NextSeq 500 (Illumina, San Diego, CA) de acuerdo al protocolo estándar. Se generaron al menos 20 millones de reads pareados y se verificó la calidad de los mismos utilizando FASTQC (Babraham Institute, Cambridge, Reino Unido). Los datos RAW de la secuencia fueron depositados en el Archivo Europeo de Nucleótidos (ENA) bajo el bioproyecto MGYS00005613 y los números de acceso ERS4539875-ERS4539887.

d) Análisis bioinformático

En el preprocesamiento de los datos se empleó FASTQC (v0.11.9) para el análisis de calidad (Andrews, 2010) y la eliminación de adaptadores con Trimmomatic (v. 0.039) con un valor de phred \leq 25 (Martin, 2011). Además, la alineación con BOWTIE2 (v. 2.3.4.3) (Langmead y Salzberg, 2012) filtró los pares de lecturas

que no se mapeaban en *C. arabica* (genoma de NCBI Cara 1.0 voucher GCF003713225).

Los análisis taxonómicos como los funcionales de las lecturas metagenómicas en bruto fueron ejecutados siguiendo el proceso establecido en MGnify (Mitchell et al., 2020). Para los análisis taxonómicos, las secuencias de extremos emparejados se fusionaron con SeqPrep (v1.2) (Lindgreen, 2012) y fueron sometidos a un control de calidad (QC), recortando las regiones de secuenciación de baja calidad con Trimmomatic (0.36) (Bolger et al., 2014) y eliminando las secuencias de menos de 100 nucleótidos de longitud. Los conjuntos de datos se compararon con los modelos LSU de Rfam (v13.0) (Kalvari et al., 2018), con un análisis realizado en las secuencias coincidentes utilizando las bases de datos MAPseq (v1.2.3) (Rodrigues et al., 2017) y SILVA (v132) (Quast et al., 2013). Los resultados de los marcadores LSU se visualizaron en el sitio web de MGnify como gráficos Krona, gráficos de barras y tablas (Ondov et al., 2011). La identificación de genes diferencialmente abundantes se basó en KEGG (Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto) Orthology (Parks y Beiko, 2010). La base de datos KO (KEGG Orthology) contiene datos moleculares representadas en términos de ortólogos funcionales. Siendo este definido en: redes moleculares KEGG, mapas de vías KEGG, jerarquías BRITE y módulos KEGG. A cada nodo se le asignó un identificador KO (número K) definido a partir de genes y proteínas de organismos específicos, que fueron usados para asignar genes ortólogos en nuestros organismos basados en la similitud de sus secuencias.

2.3. Caracterización química

2.3.1. Análisis cromatográfico

a) Preparación de la muestra

La preparación de la muestra se realizó en el área de Cromatografía del laboratorio FISIOLVEG de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza. Granos de café en proceso de fermentación

congelados con nitrógeno líquido, fueron cortados con ayuda de un bisturí y luego triturados empleando un mortero y pistilo. Se pesaron aprox. 2 g del material triturado en viales de vidrio por triplicado haciendo uso de una balanza (Eurotech, Alemania) (Figura 5).

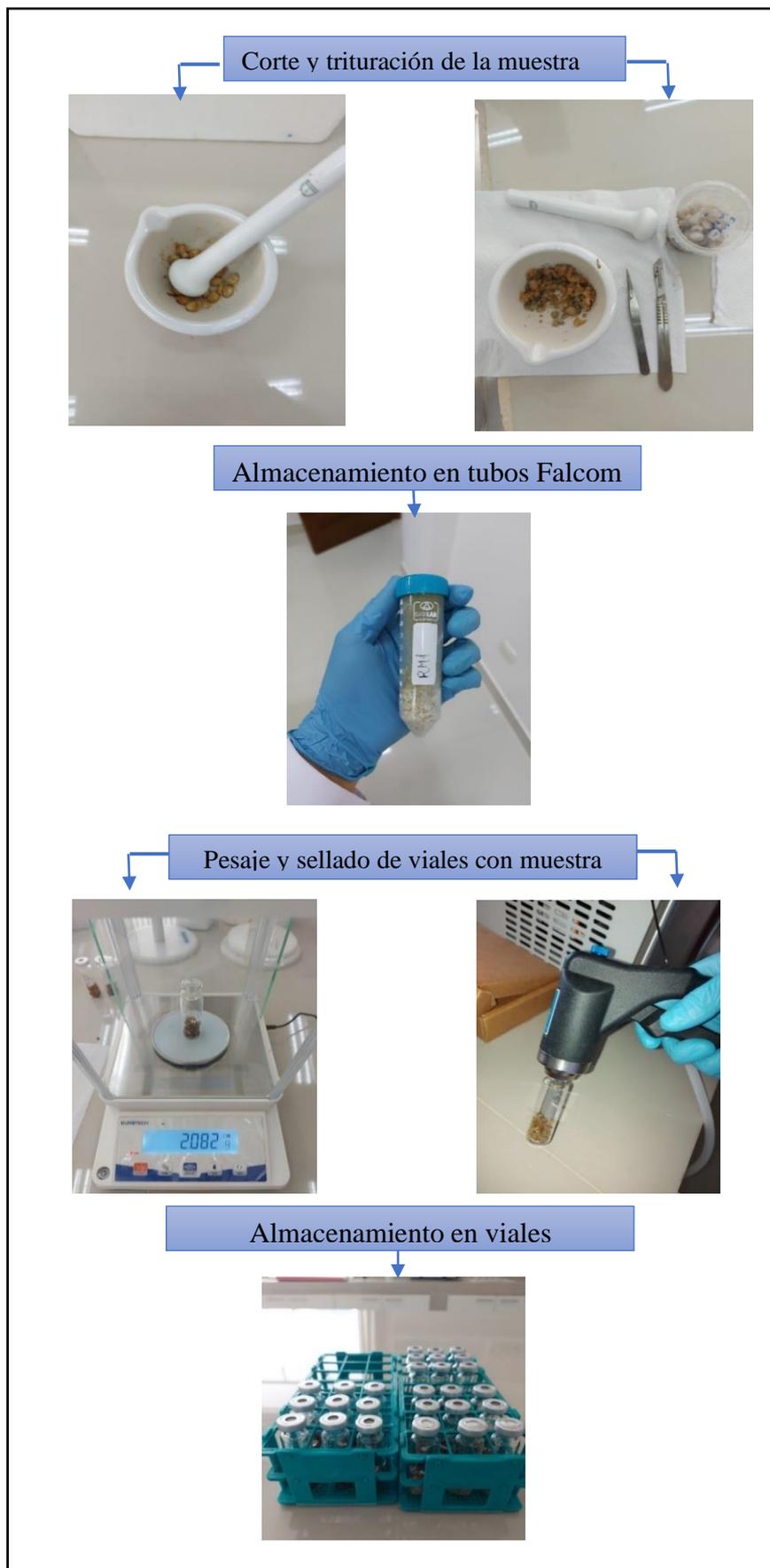


Figura 5. Preparación de la muestra para el análisis cromatográfico.

b) Extracción de compuestos volátiles

Los compuestos volátiles se extrajeron mediante la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) y se analizaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Se utilizó una fibra de 50/30 mm de divinilbenceno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) (Supelco Co., USA) para extraer los compuestos volátiles de la muestra. Se empleó un tiempo de equilibrio de 15 min a 50 °C y luego se expuso la fibra durante 45 min a la misma temperatura (Lee et al., 2017). Los compuestos se analizaron utilizando un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies, 7890B GC System, USA) equipado con un detector de masas (Agilent Technologies 5977B MSD) y una columna capilar DB-5MS UI (60 m x 0,25 µm de diámetro x 1 µm de espesor de empaquetamiento) (Lee et al., 2012). La programación de la temperatura se inició con 50 °C hasta 170 °C a 3 °C/min y se incrementó hasta 250 °C a 8 °C/min (Lee et al., 2017). Las temperaturas del inyector y del detector se mantuvieron a 250 °C. Se empleó helio (He) como gas portador a un flujo de 1,5 mL/min. Las inyecciones se realizaron exponiendo la fibra durante 4 min. Los compuestos volátiles se identificaron mediante la comparación de los espectros de masas de cada compuesto de la muestra y la base de datos de la biblioteca NIST 2017. La identidad de los compuestos se confirmó mediante la inyección del estándar de n-alcano (C10 a C40) y la comparación de sus índices de retención. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

2.4. Análisis estadístico de datos

Elaboración de mapas de calor (Heatmap)

Se realizaron mapas de calor para representar las abundancias relativas de los microorganismos y compuestos volátiles por hora de colecta. La elaboración de mapas de calor se realizó empleando las bibliotecas Pheatmap, grid, ggplot2, Colorspace y RcolorBrewer en el software Rstudio v4.1 (Zapala y Schork, 2006; Zhao et al., 2014).

Análisis de correlación

El análisis de correlación de Pearson entre la abundancia relativa de secuencias de microorganismos con la abundancia relativa de compuestos volátiles y la abundancia relativa de genes expresados en sus vías metabólicas, se realizó utilizando el software Rstudio v4.1, para correlaciones significativas (coeficiente de correlación Pearson, $|r|>0,8$) (McKenzie et al., 2016; Han et al., 2021). Los coeficientes de correlación fueron representados en mapas de calor.

Análisis de Componentes Principales (PCA)

Los datos de los compuestos volátiles relacionados con las características organolépticas se analizaron estadísticamente mediante el análisis de componentes principales (PCA) utilizando las bibliotecas Stats, FactoMineR, factoextra y ggplot2 en el software Rstudio v4.1 (Evangelista et al., 2014; Kim et al., 2019; Li et al., 2019). Se construyó una matriz $m \times n$ con el porcentaje relativo de las áreas relativas de los “n” picos cromatográficos identificados para las diferentes muestras (Evangelista et al., 2014). Los datos se escalaron automáticamente.

2.5. Implicancias de la investigación en la sostenibilidad del cultivo de café

Los distintos ambientes asociados a los microorganismos presentan muchos desafíos, de hecho, la mayor parte del bioma que se encuentra en nuestro planeta es microbiana, lo que los hace foco de estudio (Daniel, 2005). No obstante, existen aún diversos desafíos que vencer en el estudio de ellos mediante la metagenómica, para así poder acceder a toda la diversidad microbiana, conocer sus genomas, relaciones filogenéticas o sus capacidades metabólicas. Es por ello que, en base a una revisión bibliográfica, se discutieron las implicancias de la presente investigación en la sostenibilidad del cultivo de café, dándole un especial énfasis en los enfoques social, económico y ambiental. Además, se plantearon los distintos desafíos que se deben superar, así como nuevas oportunidades biotecnológicas que salen a relucir utilizando esta herramienta.

III. RESULTADOS

3.1. Recuento de resultados obtenidos

A pesar que se realizaron las colectas de fermentos de café en dos fincas de Cajamarca (provincias de San Ignacio) y tres fincas de Amazonas (provincias de Bagua, Utcubamba y Rodríguez de Mendoza), no todas las muestras pudieron ser incluidas en los análisis biológicos y químicos posteriores.

Las muestras provenientes de las provincias de Utcubamba y Rodríguez de Mendoza tuvieron que ser excluidas de los análisis, ya que para el análisis metagenómico no se obtuvieron concentraciones óptimas de ADN, por lo que las muestras no pasaron al proceso de secuenciamiento; mientras que en el análisis cromatográfico no se obtuvieron porcentajes de compatibilidad mayores al 80%.

Por la problemática de la pandemia del SARS-CoV-2, no se pudo volver a coleccionar muestras de fermento de las fincas excluidas. Por esta razón, en este estudio se realizó la caracterización biológica y química de fermentos de café de: i) la provincia de San Ignacio, con fermentos colectados a las 6, 12 y 18 horas, denominado inicio de fermentación larga (IFL) y a las 22, 27 y 32 horas, denominado fin de fermentación larga (FFL), y ii) la provincia de Bagua, con fermentos colectados a 5 y 9 horas, proceso que se denominó fermentación corta (FC).

Tabla 01: Resumen dicotómico de resultados obtenidos en los análisis biológico y químico.

Puntos de colecta (Provincia)	Resultados obtenidos de análisis de laboratorio			
	Análisis biológico (Metagenómica)		Análisis químico (Cromatografía)	
	SI	NO	SI	NO
San Ignacio, Cajamarca	X		X	
Bagua, Amazonas	X		X	
Utcubamba, Amazonas		X		X
Rodríguez de Mendoza, Amazonas	-	X	-	X

3.2. Parámetros fisicoquímicos

Los parámetros fisicoquímicos de pH y temperatura (T°) del café en proceso de fermentación fueron medidos para las fincas de Laurel, La Palma en Cajamarca, y Bombón en Amazonas. Los valores de pH en el inicio de la fermentación larga (IFL) fueron de 4,69; 4,04 y 3,71 a las 6, 12 y 18 horas, respectivamente; mientras que al final de la fermentación larga (FFL) se observó que el pH fue 3,74; 3,57 y 3,62 a las 22, 27 y 32 horas. En la fermentación corta (FC), los valores de pH fueron de 5,29 y 4,92 a las 5 y 9 horas, respectivamente. Por otra parte, los valores de temperatura (°C) en la fermentación larga (FL) fueron de 18,5; 17,3; 17,4; 22,6; 19,9 y 20,4 a las 6, 12, 18, 22, 27 y 32 horas respectivamente. A su vez en el proceso de fermentación corta (FC) la temperatura fue de 23 y 22,5 °C para las 5 y 9 horas, respectivamente.

Tabla 02: Parámetros fisicoquímicos de temperatura y pH correspondientes al café en proceso de fermentación, de las fincas Laurel, La Palma y Bombón.

FINCA	UBICACIÓN			HORA DE COLECTA (H)	DATOS DEL FERMENTO	
	Distrito	Provincia	Región		pH	Temperatura (°C)
Laurel	La Coipa	San Ignacio	Cajamarca	6	4.69	18.5
				12	4.04	17.3
				18	3.71	17.4
La Palma	Chirinos	San Ignacio	Cajamarca	22	3.74	22.6
				27	3.57	19.9
				32	3.62	20.4
Bombón	La Peca	Bagua	Amazonas	5	5.29	23.0
				9	4.92	22.5

3.3. Caracterización biológica

a) Diversidad microbiológica total

Para la identificación taxonómica de microorganismos asociados al proceso fermentativo del café se empleó el gen de rRNA de subunidad grande (LSU; 23S/28S). Dentro del grupo de las bacterias, en total se logró asignar 14 géneros: *Gluconobacter*, *Leuconostoc*, *Acetobacter*, *Frateuria*, *Sphingobacterium*, *Tatumella*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Novosphingobium*, *Mycobacterium*, *Escherichia*, *Stenotrophomonas*, además de un grupo asignado como “Ba_Unidentified”, el cual corresponde a microorganismos cuyas secuencias no coinciden con las anteriores mencionadas ni con otras secuencias de las bases de datos consultadas, por lo que se trataría de secuencias que corresponden a géneros aún no caracterizados y, por ende, no han sido asignados taxonómicamente.

El rol de las bacterias de ácido láctico (BAL) como *Leuconostoc*, *Frateuria*, *Lactobacillus*, *Weissella* en el fermento del café es el de emplear los azúcares del mucílago para producir metabolitos que intervienen en la calidad del café, especialmente el ácido láctico, que contribuye a la acidez del producto final, y mejora la producción de compuestos volátiles durante la fermentación húmeda (De Jesús et al., 2022). Además, la fermentación del ácido láctico juega un papel prometedor para la producción de cafés especiales con características sensoriales novedosas, siendo el principal ácido producido durante la fermentación (Wang et al., 2018).

Dentro del grupo fungi, en total se encontraron 6 géneros: *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Starmerella*, *Lachancea*, *Penicillium* y *Fusarium*, además de un grupo asignado como “Eu_Unidentified”, que al igual que el anterior grupo, corresponde a microorganismos cuyas secuencias no han sido asignadas taxonómicamente. Las levaduras del género *Hanseniaspora* y *Pichia* exhiben actividades enzimáticas relevantes para la fermentación del grano de café (Elhalis et al., 2020), ya que cumplen el rol de mejorar la producción y concentración de compuestos volátiles responsables del aroma específico (etanol, acetaldehído, acetato de etilo y acetato de isoamilo), disminuir la

producción de ácido láctico durante el proceso de fermentación. (De Melo Pereira et al., 2014), y modular la vía de las reacciones pirolíticas durante el tostado (Wang et al., 2020). Además, estas levaduras tienen un papel esencial en la prevención del crecimiento de hongos filamentosos oxigénicos y en el aumento de la producción de enzimas pectinolíticas, lo que ayuda a la degradación del mucílago y la pulpa del café (Silva, 2014). En este sentido son muy importantes también para prevenir el crecimiento de hongos filamentosos, especialmente los productores de Ocratoxina A (OTA) (Massawe y Lifa, 2010).

b) Diversidad microbiológica (Bacteria)

Abundancia relativa de secuencias del marcador LSU por tipo de fermentación

Se calculó la abundancia relativa de bacterias presentes en las muestras de café en proceso de fermentación según el número de secuencias identificadas. En el inicio de la fermentación larga (IFL) (en Cajamarca), se obtuvo la abundancia relativa de los siguientes géneros identificados: *Gluconobacter* (7,81%), *Frateriia* (7,81%), *Leuconostoc* (4,69%), *Tatumella* (3,13%), *Escherichia* (1,56%), no obstante, el grupo más representativo fue “Ba_Unidentified” con un 75,00% de las secuencias (Figura 6). Mientras que en la parte al final de la fermentación larga (FFL), las abundancias estuvieron dadas de la siguiente manera: *Gluconobacter* (7,84%), *Frateriia* (3,92%), *Leuconostoc* (2,94%), *Methylobacterium* (0,98%), con el grupo más abundante “Ba_Unidentified” con un 76,47% (Figura 6).

En el proceso de fermentación corta (FC) (en Amazonas) se obtuvo la siguiente distribución de los géneros identificados: *Gluconobacter* (7,05%), *Leuconostoc* (5,63%), *Sphingobacterium* (5,63%), *Lactobacillus* (4,23%), *Weissella* (4,23%), *Acetobacter* (2,82%), *Tatumella* (2,82%), *Pseudomonas* (2,82%), *Novosphingobium* (1,41%), *Mycobacterium* (1,41%), *Stenotrophomonas* (1,41%), y al igual que en el proceso de fermentación largo, aquí también destacó el grupo “Ba_Unidentified” con un 60,56% (Figura 6).

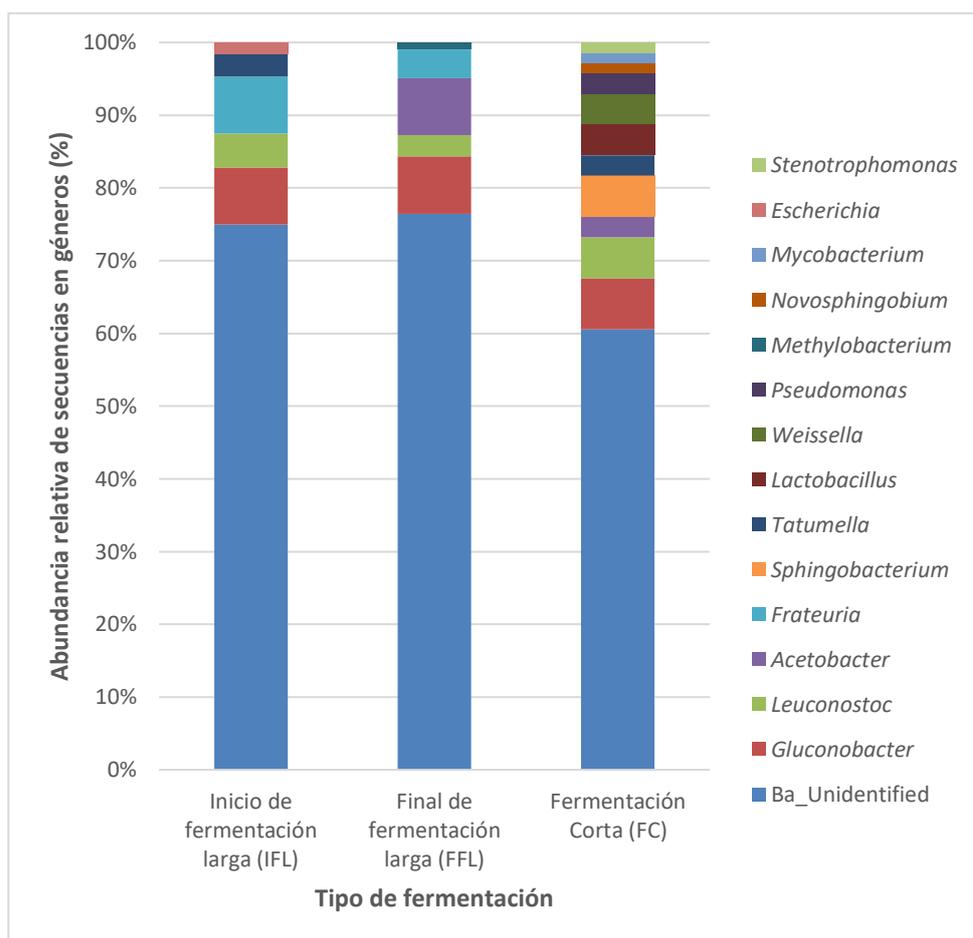


Figura 6. Abundancia relativa de secuencias de géneros dentro del grupo Bacteria con respecto al inicio de la fermentación larga (IFL), final de la fermentación larga (FFL) y fermentación corta (FC).

Abundancia relativa de secuencias del marcador LSU por hora

En todas las horas colectadas del proceso del inicio y final de la fermentación larga (IFL-FFL) (en Cajamarca), se obtuvo la siguiente distribución de los géneros por hora: lideró el grupo “*Ba_Unidentified*” con mayor número de secuencias: 72,22%; 81,82%; 70,38%; 73,08%; 81,08%; 74,36% a las 6, 12, 18, 22, 27 y 32 horas, respectivamente. Por otra parte, los valores máximos y mínimos de abundancia de secuencia en cada hora fueron de la siguiente manera: *Gluconobacter* (12,50% vs 4,55%) a las 18 y 12 horas, *Leuconostoc* (5,56% vs 2,56%) a las 6 y 32

horas, *Frateuria* (11,11% vs 2,56%) a las 6 y 32 horas, *Tatumella* (5,56% vs 4,17%) a las 6 y 18 horas. *Acetobacter* (12,82%), *Methylobacterium* (2,56%) solo estuvieron presentes a las 32h y *Escherichia* (4,55%) a las 12h (Figura 7-8).

En el proceso de fermentación corto (FC) (en Amazonas), se obtuvo la siguiente distribución de los géneros por hora: destacó el grupo “Ba_Unidentified”, con una abundancia relativa de 63,64% y 55,56% a las 5 y 9 horas, respectivamente. Mientras que el resto de géneros la abundancia relativa a las 5 y 9 horas fue la siguiente manera: *Gluconobacter* (9,09% vs 3,70%), *Leuconostoc* (4,55% vs 7,41%), *Acetobacter* (0,00% vs 7,41%), *Sphingobacterium* (6,82% vs 3,70%), *Tatumella* (2,27% vs 3,70%), *Lactobacillus* (2,27% vs 7,41%), *Weissella* (2,27% vs 7,41%), *Pseudomonas* (2,27% vs 3,70%), *Novosphingobium* (2,27% vs 0,00%), *Mycobacterium* (2,27% vs 0,00%) y *Stenotrophomonas* (2,27% vs 0,00%) (Figura 7-8).

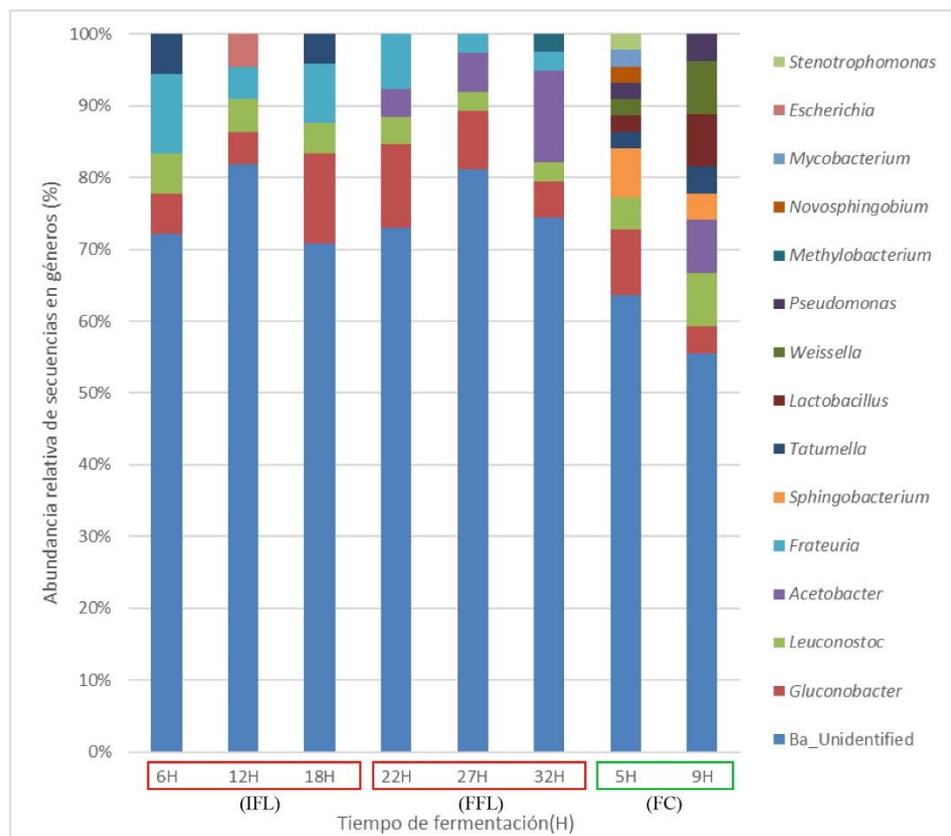


Figura 7. Abundancia relativa de secuencias de géneros dentro del grupo Bacteria con respecto al inicio (IFL) (6h-18h) y final de la fermentación larga (FFL) (22h-32h) y fermentación corta (FC) (5h-9h).

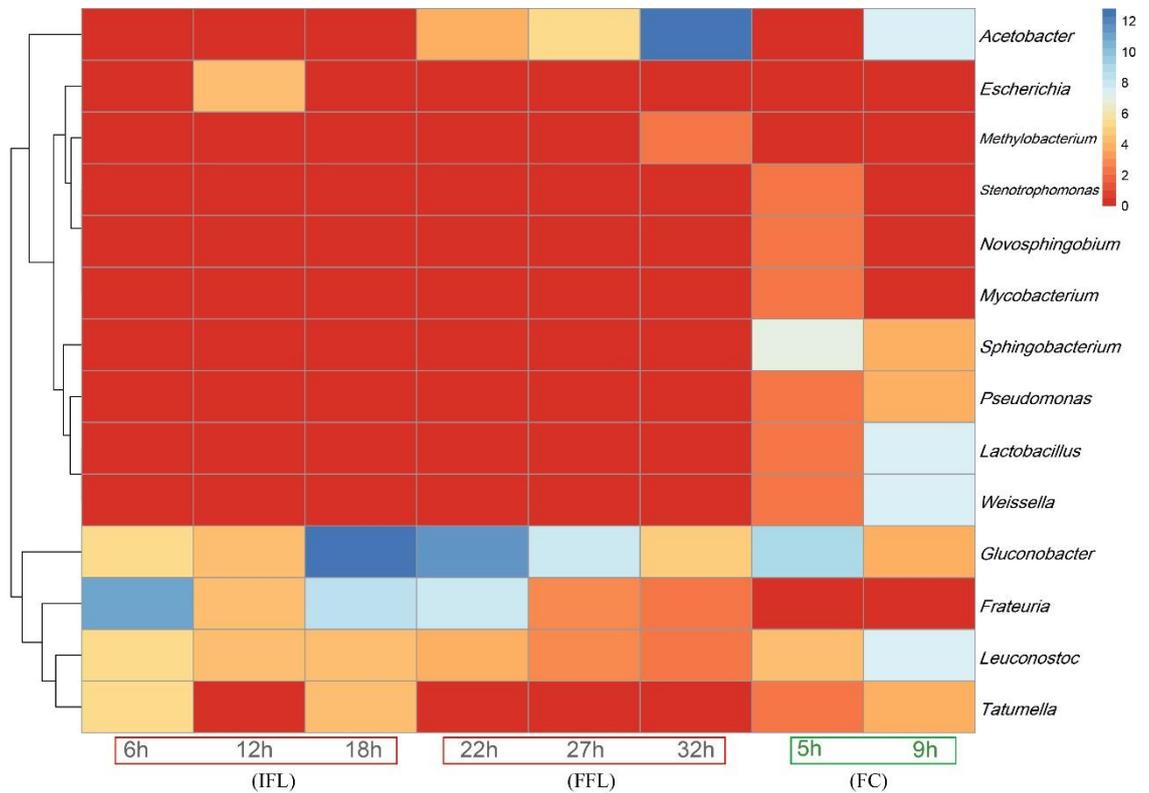


Figura 8. Mapa de calor que representa la abundancia relativa de secuencias de géneros con asignación taxonómica (excluyendo el grupo de secuencias no identificadas) dentro del grupo Bacteria con respecto al inicio (IFL)(6h-18h) y final de fermentación larga (FFL) (22h-32h) y fermentación corta (FC) (5h-9h).

c) Diversidad microbiológica (Fungi)

Abundancia relativa de secuencias del marcador LSU por tipo de fermentación

Se calculó la abundancia relativa de hongos presentes en las muestras de café en proceso de fermentación según el número de secuencias identificadas. En el inicio de la fermentación larga (IFL) (en Cajamarca), se obtuvo la abundancia relativa de los siguientes géneros

identificados: *Hanseniaspora* (36,36%), *Pichia* (13,64%), *Starmerella* (9,09%), no obstante, el grupo más representativo fue “Eu_Unidentified” con un 40,91% de las secuencias. Mientras que en la parte al final de la fermentación larga (FFL), las abundancias estuvieron dadas de la siguiente manera: *Hanseniaspora* (21,62%), *Pichia* (13,51%), *Starmerella* (13,51%) y *Lachancea* (8,11%), no obstante, el grupo más representativo fue “Eu_Unidentified” con un 43,24% (Figura 9).

En el proceso de fermentación corta (FC) (en Amazonas) se obtuvo la siguiente distribución de los géneros identificados: *Hanseniaspora* (10,53%), *Pichia* (5,26%), *Penicillium* (5,26%), *Fusarium* (5,26%), y al igual que en el proceso de fermentación largo, aquí también destacó el grupo “Eu_Unidentified” con un 73,68% (Figura 9).

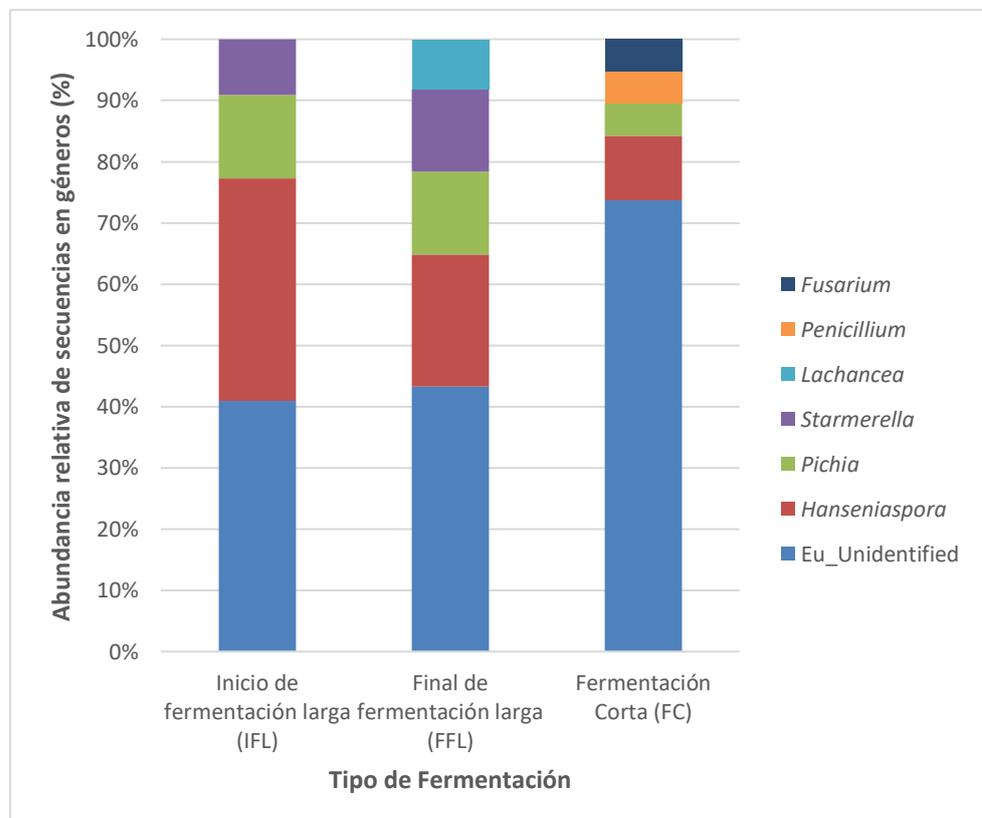


Figura 9. Abundancia de secuencias de géneros dentro del grupo Fungi con respecto al inicio de la fermentación larga (IFL), final de la fermentación larga (FFL) y fermentación corta (FC).

Abundancia de secuencias por del marcador LSU hora

En todas las horas colectadas del inicio (IFL) y final (FFL) de la fermentación larga (en Cajamarca), se calculó la abundancia relativa, obteniendo la siguiente distribución de los géneros por hora: lideró el grupo “Eu_Unidentified” con mayor número de secuencias: 37,50%, 55,56%, 20,00%, 41,67%, 33,33%, 53,85% a las 6, 12, 18, 22, 27 y 32 horas respectivamente. Por otra parte, los valores máximos y mínimos de abundancia de secuencia en cada hora fueron de la siguiente manera: *Hanseniaspora* (40,00% vs 15,38%) a las 18 y 32 horas, *Pichia* (25,00% vs 7,69%) a las 6 y 32 horas, *Starmerella* (20,00% vs 7,69%) a las 18 y 32 horas, *Lachancea* (15,38% vs 8,33%) a las 32 y 27 horas (Figura 10-11).

En el proceso de fermentación corta (FC) (en Amazonas) se obtuvo la siguiente distribución de los géneros por hora: destacó el grupo “Eu_Unidentified”, 70,00% y 77,78%, mientras que el resto de valores fueron de la siguiente manera: *Hanseniaspora* (10,00% vs 11,11%), *Pichia* (00,00% vs 11,00%), *Penicillium* (10,00% vs 0,00%), *Fusarium* (10,00% vs 0,00%), todos a las 5 y 9 horas respectivamente (Figura 10-11).

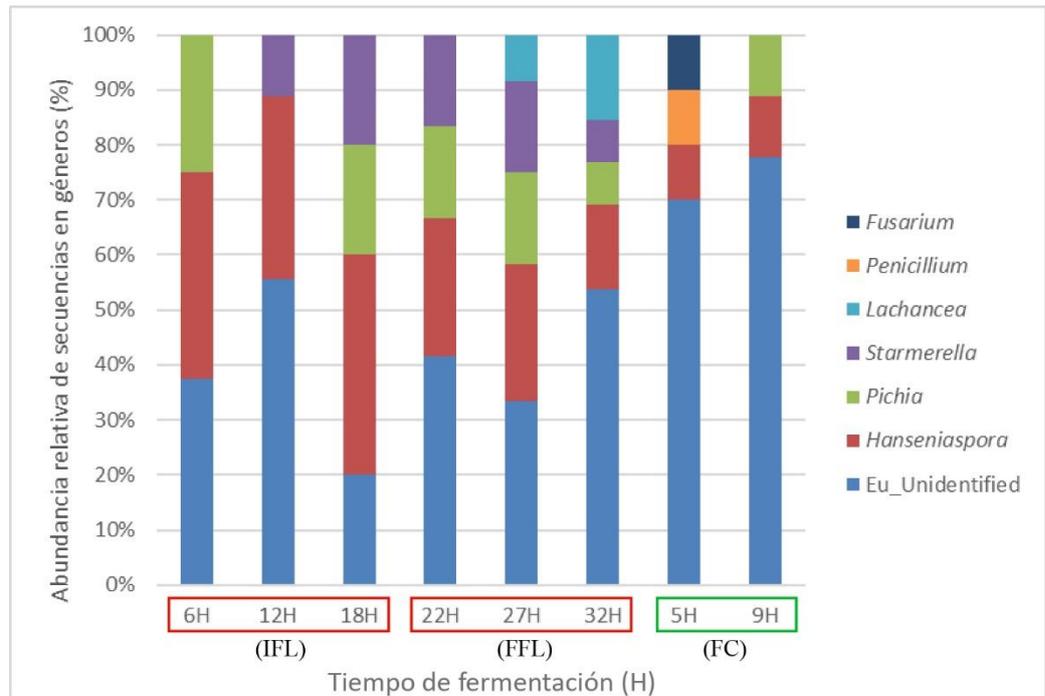


Figura 10. Abundancia de secuencias de géneros dentro del grupo Fungi con respecto al inicio (IFL) (6h-18h) y final de la fermentación larga (FFL) (22h-32h) y fermentación corta (FC) (5h-9h).

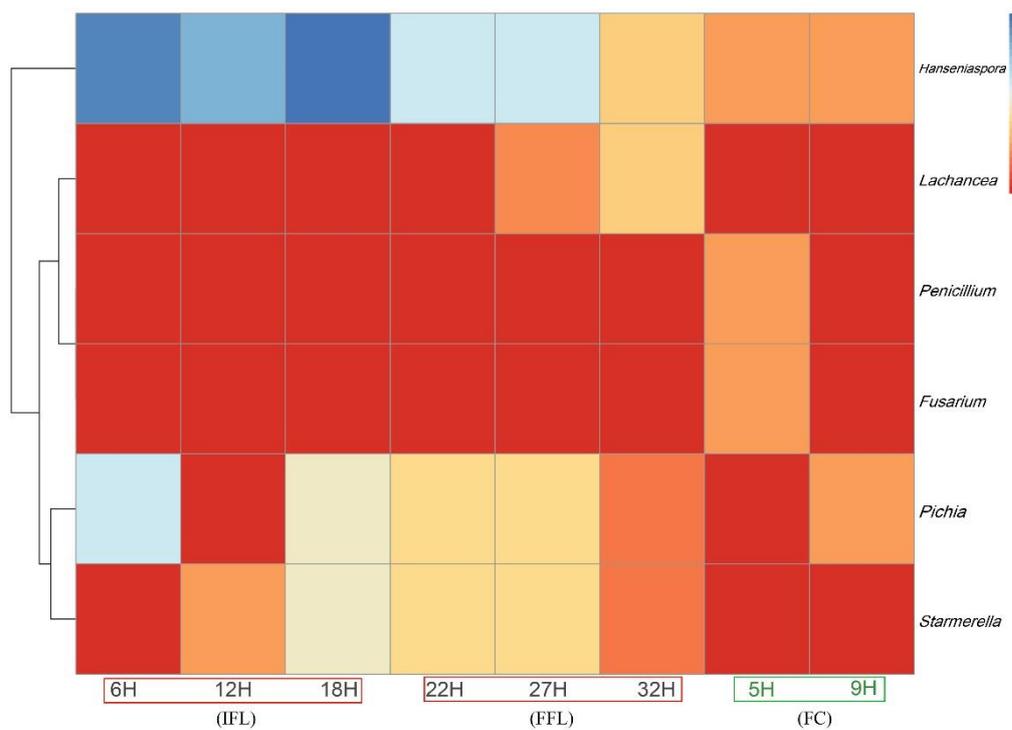


Figura 11. Mapa de calor que representa la abundancia de secuencias de géneros dentro del grupo Fungi con asignación taxonómica

(excluyendo el grupo de secuencias no identificadas) con respecto al inicio (IFL) (6h-18h) y final de la fermentación larga (FFL) (22h-32h) y fermentación corta (FC) (5h-9h).

d) Análisis funcional

La Figura 12 muestra la abundancia relativa de genes basada en la ortología KEGG, que mostró un predominio de las vías metabólicas, realizadas en el inicio (FL) (6-18 horas) y final de la fermentación larga (FFL) (22-32 horas) y fermentación corta (FC) (5-9 horas) a temperatura ambiente.

La mayor proporción de genes detectados durante los procesos de fermentación estuvieron relacionados a las propiedades del genoma 34,90 % a las 18 horas en el inicio de la fermentación larga (IFL) y 34,81% a las 5 horas en fermentación corta (FC). A estos valores le siguieron los valores de: i) genes relacionados al metabolismo, 31,05% a las 22 horas (FFL) y 30,90% a las 9 horas (FC); ii) genes relacionados a la biosíntesis, 12,17% a las 22 horas (FFL) y 12,16% a las 5 horas (FC); iii) genes relacionados al catabolismo, 5,49% a las 12 horas (IFL) y 5,00% a las 9 horas (FC); y iv) otros genes relacionados a otros procesos abarcaron valores máximos de 4,20% a las 18 horas (IFL) y 4,14% a las 5 horas (FC).

Por otro lado, la menos abundancia relativa se encontró en genes relacionados al transporte, 1,70% a las 18 horas (IFL) y 1,56% a las 9 horas (FC) y en genes relacionados al metabolismo intermediario central, 1,39% a las 6 horas (IFL) y 1,25% a las 5 horas (FC).

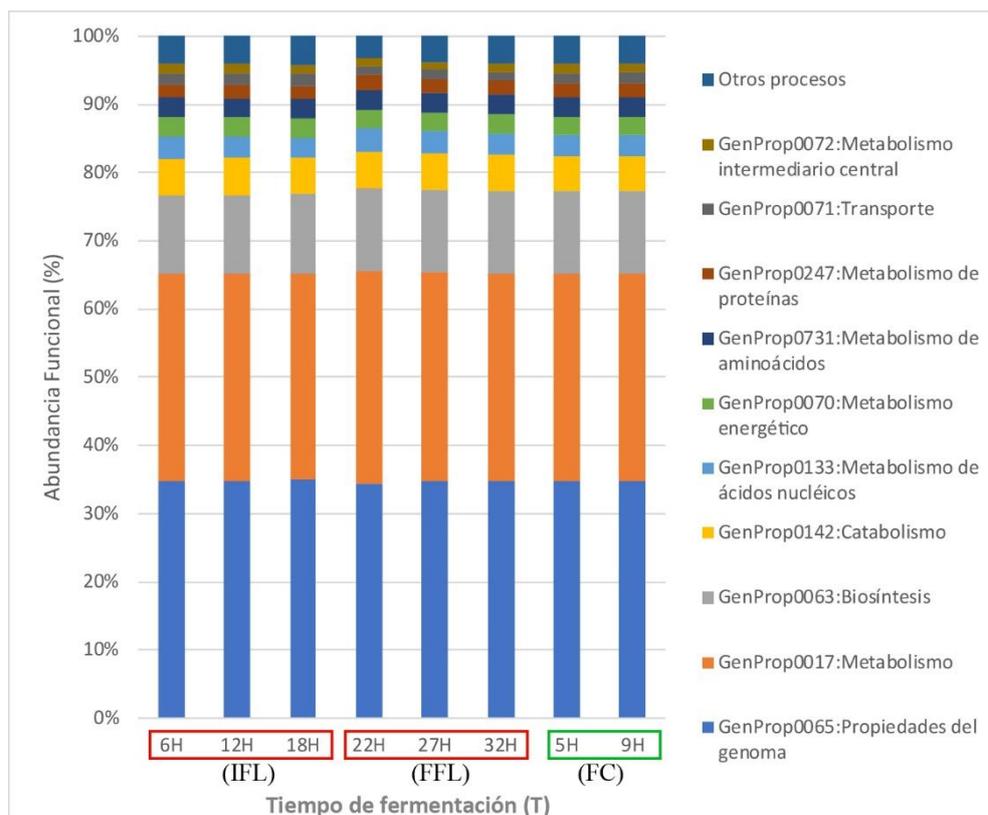


Figura 12. Abundancia relativa de genes encontrados en los metagenomas de microorganismos presentes en inicio de la fermentación larga (IFL), final de la fermentación larga (FFL) y la fermentación corta (FC) utilizando la ortología KEGG (KO), basado en la abundancia de genes implicados en el metabolismo.

3.4. Abundancia relativa de microorganismos asociados a parámetros fisicoquímicos temperatura y pH

a) Grupo Bacteria asociado a temperatura y pH

Las abundancias relativas de los géneros de bacterias de ácido acético (BAA) como *Gluconobacter* y *Acetobacter* en relación a la temperatura, pH y tiempo estuvo dado de la siguiente manera (Figura 13, 14). El género *Gluconobacter* presentó su mayor abundancia relativa (12,50%) a las 18 horas de fermentación, con una temperatura de 17,4°C y un pH equivalente a 3,71; mientras que su menor abundancia relativa (4,55%) se presentó a las 12 horas, con una temperatura de 17,3°C y un pH de 4,04. El género *Acetobacter* presentó

su mayor abundancia relativa (12,82%) a las 32 horas de fermentación, con una temperatura de 20,4°C y un pH equivalente a 3,62; no obstante, ésta no estuvo presente ni a las 6, 12 y 18 horas de fermentación, apareciendo en su abundancia mínima (3,85%) a las 22 horas con una temperatura de 22,6°C y un pH de 3,74.

Por otra parte, los géneros de bacterias de ácido láctico (BAL) como *Leuconostoc* y *Frateuria* presentaron su mayor abundancia relativa 5,56% y 11,11 respectivamente, a las 6 horas de fermentación, con una temperatura de 18,5°C y un pH equivalente a 4,69; mientras que su menor abundancia relativa fue 2,56% para ambos y se presentó a las 32 horas, con una temperatura de 20,4°C y un pH de 3,62.

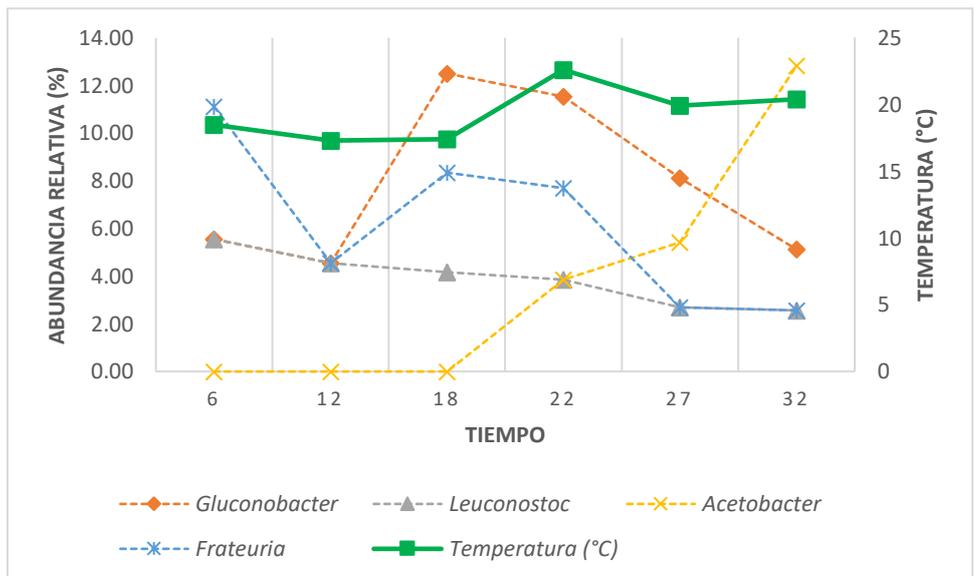


Figura 13: Dinámica de los cambios en la abundancia relativa del grupo bacteria asociado a la temperatura en las horas (6, 12, 18, 22, 27 y 32 h) en el inicio y final de la fermentación larga. La figura refleja los cambios en la abundancia relativa de los géneros más importantes, *Gluconobacter*, *Leuconostoc*, *Acetobacter* y *Frateuria*. Las cifras se expresan en relación con el tiempo de muestreo, el porcentaje de abundancia relativa de los distintos géneros y los grados centígrados de temperatura.

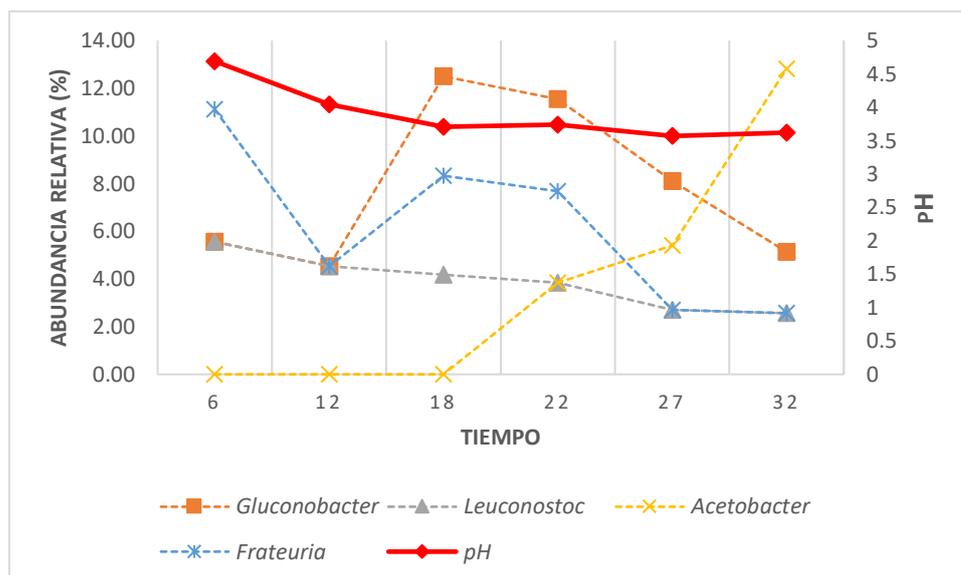


Figura 14: Dinámica de los cambios en la abundancia relativa del grupo bacteria asociado al pH en las horas (6, 12, 18, 22, 27 y 32 h) en el inicio y final de la fermentación larga. La figura refleja los cambios en la abundancia relativa de los géneros más importantes, *Gluconobacter*, *Leuconostoc*, *Acetobacter* y *Frateuria*. Las cifras se expresan en relación con el tiempo de muestreo, el porcentaje de abundancia relativa de los distintos géneros y los valores de pH.

b) Grupo Fungi asociado a temperatura y pH

Las abundancias relativas de los géneros del grupo fungi como *Hanseniaspora*, *Pichia* y *Starmerella* en relación a la temperatura, pH y tiempo estuvo dado de la siguiente manera (Figura 15, 16). El género *Hanseniaspora* presentó su mayor abundancia relativa (40%) a las 18 horas de fermentación, con una temperatura de 17,4°C y un pH equivalente a 3,71; mientras que su menor abundancia relativa (15,38%) se presentó a las 32 horas, con una temperatura de 20,4°C y un pH de 3,62. El género *Pichia* presentó su mayor abundancia relativa (25%) a las 6 horas de fermentación, con una temperatura de 18,5°C y un pH equivalente a 4,69; mientras que su menor abundancia relativa (7,69%) se presentó a las 32 horas, con una temperatura de 20,4°C y un pH de 3,62. Por último, el género *Starmerella* presentó su mayor abundancia relativa (20%) a las 18 horas de fermentación, con una temperatura de 17,4°C y un pH equivalente a 3,71; mientras que su

menor abundancia relativa (7,69%) se presentó a las 32 horas, con una temperatura de 20,4°C y un pH de 3,62.

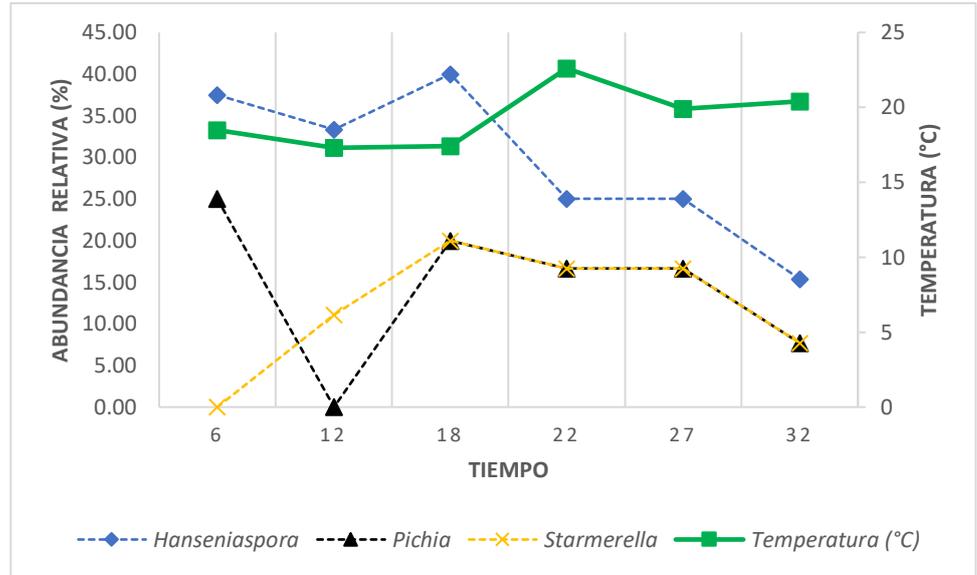


Figura 15: Dinámica de los cambios en la abundancia relativa del grupo fungi asociado a la temperatura en las horas (6, 12, 18, 22, 27 y 32 h) en el inicio y final de la fermentación larga. La figura refleja los cambios en la abundancia relativa de los géneros más importantes, *Hanseniaspora*, *Pichia* y *Starmerella*. Las cifras se expresan en relación con el tiempo de muestreo, el porcentaje de abundancia relativa de los distintos géneros y los grados centígrados de temperatura.

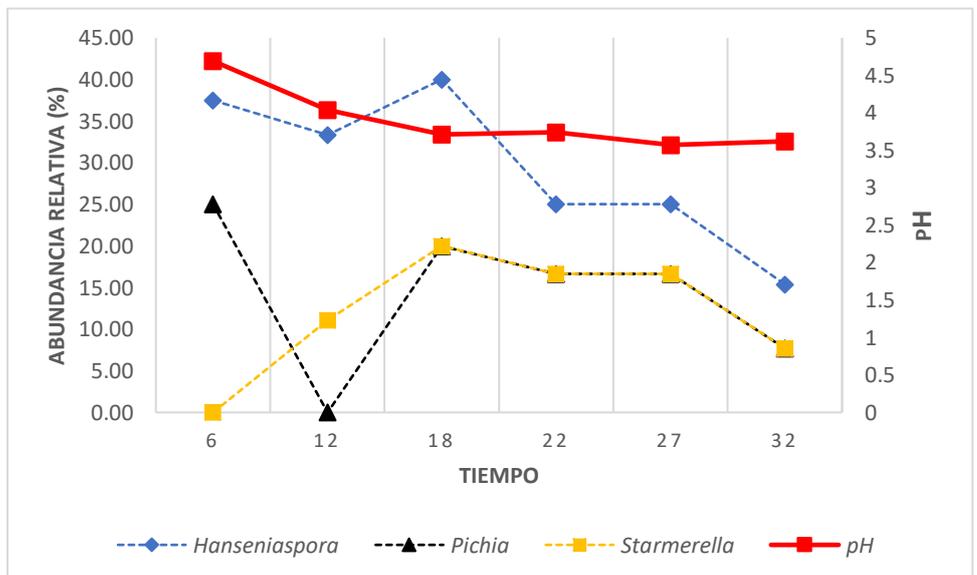


Figura 16: Dinámica de los cambios en la abundancia relativa del grupo fungi asociado al pH en las horas (6, 12, 18, 22, 27 y 32 h) en el

inicio y final de la fermentación larga. La figura refleja los cambios en la abundancia relativa de los géneros más importantes, *Hanseniaspora*, *Pichia* y *Starmerella*. Las cifras se expresan en relación con el tiempo de muestreo, el porcentaje de abundancia relativa de los distintos géneros y los valores de pH.

3.5. Caracterización química

a) Identificación de compuestos volátiles

Se detectaron compuestos volátiles en cada hora de colecta de muestras de mucílago de café, durante procesos de fermentación cortos (5 y 9 horas) y largos (6, 12, 18, 22, 27 y 32 horas) de las regiones de Amazonas y Cajamarca, respectivamente. Todos estos compuestos presentaron picos con similitud $\geq 80\%$ e índice de retención lineal (LRI) igualado. En total, se detectaron 157 compuestos volátiles por SPME-GC-MS (Anexo 1): 3 ácidos, 13 alcoholes, 16 aldehídos, 13 alcanos, 2 hidrocarburos aromáticos, 5 bencenos, 24 ésteres, 1 éter, 2 furanos, 10 cetonas, 2 pirazinas, 9 terpenos y 57 compuestos pertenecientes a otros grupos químicos. En la fermentación corta se encontraron 68 y 72 compuestos a las 5 y 9 horas, respectivamente. Por el contrario, durante el largo proceso de fermentación, se identificaron 82, 80, 85, 69, 74 y 80 compuestos volátiles a las 6, 12, 18, 22, 27 y 32 horas, respectivamente.

b) Grupos químicos

De un total de 157 compuestos volátiles identificados tanto en el proceso de fermentación largo como en el corto, se clasificaron en 13 grupos químicos: ácidos, alcoholes, aldehídos, alcanos, hidrocarburos aromáticos, bencenos, ésteres, éteres, furanos, cetonas, pirazinas y terpenos (Figura 13), además de un grupo de otros compuestos no clasificados. En el proceso de fermentación largo, los grupos químicos más abundantes fueron los alcoholes, los ésteres y los aldehídos. A las 22h se registró la mayor abundancia relativa de alcoholes con un valor de 35,51%, a las 32h la mayor abundancia relativa de ésteres con un registro de 28,47% y finalmente la mayor abundancia relativa de aldehídos se registró a las 6h con un valor de 15,34%.

En el proceso de fermentación corto, los grupos químicos más abundantes fueron los aldehídos, los alcoholes y el grupo formado por compuestos volátiles no clasificados como "Otros". Los aldehídos presentaron su mayor abundancia relativa a las 5h con un porcentaje del 37,04%, al mismo tiempo la abundancia relativa de los alcoholes fue del 27,53%; mientras que la mayor abundancia relativa de otros compuestos fue a las 9h con un valor del 24,44% (Figura 17).

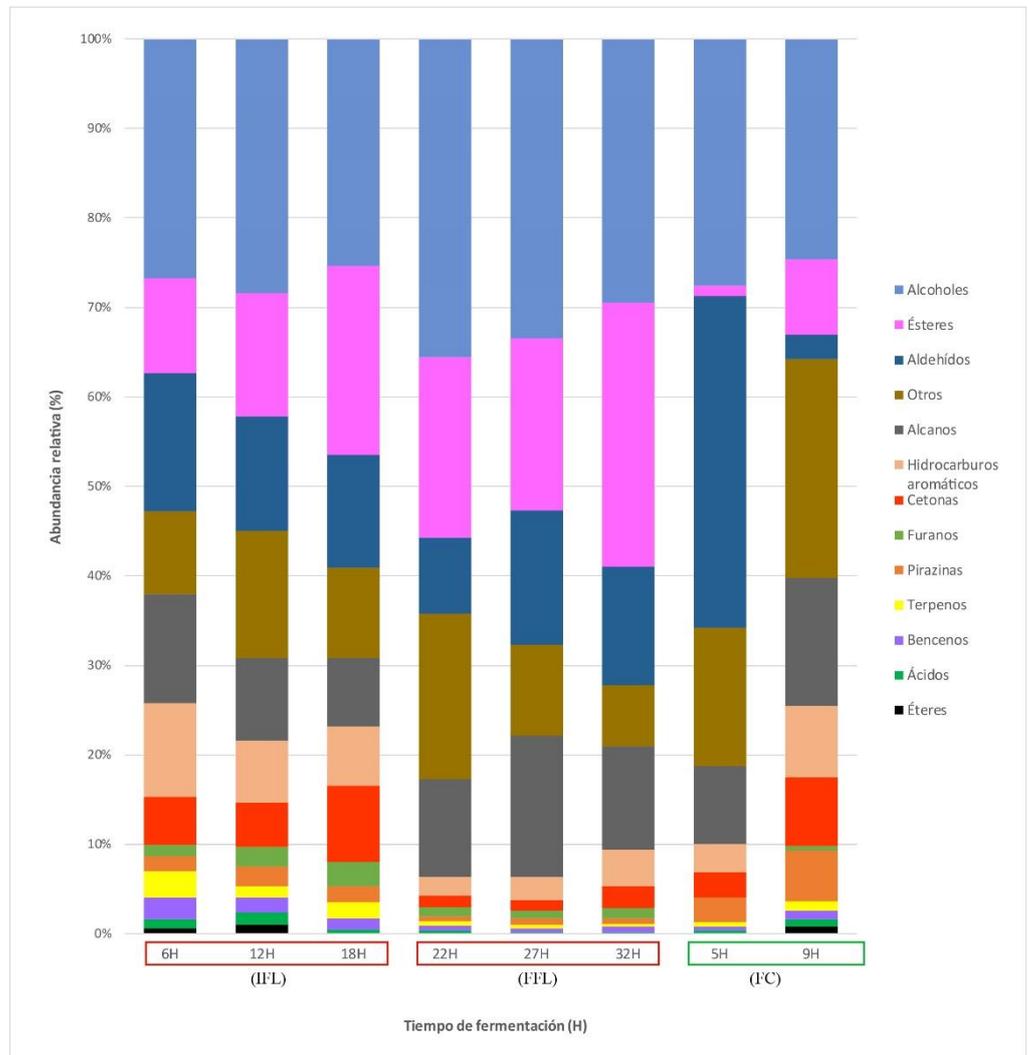


Figura 17: Abundancia relativa de los grupos químicos volátiles detectados en los cafés en el inicio de la fermentación larga (IFL), final de la fermentación larga (FFL) y fermentación corta (FC).

c) **Compuestos volátiles asociados con características organolépticas**

Entre los compuestos identificados, 6 de ellos están específicamente asociados a las características organolépticas del café (Elhalis et al., 2020; Chindapan et al., 2021). Los compuestos fueron agrupados según su clase química en alcoholes, furanos, cetonas y, aldehídos (Tabla 03).

Tabla 03: Compuestos volátiles asociados a las características organolépticas identificadas por el espectro de masas (MS) en comparación con la base de datos NIST 17.

Grupo Químico	Compuesto Volatil	Descripción Sensorial
Alcoholes	Phenylethyl Alcohol	Floral, afrutado
Aldehídos	Hexanal	Verde, afrutado
	Benzaldehyde	Almendra grasa
	2-Butenal, 3-methyl-	–
Furanos	Furan, 2-pentyl-	–
Cetonas	3-Pentanone	–

*MS = Espectro de masas comparado con la base de datos NIST 17. Los descriptores sensoriales se han tomado de Flament et al. (1968), Semmelroch y Grosch (1995), Czerny y Grosch (2000), Mottram (2005), Pereira et al., (2014), Sunarharum et al., (2014), Febrianto et al., (2016), Yang et al., (2016), Caporaso et al., (2018) y Liu et al., (2019).

En el proceso de fermentación corta, se identificaron tres compuestos volátiles dentro del grupo funcional de los aldehídos (hexanal, benzaldehído y 2-butenal, 3-metil), un compuesto dentro del grupo funcional alcoholes (alcohol feniletílico) y otros compuestos pertenecientes a los grupos funcionales furanos (furano, 2-pentilo-) y cetonas (3-pentanona).

Para el proceso de fermentación largo, se identificaron tres compuestos volátiles pertenecientes al grupo funcional de los aldehídos, cuyos compuestos presentaron la siguiente abundancia relativa mínima y máxima a las 12h y 27h de iniciada la fermentación, respectivamente: hexanal (1,78 vs 2,24 %), benzaldehído (6,94 vs 8,54 %), 2-Butenal, 3-metil- (0,00 vs 0,23 %) (Figura 18a). Por otro lado, se detectaron compuestos individuales dentro de los siguientes grupos funcionales: furanos (furan, 2-pentilo-), con un valor mínimo a las 27h (0,70%) y un valor máximo a las 18h (1,91%); alcoholes (alcohol feniletílico), el cual estuvo presente durante todas las horas de colecta y cuyo valor mínimo y máximo de abundancia relativa fue a las 18h (3,26%) y a las 32h (13,10%), respectivamente. Finalmente, el grupo de las cetonas (3-pentanona) sólo estuvo presente a las 6h, 12h y 22h y ausente en el resto de los tiempos de muestreo establecidos (Figura 18b).

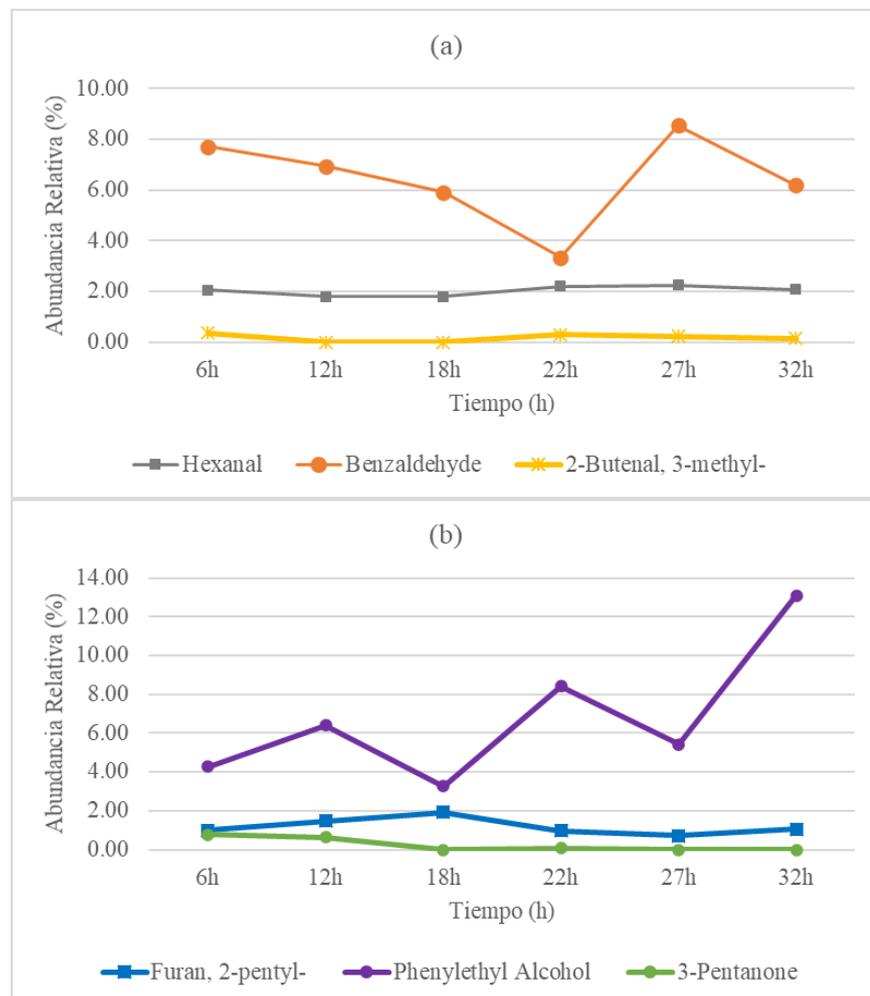


Figura 18: Dinámica de los cambios en la abundancia relativa de los compuestos volátiles según horas de colecta (6, 12, 18, 22, 27 y 32 h) en el inicio y final de la fermentación larga. La figura (a) refleja los cambios en la abundancia relativa del grupo funcional aldehído. La figura (b) expresa los cambios en la abundancia relativa de los compuestos pertenecientes a los grupos funcionales furanos, alcoholes y cetonas. Las cifras se expresan en relación con el tiempo de muestreo y el porcentaje de abundancia relativa de los distintos compuestos.

3.6. Análisis estadístico de datos

Análisis de correlación del grupo bacteria y compuestos volátiles (IFL)

El análisis de correlación entre el grupo bacterias y los compuestos volátiles en el inicio de la fermentación larga (IFL) se exploró mediante el análisis de correlación de Pearson (Figura 19). Se encontraron correlaciones positivas significantes entre: Ba_Unidentified y Phenylethyl alcohol ($r=0,98$); *Leuconostoc* y 2-Butenal, 3-methyl- ($r=0,96$); *Leuconostoc* y hexanal ($r=0,96$); *Escherichia* y Phenylethyl alcohol ($r=0,95$); *Leuconostoc* y Benzaldehyde ($r=0,94$); *Leuconostoc* y 3-Pentanone ($r=0,83$); *Frateuria* y Hexanal ($r=0,83$); *Frateuria* y 2-Butenal, 3-methyl- ($r=0,82$); *Gluconobacter* y Furan, 2-pentyl- ($r=0,80$).

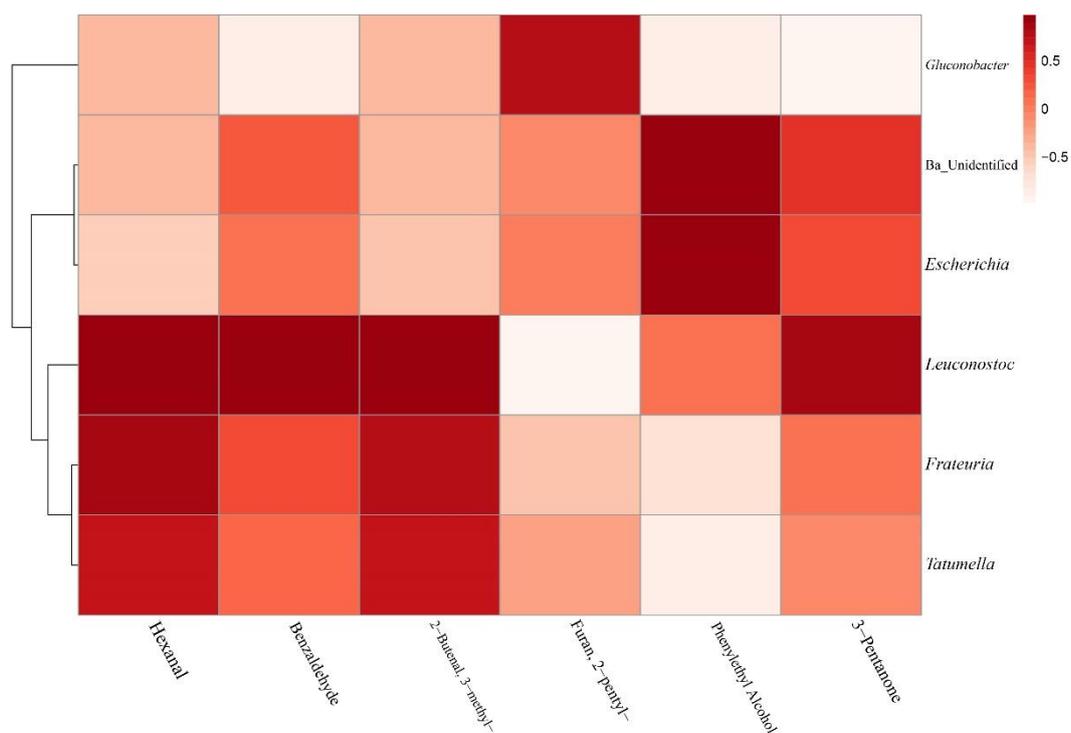


Figura 19: Mapa de calor del análisis de correlación del grupo Bacteria y los compuestos volátiles presentes en el inicio de la fermentación larga (IFL).

Análisis de correlación del grupo bacteria y compuestos volátiles (FFL)

El análisis de correlación entre el grupo bacterias y los compuestos volátiles en el final de la fermentación larga (FFL) se exploró mediante el análisis de correlación de Pearson (Figura 20). Se encontraron correlaciones positivas significantes entre: *Leuconostoc* y 3-Pentanone ($r=1,00$); *Frateuria* y 3-Pentanone ($r=1,00$); *Gluconobacter* y 2-Butenal, 3-methyl- ($r=0,98$); *Methylobacterium* y Phenylethyl alcohol ($r=0,92$), *Ba_Unidentified* y Benzaldehyde ($r=0,91$); *Gluconobacter* y 3-Pentanone ($r=0,89$); *Leuconostoc* y 2-Butenal, 3-methyl- ($r=0,89$); *Acetobacter* y Phenylethyl alcohol ($r=0,85$); *Frateuria* y 2-Butenal, 3-methyl- ($r=0,80$).

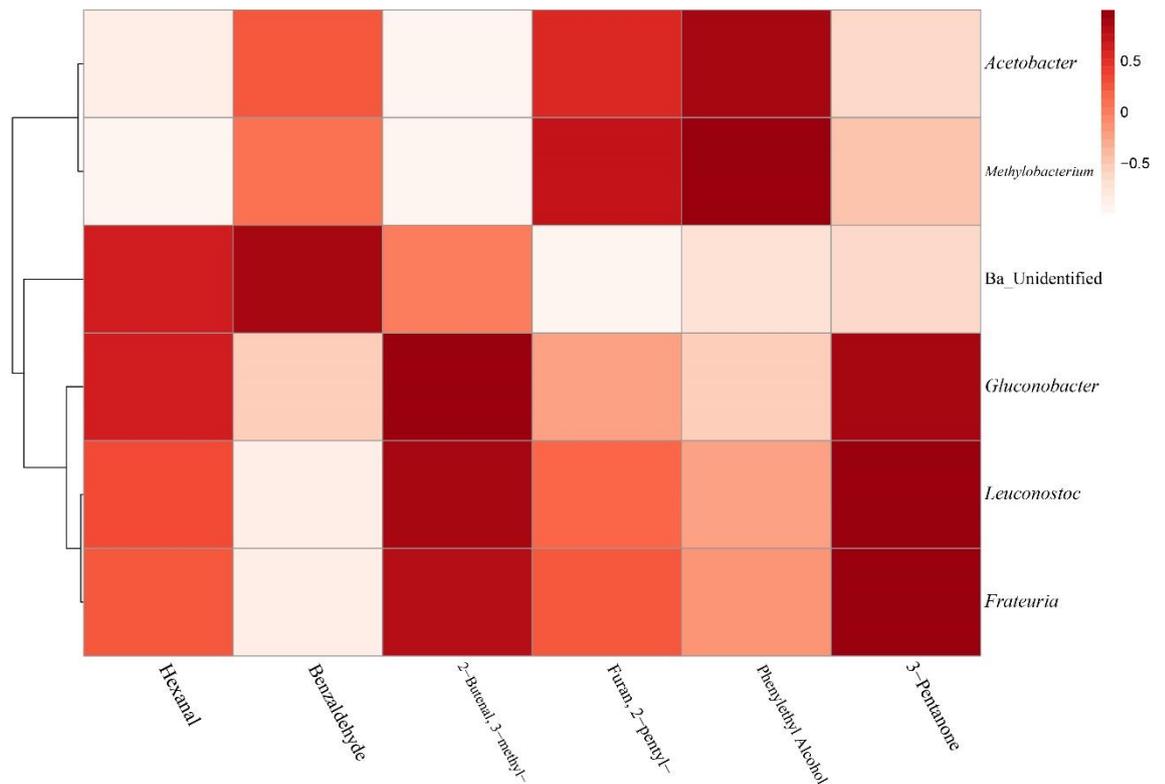


Figura 20: Mapa de calor del análisis de correlación del grupo Bacteria y los compuestos volátiles presentes en el proceso final de la fermentación larga (FFL).

Análisis de correlación del grupo bacteria y las rutas metabólicas (IFL)

El análisis de correlación entre el grupo bacterias y las rutas metabólicas en el inicio de la fermentación larga (IFL) también se exploró mediante el análisis de correlación de Pearson (Figura. 21). Se encontraron correlaciones positivas significantes entre: Ba_Unidentified y Catabolismo ($r=1,00$); *Leuconostoc* y Metabolismo de ácidos nucleicos ($r=1,00$); *Leuconostoc* y Metabolismo ($r=1,00$); *Escherichia* y Catabolismo ($r=1,00$); *Gluconobacter* y Transporte ($r=0,99$); *Leuconostoc* y Metabolismo de aminoácidos ($r=0,99$); *Tatumella* y Metabolismo de proteínas ($r=0,95$); *Gluconobacter* y Biosíntesis ($r=0,92$); *Leuconostoc* y Metabolismo intermediario central ($r=0,89$); *Frateuria* y Metabolismo de proteínas ($r=0,87$).

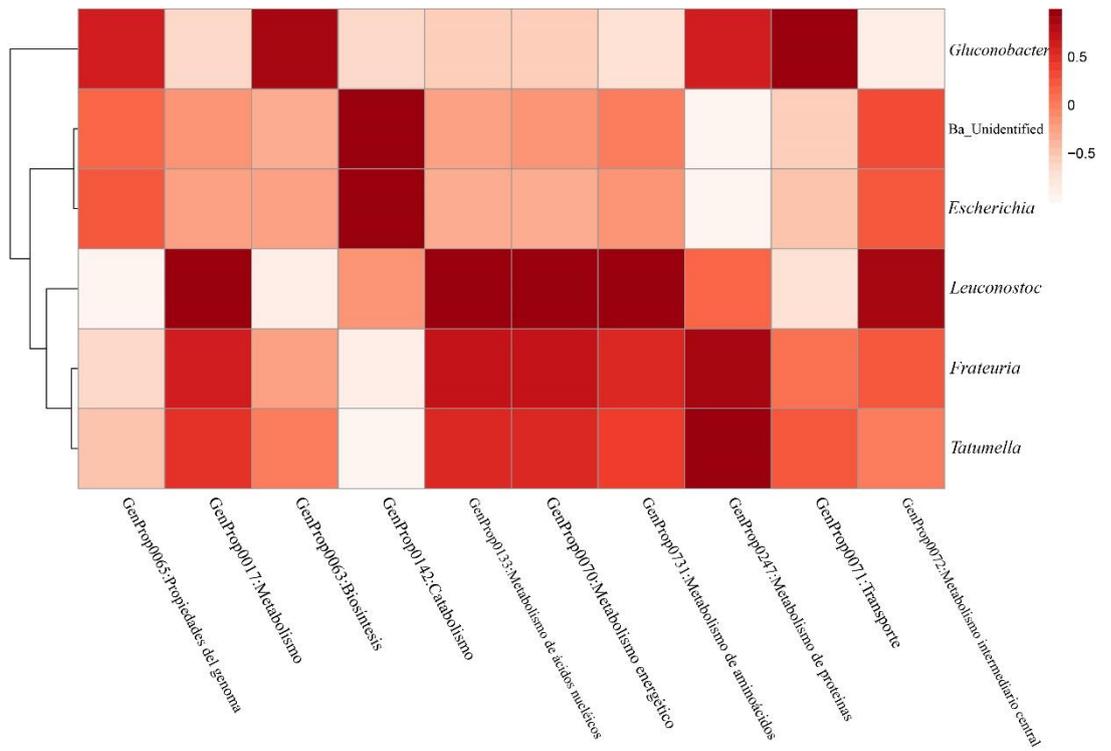


Figura 21: Mapa de calor del análisis de correlación del grupo Bacteria y las rutas metabólicas presentes en el inicio de la fermentación larga (IFL).

Análisis de correlación del grupo bacteria y las rutas metabólicas (FFL)

El análisis de correlación entre el grupo bacterias y las rutas metabólicas en el final de la fermentación larga (FFL) también se exploró mediante el análisis de correlación de Pearson (Figura 22). Se encontraron correlaciones positivas significantes entre: *Frateuria* y Metabolismo de proteínas ($r=1,00$); *Leuconostoc* y Metabolismo ($r=1,00$); *Leuconostoc* y Metabolismo de ácidos nucleicos ($r=1,00$); *Frateuria* y Metabolismo de ácidos nucleicos ($r=1,00$); *Leuconostoc* y Metabolismo de proteínas ($r=0,99$); *Frateuria* y Metabolismo ($r=0,99$); *Gluconobacter* y Metabolismo ($r=0,94$); Ba_Unidentified y Transporte ($r=0,92$); *Frateuria* y Metabolismo de aminoácidos ($r=0,92$); *Gluconobacter* y Metabolismo de ácidos nucleicos ($r=0,91$); *Gluconobacter* y Biosíntesis ($r=0,90$); *Leuconostoc* y Metabolismo de aminoácidos ($r=0,89$); *Gluconobacter* y Metabolismo de proteínas ($r=0,88$); *Gluconobacter* y Catabolismo ($r=0,84$).

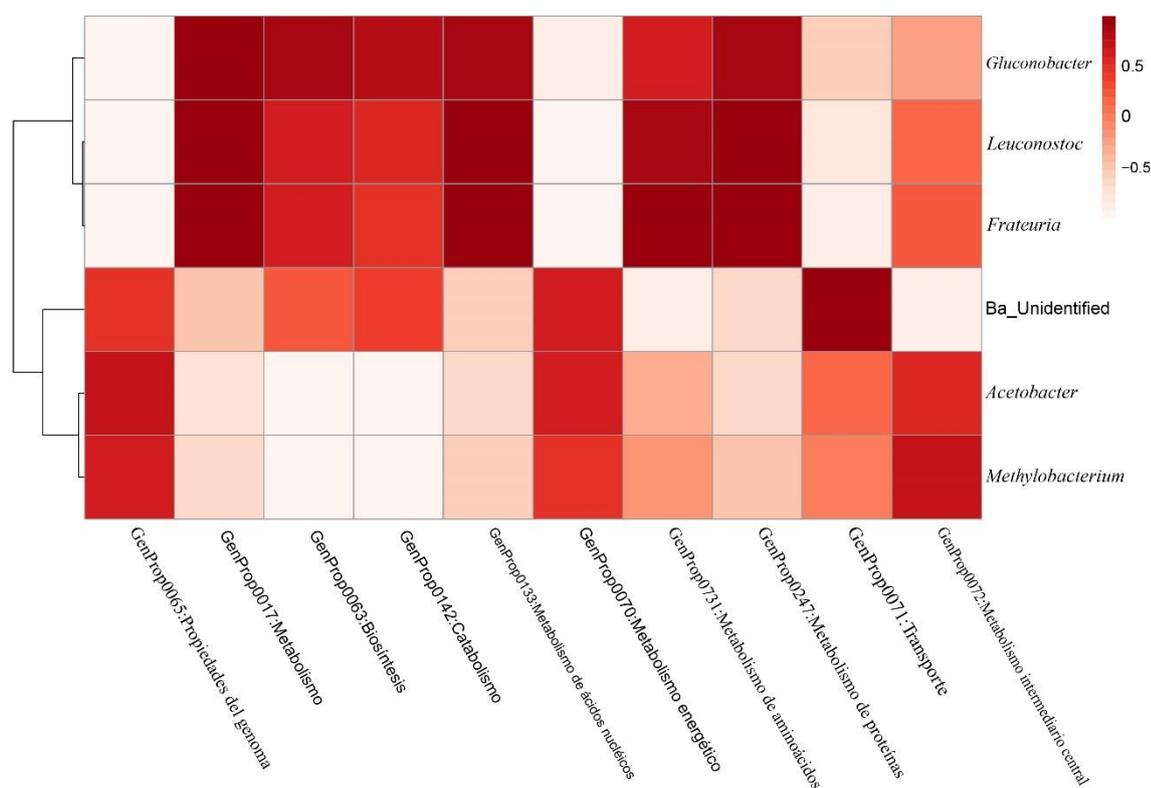


Figura 22: Mapa de calor del análisis de correlación del grupo Bacteria y las rutas metabólicas presentes en el final de la fermentación larga (FFL).

Análisis de correlación del grupo fungi y compuestos volátiles (IFL)

De la misma forma, el análisis de correlación entre el grupo fungi y los compuestos volátiles al inicio de la fermentación larga (IFL) se realizó mediante el análisis de correlación de Pearson (Figura 23). Se encontraron correlaciones positivas significantes entre: *Starmerella* y Furan, 2-pentyl- ($r=1,00$); *Eu_Unidentified* y Phenylethyl Alcohol ($r=0,98$).

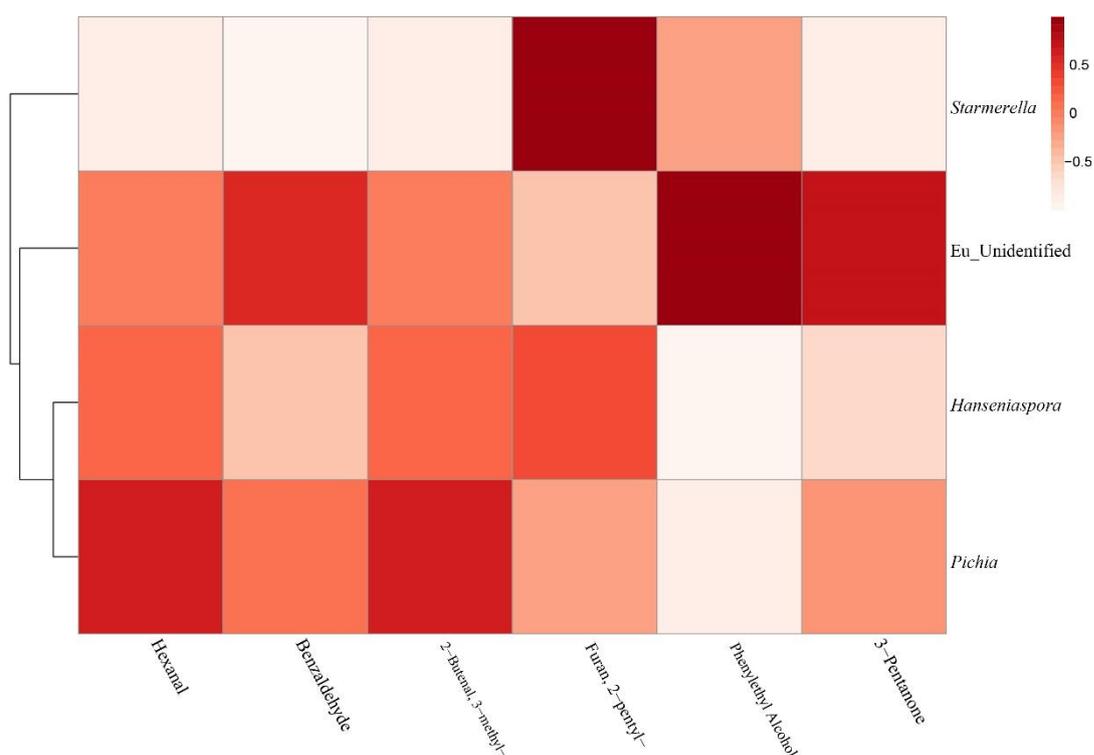


Figura 23: Mapa de calor del análisis de correlación del grupo Fungi y los compuestos volátiles presentes en el inicio de la fermentación larga (IFL).

Análisis de correlación del grupo fungi y compuestos volátiles (FFL)

De la misma forma, el análisis de correlación entre el grupo fungi y los compuestos volátiles al final de la fermentación larga (FFL) se realizó mediante el análisis de correlación de Pearson (Figura 24). Se encontraron correlaciones positivas significantes entre: *Eu_Unidentified* y Phenylethyl

Alcohol ($r=1,00$); *Hanseniaspora* y hexanal ($r=0,95$); *Pichia* y hexanal ($r=0,95$); *Starmerella* y hexanal ($r=0,95$); Eu_Unidentified y Furan, 2-pentyl- ($r=0,93$); *Hanseniaspora* y 2-Butenal, 3-methyl- ($r=0,93$); *Pichia* y 2-Butenal, 3-methyl- ($r=0,93$); *Starmerella* y 2-Butenal, 3-methyl- ($r=0,93$).

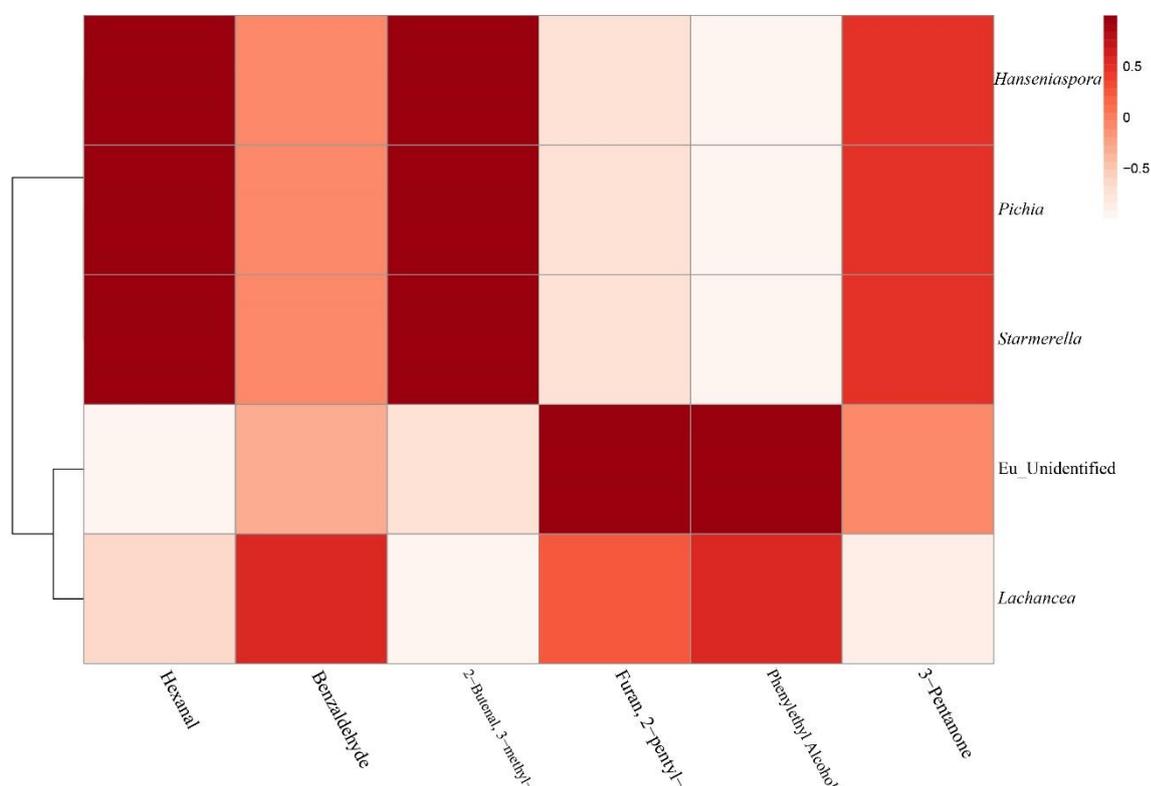


Figura 24: Mapa de calor del análisis de correlación del grupo Fungi y los compuestos volátiles presentes al final de la fermentación larga (FFL).

Análisis de correlación del grupo fungi y las rutas metabólicas (IFL)

También se realizó el análisis de correlación de Pearson entre el grupo fungi y las rutas metabólicas en el inicio de la fermentación larga (IFL) (Figura 25). Se encontraron correlaciones positivas significantes entre: *Starmerella* y Propiedades del genoma ($r=0,98$); *Pichia* y Metabolismo de proteínas ($r=0,97$); *Starmerella* y Biosíntesis ($r=0,96$); *Hanseniaspora* y Metabolismo de proteínas ($r=0,95$); Eu_Unidentified y Catabolismo ($r=0,90$); *Starmerella* y Transporte ($r=0,84$).

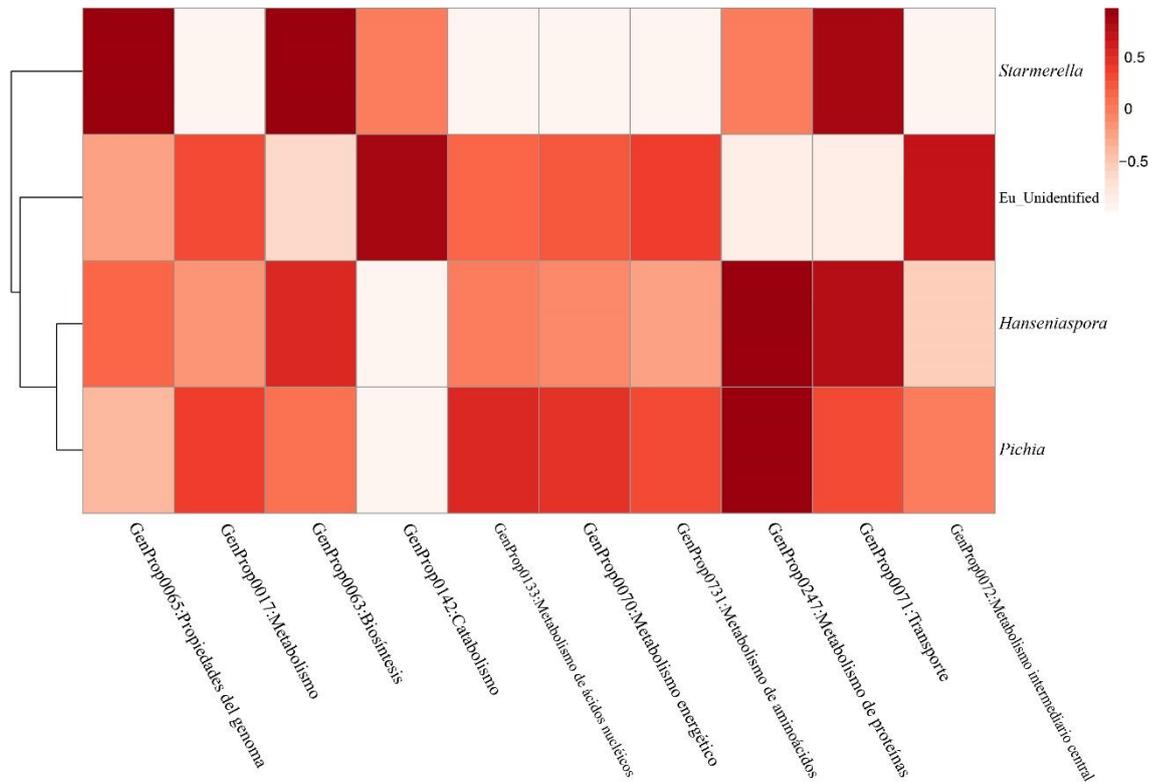


Figura 25: Mapa de calor del análisis de correlación del grupo Fungi y las rutas metabólicas presentes en el inicio de la fermentación larga (IFL).

Análisis de correlación del grupo fungi y las rutas metabólicas (FFL)

También se realizó el análisis de correlación de Pearson entre el grupo fungi y las rutas metabólicas en el final de la fermentación larga (FFL) (Figura 26). Se encontraron correlaciones positivas significantes entre: *Hanseniaspora* y Catabolismo ($r=1,00$); *Pichia* y Catabolismo ($r=1,00$); *Starmerella* y Catabolismo ($r=1,00$); *Hanseniaspora* y Biosíntesis ($r=0,99$); *Pichia* y Biosíntesis ($r=0,99$); *Starmerella* y Biosíntesis ($r=0,99$); *Lachancea* y Propiedades del genoma ($r=0,94$); Eu_Unidentified y Metabolismo intermediario central ($r=0,93$); *Lachancea* y Metabolismo energético ($r=0,87$).

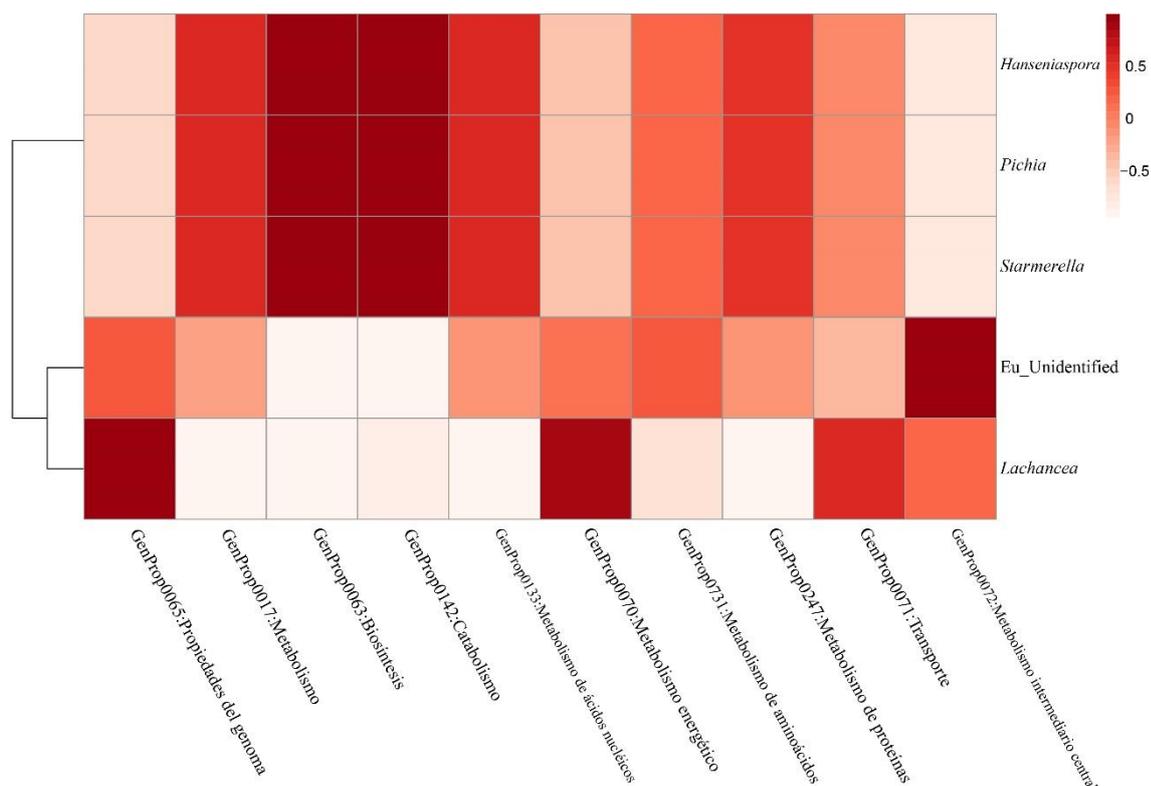


Figura 26: Mapa de calor del análisis de correlación del grupo Fungi y las rutas metabólicas presentes en el final de la fermentación larga (FFL).

Análisis de Componentes Principales (PCA)

Se aplicó el Análisis de Componentes Principales (PCA) sobre el porcentaje de abundancia relativa de los 6 compuestos volátiles (descritos en la tabla 1) para cada tiempo durante la fermentación corta y larga, con el fin de representar la varianza del conjunto de datos. El análisis de los compuestos se realizó mediante la confirmación del valor propio, con una variabilidad de los datos que supera el 80% tras la confirmación de los componentes.

En la gráfica PCA de los compuestos volátiles (Figura 27) se muestra el mapa de distribución de los dos primeros componentes principales determinados por el PCA, que describen el 43,8% y el 31,1% de la variabilidad. Observamos que 4 de los 6 compuestos volátiles del proceso

de fermentación larga (alcohol feniletílico, benzaldehído, hexanal, furano,2-pentil-) tienden a agruparse a lo largo del primer componente (Dim 1 que representa el 43,8% de la varianza total), mientras que los 2 compuestos restantes (3-pentanona, 2-butenal, 3-metil-,) se encuentran dispersos a lo largo de los ejes superior izquierdo y derecho. El componente secundario Dim 2 (31,1% de la varianza) mostró que los compuestos volátiles variaban con el tiempo de fermentación.

El proceso de fermentación largo está relacionado principalmente con los compuestos furano, 2-pentilo-(entre las 12 y 18 horas), alcohol feniletílico, benzaldehído y hexanal (entre las 22 y 32 horas). Estos compuestos volátiles dan características afrutadas, florales, verdes y almendradas (Febrianto et al., 2016; Caporaso et al., 2018). En cuanto al proceso de fermentación corto, los compuestos destacados fueron 3-Pentanona y 2-butenal, 3-metil- (a las 9 horas). Así, el gráfico muestra cada compuesto volátil, colocado según su relación con los componentes, y puede utilizarse para explicar cómo varió para cada hora de fermentación en durante los procesos de fermentación estudiados.

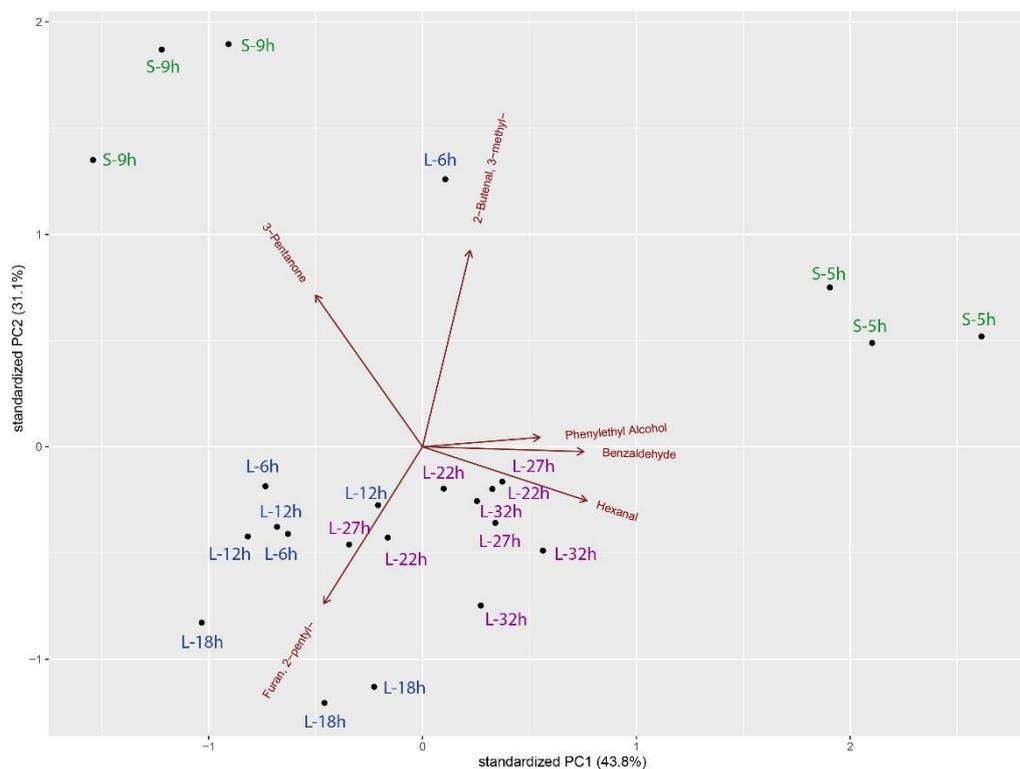


Figura 27: Gráfico del análisis de componentes principales de los compuestos volátiles durante el proceso de fermentación corto (5h-9h, en color verde), inicio de la fermentación larga (6h-18h, en color azul) y final de la fermentación larga (22h-32h, en color morado) con respecto al porcentaje de abundancia relativa del hexanal; benzaldehído; 2-butenal, 3-metil-; furano, 2-pentil-; alcohol feniletílico y 3-pentanona.

3.7. Implicancias de la investigación en la sostenibilidad del cultivo de café

3.5.1. El rol de la agricultura sostenible

El rol de la agricultura en el desarrollo económico de un país es crucial (Begyaraj, 2014). La existencia de una mayor población, mayores ingresos percibidos, además de un mayor consumo y consumismo requieren de cultivos más intensivos y, por lo tanto, intensifican el uso del suelo (Singh y Trivedi, 2017). Existen diversos problemas ambientales asociados a ello como son: compactación, erosión y pérdida de la fertilidad del suelo; contaminación de las aguas subterráneas, entre otros; sumado a ello, se prevé que la demanda mundial de la producción agrícola aumente ~70% para el 2050 (Godfray et al., 2010).

Ante ello, las prácticas agrícolas sostenibles son el punto clave para satisfacer la creciente demanda agrícola mundial del futuro (Altieri et al., 2012), fomentando la prosperidad del ser humano y su entorno sin causar daño al medio ambiente (Asghar et al., 2020). Tal como lo mencionan los objetivos del desarrollo sostenible, se debe garantizar los sistemas de producción de alimentos sostenibles y la implementación de prácticas agrícolas flexibles, que sean capaces de aumentar la productividad manteniendo nuestros ecosistemas y fortaleciendo la adaptación al cambio climático (Wang et al., 2018).

3.5.2. Enfoque social: La importancia de las prácticas agrícolas en el cultivo de café

El procesamiento del café es una práctica agrícola que emplea técnicas de producción tradicionales, instalaciones dedicadas y equipos especializado (da Silva et al., 2021), además su crecimiento y productividad depende de distintos

factores ambientales como la temperatura, disponibilidad de agua, intensidad de la luz solar, viento, tipo de suelo y la topografía del terreno (Descroix y Snoeck, 2009). Durante las etapas de cosecha, transporte y despulpado, los granos de café tienen estrecha relación con una gran variedad de microorganismos, muchos de los cuáles contribuyen al proceso de fermentación posterior (da Silva et al., 2021). En cualquier proceso de fermentación, el impacto de la microflora nativa es muy importante, ya que se postula que los sabores regionales y aromas en los productos fermentados se deben en gran parte a la diversidad microbiana estructurada regionalmente (Miura et al., 2017; Morrison y Goddard, 2018; Belda et al., 2020).

El fruto del café es una gran fuente de diversidad microbiana, sin embargo, los ecosistemas manejados cercanos (suelo, agua, hojas de café, superficie exterior de los frutos y aire) tienen también poblaciones muy altas de una diversidad de especies de hongos, levaduras y bacterias que pueden afectar la ecología microbiana del proceso de fermentación (Lee et al., 2016; Junqueira et al., 2019). No obstante, la interacción entre las comunidades microbianas de fermentación y los entornos de procesamiento del café, así como su rol dentro de la calidad final en taza siguen aún sin comprenderse bien, ya que los estudios de fuentes microbianas son limitados (Zhang et al., 2009; Bokulich et al., 2013).

En ese sentido, el presente estudio ha demostrado cómo la práctica post cosecha del tiempo de fermentación utilizado puede afectar a la comunidad microbiana y la producción de compuestos volátiles, y, en consecuencia, puede modificar los perfiles sensoriales del café para favorecer el sabor y el aroma de la bebida y aumenten el valor final del producto (Ribeiro et al., 2017; Lee et al., 2017; Martinez et al., 2017, Bressani et al., 2020). Por tal motivo, el conocimiento de la microbiota nativa y sus potencialidades puede ayudar a la elaboración de cultivos iniciadores en el proceso fermentación del café, que pueden mejorar su calidad y aumentar los beneficios económicos para los productores (Haile y Kang, 2019). Para esto, los cultivos iniciadores deben cumplir con características, como ser no patógenos, no toxigénicos y adaptables a las materias primas y al proceso (Vinicius et al., 2015), además, de producir calidad sensorial, prolongar la vida útil, reducir el tiempo de procesamiento y reprimir el desarrollo de

microorganismos patógenos relacionados con los alimentos (Corsetti et al., 2012). Esta es una manera adecuada de influir positivamente en la gestión sostenible de los sistemas agrícolas, combinada con la implementación adecuada de los planes de bienestar social, para así conducir en la realización oportuna del ODS 1 (no pobreza), ODS 2 (hambre cero) y ODS 3 (buena salud y bienestar) (Priyadarshini y Abhilash, 2020).

3.5.3. Enfoque económico: Aplicaciones de conocer los microbiomas del café:

Actualmente, la comprensión de las actividades microbianas del café se basa en las investigaciones de sus funciones en la fermentación del café (Ferreira, 2014), la composición y la dinámica de la comunidad microbiana durante la fermentación (Schwan et al., 2012; Ferreira, 2014) y los impactos microbianos en la calidad del café (Hocking, 2006; Ferreira, 2014; Taniwaki et al., 2014). No obstante, a medida que la comunidad científica comienza a ir más allá de los estudios descriptivos de diversidad microbiana, surge un núcleo de microorganismos, los cuales podrían ser útiles a nivel funcional. Por ejemplo, los inoculantes microbianos se han empleado durante mucho tiempo para alterar, conservar y mejorar los productos alimenticios (El-Mansi et al., 2011). Por ende, aquí destacamos varias aplicaciones en las que se han empleado o podrían emplearse microorganismos para ayudar a mejorar la producción del café y contribuir para que sea más rentable.

En la actualidad, la OTA (Ocratoxina), micotoxina que puede causar daño renal, es un factor importante en la evaluación de la calidad del café, la cual se encuentra regulada para la importación a Europa en niveles de <5ppb (Bayman & Baker, 2006). Se ha examinado el uso de *Lactobacillum plantarum*, aislado de la pulpa de café, como antagonista biológico contra los hongos productores de OTA (Masoud et al., 2005; Masoud y Kaltof, 2006; Masoud y Jespersen, 2006; Djossou et al., 2011; Ferreira, 2014). Para la gestión de residuos de café como subproductos en forma de pulpa, cascarilla, aguas residuales y pozos de café gastados se han empleado microorganismos tales como, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Rhodococcus*, *Alcalignes*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Stemphylium*, aislados del mismo café para su remediación, enfocados en la

desintoxicación de la cafeína (Mussatto et al., 2011; Nayak et al., 2012; Ribeiro et al., 2014). Esto haría posible la creación de un producto con valor agregado en forma de ensilado para alimentación animal, o al menos puedan almacenarse y compostarse de forma segura. Por otra parte, para el control de plagas del café, que es de sumo interés para apoyar sistemas de cultivos sostenibles y reducir el uso de plaguicidas tóxicos (Jaramillo et al., 2011), varias investigaciones se enfocan en el uso de agentes biológicos (Waller y Masaba, 2006), centrados en los endófitos, ya que son conocidos por su capacidad para conferir mayor resistencia a las plagas (Silva et al., 2012), resistencia a la herbivoría y tolerancia al estrés ambiental (Redman et al., 2002).

A la actualidad, existen pocos estudios que analicen las comunidades indígenas de microorganismos en los cafetales, aún a pesar de que el café es un producto importante en más de 50 países que participan en su producción, comercio y consumo (Urgiles et al., 2021). El presente estudio muestra el vacío de información existente sobre los microorganismos nativos en los fermentos de café (60-75% de bacterias y 42-73 % de hongos que no han podido ser identificados) y sus potencialidades, siendo un reto a llenar para futuras investigaciones en el área.

La aplicación de la biotecnología microbiana, integrada con técnicas convencionales, permitirá plantear soluciones que permitan el mejoramiento de la calidad del café, los bajos rendimientos, la falta de híbridos mejorados, suelos pobres, enfermedades, plagas, cambio climático y malas prácticas de manejo de cultivos (Fekede y Gosa, 2015; Melese y Kolech, 2021). En los últimos años se ha aplicado la biotecnología moderna e ingeniería de microbiomas vegetales para modificar microbiomas hacia comunidades específicas de microorganismos, para optimizar el crecimiento de los cultivos y, por lo tanto, aumentar la rentabilidad (Urgiles et al., 2021).

3.5.4. Enfoque ambiental: preservación de los ecosistemas Enfocando nuevos horizontes para la preservación de los agroecosistemas

La mayoría de microorganismos asociados a las plantas son considerados comensales, teniendo impactos positivos en la salud de las plantas a través de la promoción del desarrollo y crecimiento de las mismas, la resistencia a las enfermedades y la tolerancia al estrés ambiental, por lo que requieren de un nuevo punto de vista (Lugtenberg & Kamilova, 2009; Rodriguez et al., 2009; Kim et al., 2012).

Las tecnologías de secuenciación de ADN de próxima generación, a la actualidad, se han convertido en una alternativa competitiva para el análisis comunitario a través de la secuenciación masiva de amplicones de ADN y la secuenciación de metagenómica directa derivados de las comunidades de microorganismos para su identificación (Debenport et al., 2014; Debenport et al., 2015; Vaughan et al., 2015), los cuales probablemente proporcionarán nuevos inoculantes valiosos para la prevención de enfermedades, promover la tolerancia al estrés y mejorar la calidad del grano. No obstante, para determinar el impacto de un microorganismo en un objetivo deseado y para incluirlo en la producción, este debe recuperarse en un cultivo, no obstante, la mayor parte de la diversidad microbiana aún no se ha cultivado, debido a una serie de factores, incluidos medios de aislamiento o condiciones de crecimiento inadecuados (Elhalis et al., 2020).

Sabiendo todo esto, se debe contemplar el desarrollo de tecnologías (Microbiome Biotechnology) que permitan la manipulación del microbioma del cultivo *in situ*, de tal manera que se conviertan en una parte integral del aumento sostenible de la productividad agrícola y así garantice la seguridad alimentaria y nutricional de las futuras poblaciones mundiales (Mueller y Sachs, 2015). Para lograr esto, se necesitará la integración multidisciplinaria para integrar tecnologías emergentes (ómicas, impresión 3D, biología sintética) con enfoques más tradicionales como la ecología microbiana, ecofisiología vegetal y genética (Mishra, 2021), que luego se deberán integrar con tecnologías de detección remota, satelitales y basadas en sensores, que tengan la capacidad de trabajar con datos masivos para resaltar el verdadero potencial de las herramientas de microbiomas en los sectores de agricultura y alimentos (Singh y Trivedi, 2017).

Estudios como la presente investigación nos ayudan a tener una mejor comprensión de los microbiomas, ya que prácticamente todos los procesos de los ecosistemas están influenciados por microorganismos, y muchos procesos son llevados a cabo exclusivamente por ellos (Graham et al., 2014; Graham et al., 2016). Además, su uso en el cultivo y la industria del café aún no se explota a pesar de su capacidad potencial para reducir la cantidad de insumos químicos, mejorar la calidad del café y aumentar los ingresos de los agricultores a través de certificaciones sostenibles (Mithöfer et al., 2017). También se puede enfocar el microbioma/microbiota vegetal como nueva estrategia de fitomejoramiento para mantener la productividad de manera sostenible (Nogales et al., 2016; Orozco-Mosqueda et al., 2018; Arif et al., 2020), integrando principios biológicos, físicos, químicos y ecológicos para desarrollar nuevas prácticas que no sean dañinas para el medio ambiente y que beneficien económicamente a los agricultores (Tahat et al., 2020).

IV. DISCUSIÓN

El café es considerado una de las bebidas con mayor consumo a nivel mundial y uno de los principales cultivos comerciales (ICO, 2018). La calidad del café tiende a ser influenciada por distintos factores como: clima, genotipo, prácticas agronómicas y ubicación geográfica (Bressani et al., 2019; Pereira et al., 2021), así como también por procesos posteriores a la cosecha que incluyen el procesamiento primario, el secado, el tostado y las condiciones de almacenamiento (Pereira y Moreira, 2017). El proceso de fermentación del café es uno de los principales métodos primarios de procesamiento y si se realiza correctamente, puede producir cafés de altas cualidades sensoriales (Pereira et al., 2014; Silva et al., 2014; Evangelista et al., 2015; Pereira et al., 2015; Mariyam et al., 2022).

Este proceso de fermentación es una fuente rica de microorganismos que incluyen bacterias del ácido láctico, bacterias del ácido acético, enterobacterias, levaduras y hongos (De Bruyn et al., 2017; De Carvalho et al., 2017; De Oliveira et al., 2019), que, en este entorno en constante cambio de metabolitos, alteran significativamente el sabor, aroma y la calidad general del café (Restrepo, 2022). Debido a esta relación se generan perfiles aromáticos

(compuestos volátiles) que contribuyen a la generación de atributos deseables para la calidad del café (Caporaso et al., 2018). Es así que, en el presente estudio, se empleó el análisis de metagenómica para estudiar los distintos microorganismos presentes durante el proceso de fermentación del café, que permitió la secuenciación y el análisis del ADN genómico combinado de muestras completas (Lapidus y Korobeynikov, 2021) en las regiones de Cajamarca y Amazonas, además se empleó la cromatografía de gases que permitió la identificación de los compuestos orgánicos volátiles asociados a este mismo (Stilo et al., 2021).

Diversos estudios han identificado bacterias de ácido láctico (LBA) (De Melo et al., 2020), entre los géneros *Lactococcus*, *Weissella*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc* (De Carvalho et al., 2018; De Oliveira et al., 2019; Martins et al., 2020; Pothakos et al., 2020). Coincidiendo estos tres últimos con los identificados en el proceso de fermentación corta, mientras que en el proceso de fermentación larga solo coincidió el género *Leuconostoc*. Las levaduras también juegan un papel esencial en el proceso de fermentación (Elhalis et al., 2020). Entre los géneros de levadura más reportados se encuentran *Pichia*, *Saccharomyces*, *Hanseniaspora* y *Candida* (De Melo Pereira et al., 2014; De Oliveira et al., 2019; Zhang et al., 2019), habiendo sido estas últimas identificadas en este estudio junto con los géneros *Starmerella*, *Lachancea*, en fermentación larga y *Penicillium*, *Fusarium* en fermentación corta.

Los hábitats naturales de estos microorganismos incluyen frutas, corteza de los árboles, el suelo, agua, aire, entre otros (Ruta y Farcasanu, 2021), si bien la diversidad microbiana en el proceso de fermentación del café ha sido estudiada en diferentes países, se ha demostrado que dicha diversidad es específica de cada región geográfica y nicho (De Oliveira et al., 2019), lo que ahora se suele conocer como “terruño microbiano”, que postula que "los sabores y aromas regionales en los productos fermentados pueden deberse en parte a la diversidad microbiana estructurada regionalmente" (Miura et al., 2017; Morrison-Whittle y Goddard, 2018; Belda et al., 2020).

No obstante, se conoce desde hace ya muchos años que entre 80-90% de los microorganismos que habitan en los distintos biomas son desconocidos (Lapidus y Korobeynikov, 2021), el cual se ve reflejado en el presente estudio ya que existieron en el inicio y final de la fermentación larga un 75,90% y 42,37% y en el proceso de fermentación corta un 60,56% y 73,68%, de microorganismos correspondientes al grupo bacteria y fungi respectivamente cuyas secuencias no coinciden con las identificadas ni con otras secuencias de las bases de datos consultadas, por lo que se trataría de secuencias que corresponden a géneros aún no caracterizados y, por ende, no han sido asignados taxonómicamente.

Es allí donde el estudio e investigación de los distintos grupos microbianos es de suma importancia ya que, si se utilizan críticamente, pueden contribuir significativamente al desarrollo sostenible (Kuhad, 2012). En este enfoque de desarrollo sostenible, los microorganismos se pueden utilizar en la agricultura como una tecnología verde, para mejorar la fertilidad del suelo, la productividad de los cultivos y el biocontrol de los patógenos de las plantas (Johansson et al., 2004; Khan et al., 2009; Akinsemolu, 2018). Es allí donde la información obtenida de la metagenómica centrada en genes, a veces en combinación con la secuenciación de ARN (metatranscriptómica) y la identificación de proteínas (metaproteómica), proporciona una mayor comprensión de los procesos microbianos que rigen los ciclos biogeoquímicos en los ecosistemas (Tas et al., 2021), además de realizar análisis de genomas comparativos para estudiar las características filogenéticas y funcionales de las comunidades microbianas, empleando este enfoque para identificar rasgos ecogenómicos (Wilhelm et al., 2021).

El análisis funcional reveló características metabólicas interesantes que nos ayudarán a entender los distintos procesos biológicos que suceden en el fermento del café y su importancia. En cuanto al metabolismo de aminoácidos, la producción de GABA por los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, están relacionados a eludir el estrés ácido (Kim et al., 2009; Filannino et al., 2014; Laroute et al., 2016), así también el uso de ácido cafeico por el género *Lactobacillus* se relacionan al cofactor de regeneración, así como la absorción

de ácido cítrico, ácido málico y ácido quínico, que generalmente tienen lugar durante las fermentaciones de vegetales y frutas (Filannino et al., 2014; Gänzle, 2015). Además, las bacterias de ácido láctico (BAL), involucradas en la producción de ácidos orgánicos como el ácido láctico, ácido acético y ácido succínico, pero en menos vías de metabolismo secundario y en funciones auxotróficas para vitaminas y aminoácidos (Pothakos et al., 2020). Mientras que el género *Pichia* puede participar en el proceso de fermentación del café húmedo, las levaduras están particularmente involucradas en el procesamiento del café en seco, al igual que las especies de bacterias de ácido acético (BAA) (De Bruyn et al., 2017)

El proceso de fermentación puede aumentar la diversidad de compuestos de aroma y sabor del café. En esta investigación se identificó un total de 157 compuestos volátiles diferentes, pero como mencionan Tressi (1989) y Farah et al., (2012), se han identificado más de 700 compuestos volátiles y no volátiles que contribuyen al sabor del café. La mayor parte de estudios científicos ha estudiado a los compuestos volátiles en granos de café verde y tostado tales como los de, Dong et al., (2018), identificaron 90 compuestos volátiles incluyendo incluyendo 11 furanos, 19 pirazinas, 31 cetonas, 9 aldehídos, 9 fenoles, 7 pirroles, 7 piridinas, 5 ésteres, 8 ácidos, 7 alcoholes y otros 18; Kim et al., (2019), donde identificaron 98 compuestos volátiles diferentes; Chindapan et al., (2021), identificaron 45 compuestos entre pirazinas, furanos, piridinas, pirroles, fenoles, cetonas, amina, aldehído, pirano, pirazol y un ácido alifático, que se desarrollaron a partir de los 230 °C. Lo que indicaría que se requiere de una mayor investigación de estos compuestos volátiles, dentro del proceso de fermentación.

Para identificar la microbiota funcional central responsable de la fermentación y los compuestos aromáticos volátiles, se utilizó un modelo de correlación para revelar las posibles correlaciones entre los microorganismos y los compuestos aromáticos volátiles en el proceso de fermentación. Presentaron correlaciones positivas miembros del grupo bacteria y fungi: Ba_Unidentified y *Escherichia* al inicio de la fermentación larga, mientras que *Acetobacter* y *methylobacterium* al final de la fermentación larga, Eu-unidentified tanto para

el inicio y final de la fermentación larga, con el compuesto phenylethyl alcohol, los cuales serían responsables de otorgar características florales y frutadas (Caporaso et al., 2018) El género *Pichia* presentó correlación positiva con hexanal y 2butenal, 3-methyl, los cuales aportan características verdes almendrosas al café (Liu et al., 2019). Brioschi et al., (2020) mencionan que la diversidad bacteriana y las características sensoriales tuvieron una correlación positiva, ya que el aumento de la diversidad bacteriana es directamente proporcional al aumento del regusto y la fragancia, sin embargo, estas características sensoriales no se correlacionaron directamente con la diversidad de hongos. Pero se confirma la influencia de las comunidades bacterianas y fúngicas en los perfiles sensoriales, tal como lo mencionan Lee et al., (2015) quienes sugieren que la formación de compuestos aromáticos puede estar asociada con microorganismos.

En cuanto a la presencia/ausencia de microorganismos en los distintos tiempos de fermentación, se pudo apreciar que dentro del grupo bacterias, *Acetobacter* y *Methylobacterium* estuvieron ausentes en el IFL, apareciendo sin embargo en el FFL, ocurriendo lo opuesto con *Tatumella* y *Escherichia*, quienes estuvieron presentes en el IFL, pero ausentes en el FFL. En cuanto al grupo fungi, solo el género *Lachancea* estuvo ausente en el IFL, pero apareció en el FFL. Esto podría deberse como lo explica Hadiwidodo et al, (2019) al distinto desarrollo microbiano en las fases mesofílica, termofílica y de maduración, asociado a los distintos cambios el pH, temperatura y oxígeno (De Bruyn et al., 2017)

En diversos estudios los análisis de correlación de la población microbiana con las variables sensoriales convergen con las propuestas de Pereira et al. (2020), donde gran parte de la composición sensorial y química del café es resultado de metabolitos generados por microorganismos que actúan espontáneamente o inducidos durante la fermentación. Siendo los factores principales que afectan los perfiles de las comunidades microbianas la temperatura y el tiempo de fermentación (Hamdouche et al., 2016; Brioschi et al., 2020), mientras que factores como el clima, altitud, entorno ambiental y las diferentes condiciones de procesamiento de los cerezos y granos de café influyen en la composición

y actividad de las comunidades microbianas (De Bruyn et al., 2017; Guzzon et al., 2020), conjuntamente con el origen geográfico, métodos de procesamiento seco o húmedo, especie de café, topografía del suelo y factores edáficos (Hamdouche et al., 2016; Veloso et al., 2020). No obstante, aún es un reto para la ciencia el comprender completamente las condiciones de procesamiento y qué compuestos promueven rasgos como la acidez beneficiosa o perjudicial para la calidad sensorial del café (Ribeiro et al., 2017).

V. CONCLUSIONES

1. Este estudio, a través del uso del análisis de metagenómica se confirmó la presencia de 14 géneros correspondientes al grupo bacteria: *Gluconobacter*, *Leuconostoc*, *Acetobacter*, *Frateuria*, *Sphingobacterium*, *Tatumella*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Novosphingobium*, *Mycobacterium*, *Escherichia*, *Stenotrophomonas* y 6 géneros correspondientes al grupo fungi: *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Starmerella*, *Lachancea*, *Penicillium* y *Fusarium*.
2. Se identificaron 2 grupos asignados como Ba_Unidentified y Eu_Unidentified que correspondieron a microorganismos bacterias y eucariotas cuyas secuencias corresponden a géneros aún no caracterizados. La abundancia relativa del grupo designado como Ba_Unidentified fue de 75,90% y 60,56%; mientras que del grupo Eu_Unidentified fue de 42,37% y 73,68%, ambos para fermentación larga y corta respectivamente.
3. Las abundancias relativas de los géneros del grupo bacteria fue de: *Gluconobacter* (7,83%), *Frateuria* (5,42%), *Acetobacter* (4,82%), *Leuconostoc* (3,61%), *Tatumella* (1,20%), *Methylobacterium* (0,60%), *Escherichia* (0,60%) en ambas etapas de la fermentación larga y de *Gluconobacter* (7,05%), *Leuconostoc* (5,63%), *Sphingobacterium* (5,63%), *Lactobacillus* (4,23%), *Weissella* (4,23%), *Acetobacter* (2,82%), *Tatumella* (2,82%), *Pseudomonas* (2,82%), *Novosphingobium* (1,41%), *Mycobacterium* (1,41%), *Stenotrophomonas* (1,41%) en el proceso de fermentación corta.
4. Las abundancias relativas de los géneros del grupo fungi fue de: *Hanseniaspora* (27,12%), *Pichia* (13,56%), *Starmerella* (11,86%), *Lachancea* (5,08%) en ambas etapas de la fermentación larga y de

Hanseniaspora (10,53%), *Pichia* (5,26%), *Penicillium* (5,26%), *Fusarium* (5,26%) en el proceso de fermentación corta.

5. La mayor proporción de genes detectados en ambos procesos de fermentación estuvieron relacionados con: propiedades del genoma, metabolismo, biosíntesis, catabolismo, metabolismo de ácidos nucleicos, metabolismo energético, metabolismo de aminoácidos, transporte, metabolismo intermediario central, y otros en menor proporción.
6. El análisis de cromatografía de gases permitió identificar 157 compuestos volátiles, divididos de la siguiente manera: 3 ácidos, 13 alcoholes, 16 aldehídos, 13 alcanos, 2 hidrocarburos aromáticos, 5 bencenos, 24 ésteres, 1 éter, 2 furanos, 10 cetonas, 2 pirazinas, 9 terpenos y otros 57 compuestos cuyo grupo funcional no fue asignado.
7. Los análisis y consultas bibliográficas permitieron identificar 6 compuestos volátiles específicamente asociados a las características organolépticas del café en proceso de fermentación, estos fueron: phenylethyl alcohol (floral, afrutado), hexanal (verde, afrutado), benzaldehyde (almendra grasa), 2-Butenal, 3-methyl-, Furan, 2-pentyl-, 3-Pentanone, estos tres últimos se los describe, más aún no está detallado sus atributos.
8. Existieron correlaciones positivas ($r > 0,90$) entre géneros del grupo bacteria y compuestos volátiles:); *Escherichia* y Phenylethyl alcohol; *Leuconostoc* y Benzaldehyde, hexanal; 2-Butenal, 3-methyl-, 3-Pentanone; *Frateuria* y 3-Pentanone; *Gluconobacter* y 2-Butenal, 3-methyl; *Methylobacterium* y Phenylethyl alcohol. Géneros del grupo bacteria y rutas metabólicas ($r > 0,90$): *Escherichia* y catabolismo; *Frateuria* y metabolismo, metabolismo de ácidos nucleicos, metabolismo de aminoácidos, metabolismo de proteínas; *Gluconobacter* y biosíntesis, transporte, metabolismo, metabolismo de ácidos nucleicos; *Leuconostoc* y metabolismo, metabolismo de ácidos nucleicos, metabolismo energético, metabolismo de aminoácidos, metabolismo de proteínas; *Tatumella* y metabolismo de proteínas.
9. Existieron correlaciones positivas ($r > 0,90$) entre géneros del grupo fungi y compuestos volátiles: *Hanseniaspora* y hexanal, 2-Butenal, 3-methyl- ($r = 0,93$); *Pichia* y hexanal, -butenal, 3-methyl-; *Starmerella* y hexanal, Furan, 2-pentyl-, 2-Butenal, 3-methyl-. Géneros del grupo fungi y rutas

metabólicas: *Hanseniaspora* y Metabolismo de proteínas, biosíntesis, catabolismo; *Lachancea* y propiedades del genoma; *Pichia* y metabolismo de proteínas, catabolismo, biosíntesis; *Starmerella* y propiedades del genoma, biosíntesis, transporte, catabolismo.

VI. RECOMENDACIONES

1. La importancia de la microbiota nativa en los diferentes aspectos que denotan la fertilidad de un suelo, el mejoramiento de la calidad de un cultivo y su aprovechamiento para la sostenibilidad de ecosistemas y agroecosistemas, hacen que sea crucial el levantamiento de líneas de base para su caracterización en detalle, mediante el empleo de marcadores moleculares que se han constituido en herramientas valiosas para la detección y el uso de la diversidad genética.
2. En países megadiversos como el nuestro, el desarrollo de bioconocimiento es todavía insuficiente, como para poder tener datos cuantitativos de la certera riqueza biológica que posee el Perú y dimensionar la relevancia de los procesos bioecológicos y evolutivos en los diferentes ecosistemas. Por lo tanto, el desarrollo consecuente de los análisis moleculares es de crucial importancia.
3. Se recomienda complementar los datos de cromatografía de gases con datos análisis de cromatografía líquida para caracterizar otro tipo de componentes como compuestos inorgánicos, orgánicos, gases disueltos, partículas, incluso microorganismos, preferentemente que sean de peso molecular superior a 300 u.m.a., sensibles a una elevación de la temperatura incluso moderada y que se encuentren en forma iónica.
4. Se debe implementar un banco de microorganismos a nivel nacional de importancia en investigación agrícola, por ejemplo, como lo tiene Europa, Microbial Resource Research Infrastructure (MIRRI), el cual tiene como objetivo la conservación, investigación sistemática, suministro y valorización de los recursos microbianos y la biodiversidad.
5. Se recomienda concientizar sobre la importancia del tiempo de fermentación en la calidad final del café y tratar de estandarizar ese proceso según condiciones ambientales (altura, temperatura, húmeda, etc), microorganismos asociados y técnicas adecuadas. Con el fin de lograr

aumentar su valor comercial, de tal manera que se establezcan propiedades sensoriales sobre el producto final que permitan identificar características específicas de dicho café, para así garantizar estándares de calidad sobre el producto y asegurar su calidad en el tiempo.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akinsemolu, A. A. (2018). The role of microorganisms in achieving the sustainable development goals. *Journal of Cleaner Production*, 182, 139–155.
- Altieri, M. A., Funes-Monzote, F. R., Petersen, P. (2012). Agroecologically efficient agricultural systems for smallholder farmers: contributions to food sovereignty. *Agron. Sustain. Dev*, 32, 1-13.
- Arif, I., Batool, M., and Schenk, P. M. (2020). Plant microbiome engineering: expected benefits for improved crop growth and resilience. *Trends in Biotechnology*
- Avallone, S., Guyot, B., Brillouet, J.M., Olguin, E. & Guiraud, J.P. (2001). Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. *Current Microbiology*, 42, 252–256.
- Avallone, S., Brillouet, J.M., Guyot, B., & Olguin, E., Guiraud, J.P. (2002). Involvement of pectolytic micro-organisms in coffee fermentation. *International Journal of Food Science and Technology*. 37 (2), 191–198.
- Ballesteros, L.F., Teixeira, J.A., & Mussatto, S.I. (2014). Chemical, functional and structural properties of spent coffee grounds and coffee silverskin. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 3493–3503.
- Basu, S., Bosen, C., Ojha, N., Das, N., & Das, J. (2015) Evolution of bacterial and fungal growth media. *Bioinformation* 11, 182–184.
- Bayman, P., Baker, J. L. (2006). Ochratoxins: a global perspective. *Mycopathologia*, 162,215–223.
- Begyaraj, D. J. (2014). Microorganisms in sustainable agricultura. *Proc Indian Natl Sci Acad*, 80(2), 357.
- Belda, I., Gobbi, A., Ruiz, J., de Celis, M., Ortiz-Alvarez, R., Acedo, A., & Santos, A. (2020). Microbiomics to define wine terroir. *Reference Module in Food Science*, 3, 1–14.

- Bilal, T., Malik, B., & Hakeem, K. R. (2018). Metagenomic analysis of uncultured microorganisms and their enzymatic attributes. *Journal of Microbiological Methods*, 155, 65–69.
- Bokulich, N. A., Ohta, M., Richardson, P. M., & Mills, D.A. (2013). Monitoring seasonal changes in winery-resident microbiota. *PLoS One*, 8, e66437.
- Brando, C. H. J., & Brando, M. F. (2014). Methods of coffee fermentation and drying, in *Cocoa and Coffee Fermentations*, eds R. F. Schwan, & G. H. Fleet. 367–396. Florida, United States: Editorial CRC Press.
- Bressani, A., Martinez, S., Sarmiento, A., Borém, F., & Schwan, R. (2019). Organic Acids Produced during Fermentation and Sensory Perception in Specialty Coffee using Yeast Starter Culture. *Food Research International*, 108773.
- Bressani, A. P. P., Martínez, S. J., Sarmiento, A. B. I., Borem, F. M., Schwan, R. F. (2020). Organic acids produced during fermentation and sensory perception in specialty coffee using yeast starter culture. *Food Research International*, 128, 108773.
- Brioschi, D., Carvalho, R., da Silva, M., Veloso, T., Kasuya, M., Oliveira, E., da Luz, J. M., Moreira, T., Debona, D., & Pereira, L. (2020). Microbial fermentation affects sensorial, chemical, and microbial profile of coffee under carbonic maceration. *Food Chemistry*, 128296.
- CAFELAB (2018). Taza de excelencia Perú 2018: El mejor café es de Cusco. <https://cafelab.pe/2018/10/13/taza-de-excelencia-peru-2018-el-mejor-cafe-es-del-cusco/>
- CAFELAB (2019). Todo sobre la III edición de taza de excelencia Perú 2019. <https://cafelab.pe/2019/08/12/todo-lo-que-necesitas-saber-sobre-la-iii-competencia-taza-de-excelencia-peru-2019/>
- Caporaso, N., Whitworth, M. B., Cui, C. & Fisk, I. D. (2018). Variability of single bean coffee volatile compounds of Arabica and Robusta roasted coffees analysed by SPME-GC-MS. *Food Research International*, 108, 628–640.
- Chen, K. & Pachter, L. (2005). Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities. *PLoS Computational Biology*, 1, e24.

- Chindapan, N., Puangngoen, C., & Devahastin, S. (2021). Profiles of volatile compounds and sensory characteristics of Robusta coffee beans roasted by hot air and superheated steam. *International Journal of Food Science & Technology*, 56 (8), 3814–3825.
- Cocolin, L., Dolci, P., & Rantsiou, K. (2011). Biodiversity and dynamics of meat fermentations: The Contribution of molecular methods for a better comprehension of a complex ecosystem. *Meat Science*. 89, 296–302.
- Corsetti, A., Perpetuini, G., Schirone, M., Tofalo, R., & Suzzi, G. (2012). Application of starter cultures to table olive fermentation: an overview on the experimental studies. *Frontiers in Microbiology*, 3.
- Czerny, M., Grosch, W. (2000). Potent odorants of raw Arabica coffee. Their changes during roasting. *J. Agric. Food Chem.* 48 (3), 868–872.
- Daniel, R. (2005). The metagenomics of soil. *Nature Reviews Microbiology*, 3(6), 470–478.
- Debenport, S., Bayala, R., Assigbetse, K., Chapuis-Lardy, L., Dick, R., & McSpadden, B. (2014). Identification of bacterial markers associated with increased plant growth in Senegal using high throughput sequencing community analysis, abstr 1763. Abstr 114th Gen Meet Am Soc Microbiol, 17–20 May 2014, Boston, MA.
- Debenport, S., Assigbetse, K., Bayala, R., Chapuis-Lardy, L., Dick, R., McSpadden, B. (2015). Association of shifting populations in the root zone microbiome of millet with enhanced crop productivity in the Sahel region (Africa). *Appl Environ Microbiol*, 81, 2841–2851.
- De Bruyn, F., Zhang, J. S., Pothakos, V., Torres, J., Lambot, C., Moroni, A. V., Callanan, M., Sybesma, W., Weckx, S., & De Vuyst, L. (2017). Exploring the impacts of postharvest processing on the microbiota and metabolite profiles during green coffee bean production. *Applied Environmental Microbiology*, 83, e2316–e2398.
- De Carvalho, D., De Melo, G., Tanobe, V., Thomaz, V., Silva, G. Da, Rodrigues, B., & Soccol, C. (2017). Yeast diversity and physicochemical characteristics

- associated with coffee bean fermentation from the Brazilian Cerrado Mineiro region. *Fermentation*, 3(1), 11.
- De Carvalho, D. P., De Melo, G. V., De Carvalho, J. C., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2018). High-throughput rRNA gene sequencing reveals high and complex bacterial diversity associated with Brazilian coffee beans fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, 56 (1), 90–95.
- De Jesus Cassimiro, D. B., Nara, N., Calixto, H., Oliveira, J. A., Ribeiro, D., & Freitas, R. (2022). Coinoculation of lactic acid bacteria and yeasts increases the quality of wet fermented Arabica coffee. *International Journal of Food Microbiology*, 369, 109627.
- De Melo, G. V., Soccol, V. T., Pandey, A., Medeiros, A. B. P., Andrade, J. M. R., Gollo, A. L., & Soccol, C. R. (2014). Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. *International Journal of Food Microbiology*, 188(1), 60–66.
- De Melo, G. V., Da Silva, A., De Carvalho, D. P., Muynarsk, E. S., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2020). Lactic acid bacteria: what coffee industry should know? *Current Opinion in Food Science*. 31, 1–8.
- De Oliveira, A. C., De Melo, G. V., Medina, J. D. C., Alvear, M. C. R., Rosero, R., de Carvalho Neto, D. P., Enríquez, H. G., & Soccol, C. R. (2019). First description of bacterial and fungal communities in Colombian coffee beans fermentation analysed using Illumina-based amplicon sequencing. *Scientific Reports*. 9 (1), 1–10.
- Descroix, F., y Snoeck, J. (2009). Factores ambientales propicios para el cultivo del café. En JN Wintgens (Ed.), *Café: cultivo, procesamiento, producción sostenible: una guía para productores, procesadores, comerciantes e investigadores* (2.^a ed., 168–181). Weinheim: Wiley-VCH.
- Djossou, O., Perraud-Gaime, I., Lakhal, F., Rodriguez-Serrano, G., Karou, G., Niamke, S., Ouzari, I., Boudabous, A., & Roussos, S. (2011). Robusta coffee beans post-harvest microflora: *Lactobacillus plantarum* sp. as potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*. *Anaerobe*, 17, 267–272.

- Dong, W., Hu, R., Long, Y., Li, H., Zhang, Y., Zhu, K., & Chu, Z. (2018). Comparative evaluation of the volatile profiles and taste properties of roasted coffee beans as affected by drying method and detected by electronic nose, electronic tongue, and HS-SPME-GC-MS. *Food Chemistry*, 723–731.
- Duquenne, P. (2017). On the identification of culturable microorganisms for the assessment of biodiversity in bioaerosols. *Annals of Work Exposures and Health*, 62(2), 139–146.
- Elhalis, H., Cox, J., Frank, D., & Zhao, J. (2020). The crucial role of yeasts in the wet fermentation of coffee beans and quality. *International Journal of Food Microbiology*, 108796.
- Elhalis, H., Cox, J., & Zhao, J., (2020). Ecological diversity, evolution and metabolism of microbial communities in the wet fermentation of Australian coffee beans. *International Journal of Food Microbiology*. 321, 108544.
- El-Mansi, E., Bryce, C., Hartley, B., & Demain A. (2011). Fermentation microbiology and biotechnology, 1–8. In Allman A (ed), *Fermentation microbiology and biotechnology*, 3rd ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Evangelista, S., Ferreira, C., Pedrozo, M.G., De Souza, C., Marques, A., Ferreira, W. & Freitas, R. (2014). Improvement of coffee beverage quality by using selected yeast strains during the fermentation in dry process. *Food Research International*, 61, 183–195.
- Evangelista, S., Pedrozo, M.G., Ferreira, C., Marques, A.C., & Freitas, R. (2015). Microbiological diversity associated with the spontaneous wet method of coffee fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 210, 102–112.
- Farah, A. (2012). Coffee constituents. *Coffee Emerging. Health Effects and Disease Prevention*, 2, 21–58.
- Febrianto, N. A., Yang, T. A., Wan Abdullah, W. A. (2016). Cocoa-like flavor compound development of rambutan seed fat as the effect of fermentation and roasting. *Int. Food Res. J.* 23 (5).

- Fekede, G.T., & Gosa, A.G. (2015). Opportunities and constraints of coffee production in West Hararghe, Ethiopia. *Journal of Agricultural Economics and Rural Development*, 2, 54–59.
- Ferreira, C. (2014). Microbial activity during coffee fermentation, 397–430. In *Cocoa and coffee fermentations*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Filannino, P., Cardinali, G., Rizzello, C. G., Buchin, S., De Angelis, M., Gobbetti, M., & Di Cagno, R. (2014). Metabolic responses of *Lactobacillus plantarum* strains during fermentation and storage of vegetable and fruit juices. *Applied and environmental microbiology*, 80(7), 2206–2215.
- Flament, I., Gautschi, F., Winter, M., Willhalm, B., Stoll, M. (1968). Les composants furanniques de l'arome de café: quelques aspects chimiques et spectroscopiques. In (633.73063 C714 1967 ed.). Association Scientifique Internationale du Café, Paris (France).
- Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2, 106–117.
- Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S. M., & Toulmin, C. (2010). Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science* 327, 812–818.
- Graham, E. B., Wieder, W. R., Leff, J. W., Weintraub, S. R., Townsend, A. R., Cleveland, C. C., Philippot, L., & Nemergut, D. R. (2014). Do we need to understand microbial communities to predict ecosystem function? A comparison of statistical models of nitrogen cycling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 68, 279–282.
- Graham, E. B., Knelman, J. E., Schindlbacher, A., Siciliano, S., Breulmann, M., Yannarell, A., ... Nemergut, D. R. (2016). Microbes as engines of ecosystem function: when does community structure enhance predictions of ecosystem processes? *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Guzzon, R., Malacarne, M., Larcher, R., Franciosi, E., & Toffanin, A. (2020). The impact of grape processing and carbonic maceration on the microbiota of early stages of winemaking. *Journal of Applied Microbiology*, 128, 209–224.

- Hadiwidodo, M., Sutrisno, E., Prasetyo, B., Daisy, A., & Muhammad, F. I. (2019). Effect of Sugar Cane Addition on Rabbit Food Quality from Restaurant and Vegetable Waste with Fermentation Technology. *E3S Web of Conferences*, 125, 07001.
- Haile, M., & Kang, W. H. (2019). The Role of Microbes in Coffee Fermentation and Their Impact on Coffee Quality. *Journal of Food Quality*, 1–6.
- Hamdouche, Y., Meile, J. C., Nganou, D. N., Durand, N., Teyssier, C., & Montet, D. (2016). Discrimination of post-harvest coffee processing methods by microbial ecology analyses. *Food Control*, 65, 112–120.
- Han, D. M., Chun, B. H., Kim, H. M., & Jeon, C. O. (2021). Characterization and correlation of microbial communities and metabolite and volatile compounds in doenjang fermentation. *Food Research International*, 148, 110645.
- Hocking, A. D. (2006). *Advances in food mycology*. Springer, New York, NY.
- ICO. International Coffee Organization (2018) Total production by all exporting countries (in thousands 60 kg bags). London. United Kingdom.
- ICO. International Coffee Organization (2021). Coffee Market Report May 2021. London. United Kingdom.
- ICO. International Coffee Organization (2021). Total production of exporting countries May 2021. London. United Kingdom.
- INEI. Instituto Nacional de Estadística e Informática (2012). Censo Nacional Agropecuario. 63.
- Jannissen, B., & Huynh, T. (2018). Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: a review. *Resource, Conservation and Recycling*. 128, 110–117.
- Jaramillo, J., Muchugu, E., Veja, F. E., Davis, A., Borgemeister, C., & Chabi-Olaye, A. (2011). Some like it hot: the influence and implications of climate change on coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and coffee production in East Africa. *PLoS One*, 6, e24528.

- Johansson, J. F., Paul, L. R., & Finlay, R. D. (2004). Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology*.
- Junqueira, A. C. O., Pereira, G. V. M., Medina, J. D. C., Alvear, M. C. R., Rosero, R., & Carvalho, D. P. (2019) First description of bacterial and fungal communities in Colombian coffee beans fermentation analysed using illumina-based amplicon sequencing. *Sci Rep*, 9, 1–10.
- Kaeberlein, T., Lewis, K., & Epstein, S. S. (2002) Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* 296, 1127–1129.
- Khan, M. S., Zaidi, A., & Wani, P. A. (2009). Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - A review. *Sustainable Agriculture*, 551–570.
- Kim, J. Y., Lee, M. Y., Ji, G. E., Lee, Y. S., & Hwang, K. T. (2009). Production of γ -aminobutyric acid in black raspberry juice during fermentation by *Lactobacillus brevis* GABA. *International Journal of Food Microbiology*, 130, 12–16.
- Kim, H. J., Hong, D. L., Yu, J. W., Lee, S. M., & Lee, Y. B. (2019). Identification of Headspace Volatile Compounds of Blended Coffee and Application to Principal Component Analysis. *Preventive nutrition and food science*, 24(2), 217–223.
- Kim, Y. C., Leveau, J., Gardener, B. B. M. S., Pierson, E. A., Pierson, L. S., & Ryu, C. M. (2011). The multifactorial basis for plant health promotion by plant-associated bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 77, 1548–1555.
- Knopp, S., Bytof, G., & Selmar, D. (2006) Influence of processing on the content of sugars in green Arabica coffee beans. *European Food Research and Technology*, 223 (2), 195–201.
- Kuhad, R. (2012). Microbes and their Role in Sustainable Development. *Indian Journal of Microbiology*, 52, 309– 313.

- Lapidus, A. L & Korobeynikov, A. I. (2021). Metagenomic Data Assembly – The Way of Decoding Unknown Microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 12, 613791.
- Laroute, V., Yasaro, C., Narin, W., Mazzoli, R., Pessione, E., Coccagn-Bousquet, M., & Loubière, P. (2016). GABA Production in *Lactococcus lactis* Is Enhanced by Arginine and Co-addition of Malate. *Frontiers in microbiology*, 7, 1050.
- Lewis, W. H., Tahon, G., Geesink, P., Sousa, D. Z., & Ettema, T. J. G. (2020). Innovations to culturing the uncultured microbial majority. *Nature Reviews Microbiology*, 19(4), 225–240.
- Lee, P.-R., Toh, M., Yu, B., Curran, P., & Liu, S.-Q. (2012). Manipulation of volatile compound transformation in durian wine by nitrogen supplementation. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(3), 650–662.
- Lee, P.-R., Toh, M., Yu, B., Curran, P., & Liu, S.-Q. (2013). Manipulation of volatile compound transformation in durian wine by nitrogen supplementation. *International Journal of Food Science & Technology*, 48, 650e662.
- Lee, D. J., Show, K. Y., Wang, A. (2013). Unconventional approaches to isolation and enrichment of functional microbial consortium—a review. *Bioresource Technology*, 136, 697–706.
- Lee, L. W., Cheong, M. W., Curran, P., Yu, B., & Liu, S. Q. (2015). Coffee fermentation and flavor-An intricate and delicate relationship. *Food Chemistry*, 185, 182–191.
- Lee, L.W., Cheong, M. W., Curran, P., Yu, B., Liu, S. Q. (2016). Modulation of coffee aroma via the fermentation of green coffee beans with *Rhizopus oligosporus*: I. Green coffee. *Food Chemistry*, 211, 916–924.
- Lee, L. W., Tay, G. Y., Cheong, M. W., Curran, P., Yu, B., & Liu, S. Q. (2017). Modulation of the volatile and non-volatile profiles of coffee fermented with *Yarrowia lipolytica*: I. Green coffee. *LWT-Food Science and Technology*, 77, 225–232.

- Lee, S. J., Kim, M. K., & Lee, K. G. (2017). Effect of reversed coffee grinding and roasting process on physicochemical properties including volatile compound profiles. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 44, 97–102.
- Li, M., Yang, R., Zhang, H., Wang, S., Chen, D., & Lin, S. (2019). Development of a flavor fingerprint by HS-GC–IMS with PCA for volatile compounds of *Tricholoma matsutake* Singer. *Food Chemistry*, 290, 32–39.
- Lim, J. W., Park, T., Tong, Y. W., & Yu, Z. (2020). The microbiome driving anaerobic digestion and microbial analysis. *Advances in Bioenergy*, 5.
- Liu, C., Yang, Q., Linforth, R., Fisk, I. D., Yang, N. (2019). Modifying Robusta coffee aroma by green bean chemical pre-treatment. *Food Chemistry*. 272, 251–257.
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol*, 63, 541–556.
- McKenzie, A. T., Katsyv, I., Song, W.-M., Wang, M., & Zhang, B. (2016). DGCA: A comprehensive R package for Differential Gene Correlation Analysis. *BMC Systems Biology*, 10(1).
- Ma, K., & Kim, S. D. (2018). Development of techniques for isolating microorganisms. *Enliven: Microbes and Microbial Techniques*, 5(1), 001.
- Mariyam, S., Kistanti, A., Karyadi, J. N. W., & Widiyastuti, R. J. (2022). Improving coffee quality through yeast addition in the fermentation process to support sustainable coffee production. *Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1005, 012012.
- Martins, P. M. M., Batista, N. N., Simao, J. B. P., Soares, J. R., & Schwan, R. F. (2020). Coffee growing altitude influences the microbiota, chemical compounds and the quality of fermented coffees. *Food Research International*. 129, 108872.
- Martinez, S. J., Bressani, A. P. P., Miguel, M. G. C. P., Dias, D. R. & Schwan, R.F. (2017). Different inoculation methods for semi-dry processed coffee using yeasts as starter cultures. *Food Research International*, 102, 333–340.

- Massawe, G.A., & Lifa, S.J. (2010). Yeasts and lactic acid bacteria coffee fermentation starter cultures. *International Journal of Postharvest Technology and Innovation*, 2, 41–80.
- Masoud, W., Bjørg Cesar, L., Jespersen, L., Jakobsen, M. (2004). Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. *Yeast*, 21 (7), 549–556.
- Masoud, W., Poll, L., & Jakobsen, M. (2005). Influence of volatile compounds produced by yeasts predominant during processing of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. *Yeast*, 22, 1133–1142.
- Masoud, W., & Kaltoft, C. H. (2006). The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. *Int J Food Microbiol*, 106, 229–234.
- Masoud, W., & Jespersen, L. (2006). Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. *Int J Food Microbiol*, 110, 291–296.
- Melese, Y.Y., & Kolech, S.A. (2021). Coffee (*Coffea arabica* L.): Methods, Objectives, and Future Strategies of Breeding in Ethiopia—Review. *Sustainability*, 13, 10814.
- Mishra, S. (2022). Emerging Technologies—Principles and Applications in Precision Agriculture. In: Reddy, G.P.O., Raval, M.S., Adinarayana, J., Chaudhary, S. (eds) *Data Science in Agriculture and Natural Resource Management. Studies in Big Data*, 96. Springer, Singapore.
- Miura, T., Sánchez, R., Castañeda, L. E., Godoy, K., & Barbosa, O. (2017). Is microbial terroir related to geographic distance between vineyards? *Environmental Microbiology Reports*, 9, 742–749.
- Mithöfer, D., Méndez, V. E., Bose, A., and Vaast, P. (2017). Harnessing local strength for sustainable coffee value chains in India and Nicaragua: reevaluating certification to global sustainability standards. *International Journal of Biodiversity Science, Ecosystem Services & Management*, 13, 471–496.

- Morrison-Whittle, P., & Goddard, M. R. (2018). From vineyard to winery: a source map of microbial diversity driving wine fermentation. *Environmental Microbiology*, 20, 75–84.
- Mottram, R. (2005). The LRI and Odour Database. Flavour Research Group. School of Food Biosciences, University of Reading, UK <http://www.odour.org.uk/lriindex.html>.
- Mueller, U. G., & Sachs, J. L. (2015) Engineering microbiomes to improve plant and animal health. *Trends Microbiol*, 23, 606–617.
- Mussatto, S. I., Machado, E. M. S., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011). Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. *Food Bioprocess Technol*, 4, 661–672.
- Nayak, S., Harshitha, M. J., Maithili, C. S., Anilkumar, H. S., & Rao, C. V. (2012). Isolation and characterization of caffeine degrading bacteria from coffee pulp. *Indian J Biotechnol*, 11, 86–91.
- Nogales, A., Nobre, T., Valadas, V., Ragonezi, C., Döring, M., Polidoros, A. (2016). Can functional hologenomics aid tackling current challenges in plant breeding? *Briefings in Functional Genomics*, 15, 288–297.
- ONU Organización de las Naciones Unidas. (2018). La Agenda 2030 y los Objetivos de Desarrollo Sostenible: una oportunidad para América Latina y el Caribe.
- Orozco-Mosqueda, M., del Rocha-Granados, M. C., Glick, B. R., and Santoyo, G. (2018). Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. *Microbiological Research*, 208, 25–31.
- Parks D. H., & Beiko R. G. (2010). Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities, *Bioinformatics*, 26, 715–721.
- Pereira, G. V. d. M., Soccol, V. T., Pandey, A., Medeiros, A. B. P., Lara, J. M. R. A., Gollo, A.L., Soccol, C. R. (2014). Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. *International Journal of Food Microbiology*. 188, 60–66.

- Pereira, G. V. d. M., Soccol, V. T., Brar, S. K., Neto, E., & Soccol, C. R. (2017). Microbial ecology and starter culture technology in coffee processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(13), 2775-2788.
- Pereira, L. L., Guarçoni, R. C., Pinheiro, P. F., Osório, V. M., Pinheiro, C. A., Moreira, T. R. (2020). New propositions about coffee wet processing: Chemical and sensory perspectives. *Food Chemistry*, 310, 125943.
- Pereira, L., & Moreira, T. (2021). Quality Determinants in Coffee Production. *Food Engineering Series*.
- Pothakos, V., De Vuyst, L., Zhang, S.J., De Bruyn, F., Verce, M., Torres, J., Callanan, M., Moccand, C., & Weckx, S. (2020). Temporal shotgun metagenomics of an Ecuadorian coffee fermentation process highlights the predominance of lactic acid bacteria. *Current Research in Biotechnology*, 2, 1–15.
- Priyadarshini, P., & Abhilash, P. C. (2020). Policy recommendations for enabling transition towards sustainable agriculture in India. *Land Use Policy*, 96, 104718.
- Rajapaksha, P., Elbourne, A. J., Gangadoo, S., Brown, R., Cozzolino, D., & Chapman, J. (2018). A review of methods for the detection of pathogenic microorganisms. *The Analyst*, 144, 396–411.
- Redman, R. S, Sheehan, K. B, Stout, R. G., Rodriguez, R. J, Henson, J. M. (2002). Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science*, 298, 1581–1581.
- Restrepo, M. (2022). Metagenomic, metabolomic and sensorial characteristics of fermented *Coffea arabica* L. var. Castillo beans inoculated with microbial starter cultures. Universidad de los Andes, Colombia.
- Ribeiro, D., Rodríguez, N., Zambrano, D. A., & López, J. C. (2014). Management and utilization of wastes from coffee processing, 545–588. In *Cocoa and coffee fermentations*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Ribeiro, L. S., Ribeiro, D. E., Evangelista, S. R., Miguel, M. G., Pinheiro, A. C. M., Borém, F. M. (2017). Controlled fermentation of semi-dry coffee (*Coffea*

- arabica*) using starter cultures: a sensory perspective. *LWT – Food Science and Technology*, 82, 32–38.
- Rodrigues, C.L., & Florencio, L. (2020). Global coffee market: Socio-economic and cultural dynamics, eds. L.F. de Almeida & E.E.Spers. 3–19. California, United States: Editorial Elsevier.
- Rodriguez, R. J., White, J. F., Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol*, 182, 314–330.
- Ruta, L. L., & Farcasanu, I. C. (2021). Coffee and yeasts: from flavor to biotechnology. *Fermentation*, 7(1), 9.
- Sahu, P. K., Singh, D. P., Prabha, R., Meena, K. K., & Abhilash, P. C. (2018). Connecting microbial capabilities with the soil and plant health: Options for agricultural sustainability. *Ecological Indicators*.
- Saide, A., Lauritano, C., & Ianora, A. (2021). A treasure of bioactive compounds from the Deep Sea. *Biomedicines*, 9 (11), 1556.
- Schwan, R., Silva, C., & Batista, L. (2012). Coffee fermentation, 677–690. In *Handbook of plant-based fermented food and beverage technology*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Semmelroch, P. & Grosch, W. (1995). Analysis of roasted coffee powders and brews by gas chromatography-olfactometry of headspace samples. *LWT – Food Science and Technology*, 28, 310–313
- Sharma, D., Singh, D., Manzoor, M., Meena, K., Sharma, V., Butaney, K., & Marbaniang, R. G. (2020). Realizing Bioremediation Through Metagenomics: A Technical Review. *Metagenomics: Techniques, Applications, Challenges and Opportunities*, 91–107.
- Silva, C., Schwan, R.F., Dias, E.S., & Wheals, A.E. (2000). Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *International Journal Food Microbiology*, 60 (2–3), 251–260.
- Silva, C., 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, C. F., Vilela, D. M., de Souza Cordeiro, C., Duarte, W. F., Dias, D. R., & Schwan, R.F. (2013). Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 235–247.
- Silva, H. S. A., Tozzi, J. P. L., Terrasan, C. R. F., & Bettioli, W. (2012). Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. *Biol Control*, 63, 62–67.
- Silva, C. (2014). Microbial activity during coffee fermentation. In *Cocoa and Coffee Fermentations*, 368-423. CRC Press Boca Raton, FL, USA.
- Silva, A., Melo, G. V., Carvalho, D. P., Sorto, R. D., Goés-Neto, A., Kato, R., & Soccol, C. R. (2021). Facility-specific “house” microbiome ensures the maintenance of functional microbial communities into coffee beans fermentation: implications for source tracking. *Environmental Microbiology Reports*, 13(4), 470–481.
- Singh, B. K., & Trivedi, P. (2017). Microbiome and the future for food and nutrient security. *Microbial Biotechnology*, 10(1), 50–53.
- Stewart, E. J. (2012). Growing unculturable bacteria. *Journal of Bacteriology*, 194, 4151–4160
- Stilo, F., Bicchi, C., Robbat, A., Reichenbach, S. E., & Cordero, C. (2021). Untargeted approaches in food-omics: The potential of comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 135, 116162.
- Streimikis, J., & Baležentis, T. (2020). Agricultural sustainability assessment framework integrating sustainable development goals and interlinked priorities of environmental, climate and agriculture policies. *Sustainable Development*, 1–11.
- Sunarharum, W. B., Williams, D. J., Smyth, H. E. (2014). Complexity of coffee flavor: a compositional and sensory perspective. *Food Res. Int.* 62, 315–325.
- Tahat, M., Alananbeh, K., Othman, Y., & Leskovar, D. (2020). Soil Health and Sustainable Agriculture. *Sustainability*, 12(12), 4859.

- Taniwaki, M. H., Iamanaka, B. T., & Fungaro, B. H. P. (2014). Toxigenic fungi and mycotoxins in coffee, 509–544. *In* Cocoa and coffee fermentations. *CRC Press*, Boca Raton, FL.
- Taş, N., de Jong, A. E., Li, Y., Trubl, G., Xue, Y., & Dove, N. C. (2021). Metagenomic tools in microbial ecology research. *Current Opinion in Biotechnology*, 67, 184–191.
- Timsina, J. (2018). Can organic sources of nutrients increase crop yields to meet global food demand? *Agronomy*, 8(10), 214.
- Tressi, R. (1989). Formation of flavor components in roasted coffee, in Thermal Generation of Aromas, 285–301, ACS, Washington, DC, USA.
- Vaast, P., Bertrand, B., Jacques, J., Guyot, Bernard., & Génard., M. (2006). Fruit thinning and shade improve vean characteristics and beverage queality of coffee (*Coffea arabica* L.) under optimal conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86, 197–204
- Vartoukian, S. R., Palmer, R. M., & Wade, W.G. (2010). Strategies for culture of ‘unculturable’ bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 309, 1–7.
- Vaughn, R.H., DeCamargo, R., Falanghe, H., Melloayres, G., Serzedello, A. (1958). Observations on the Microbiology of the Coffee Fermentation in Brazil. *Inst Food Technologists*, 12 (5), 57.
- Vaughan, M. J., Mitchell, T., & McSpadden Gardener, B. B. (2015). What’s Inside That Seed We Brew? A New Approach to Mining the Coffee Microbiome. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(19), 6518–6527.
- Veloso, T. G. R., da Silva, M. C. S., Cardoso, W. S., Guarçoni, R. C., Kasuya, M. C. M., & Pereira, L. L. (2020). The effects of environmental factors on microbiota of fruits and soil of *Coffea arabica* in Brazil. *Scientific reports*, 10(1), 14692.
- Vilela, D.M., Pereira, G.V.d.M., Silva, C.F., Batista, L.R., Schwan, R.F. (2010). Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). *Food Microbiology*. 27 (8), 1128–1135.

- Vinícius de Melo Pereira, G., Soccol, V. T., Brar, S. K., Neto, E., & Soccol, C. R. (2015). Microbial ecology and starter culture technology in coffee processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(13), 2775–2788.
- Waller, J. M., & Masaba, D. M. (2006). The microflora of coffee surfaces and relationships to coffee berry disease. *Int J Pest Manage*, 52, 89–96.
- Wang, X., Ren, H., Wang, P., Yang, R., Luo, L., & Cheng, F. (2018). A preliminary study on target 11.4 for UN sustainable development goals. *Int. J. Geohelit, Parks*, 6 (2). 18-24.
- Wang, C., Sun, J., Lassabliere, B., Yu, B., Zhao, F., Zhao, F., Zhao, F., Chen, Y., & Liu, S. Q. (2018). Potential of lactic acid bacteria to modulate coffee volatiles and effect of glucose supplementation: fermentation of green coffee beans and impact of coffee roasting. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Wang, C.; Sun, J.; Lassabliere, B.; Yu, B.; Liu, S.Q. (2020) Coffee flavour modification through controlled fermentations of green coffee beans by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kluyveri*: Part I. Effects from individual yeasts. *Food Res. Int*, 136, 109588.
- Wilhelm, R., Pepe-Ranney, C., Weisenhorn, P., Lipton, M., & Buckley, D. (2021). Competitive Exclusion and Metabolic Dependency among Microorganisms Structure the Cellulose Economy of an Agricultural Soil. *Microbial Ecology*, 12(1).
- Woiciechowski, A. L., & Soccol, C. R. (2015). Conducting starter culture-controlled fermentations of coffee beans during on-farm wet processing: Growth, metabolic analyses and sensorial effects. *Food Research International*, 75, 348-356.
- Yang, N., Liu, C., Liu, X., Degn, T. K., Munchow, M. & Fisk, I. (2016). Determination of volatile marker compounds of common coffee roast defects. *Food Chemistry*, 211, 206–214.
- Yeretzian, C., Jordan, A., Badoud, R., & Lindinger, W. (2002). From the green bean to the cup of the coffee: Investigating coffee roasting by on-line monitoring of volatiles. *European Food Research and Technology*, 214, 92–104.

- Zapala, M. A., & Schork, N. J. (2006). Multivariate regression analysis of distance matrices for testing associations between gene expression patterns and related variables. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(51), 19430–19435.
- Zhang, J., Liu, X., & Liu, S. (2009). *Adhaeribacter terreus* sp. nov., isolated from forest soil. *Int J Syst Evol Microbiol*, *59*, 1595–1598.
- Zhang, J.S., De Bruyn, F., Pothakos, V., Torres, J., Moccand, C., Weckx, S., Falconi, C., & De Vuyst, L. (2019). Following coffee production from cherries to cup: microbiological and metagenomic analysis of wet processing of *Coffea arabica*. *Applied Environmental Microbiology*, *85*, e02635–18.
- Zhang, J.S., De Bruyn, F., Pothakos, V., Contreras, G., Cai, Z., Moccand, C., Weckx, S., & De Vuyst, L. (2019). Influence on Various Processing Parameters on the Microbial Community Dynamics, Metabolomic Profiles, and Cup Quality During Wet Coffee Processing. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 2621.
- Zhao, S., Guo, Y., Sheng, Q., & Shyr, Y. (2014). Heatmap3: an improved heatmap package with more powerful and convenient features. *BMC Bioinformatics*, *15*(Suppl 10), P16.

ANEXOS

Anexo 01: Compuestos volátiles detectados por SPME-GC-MS.

Grupo Químico	Compuestos	Abundancia Relativa (%)							
		Fermentación Larga						Fermentación Corta	
		6H	12H	18H	22H	27H	32H	5H	9H
Acidos	n-Decanoic acid	0.48	0.69	0.34	0.28	0.10	0.11	0.28	0.73
	Dodecanoic acid	0.29	0.31	0.19	0.04	0.03	0.00	0.08	0.15
	Nonanoic acid	0.22	0.38	0.00	0.09	0.05	0.04	0.00	0.00
Alcoholes	Phenylethyl Alcohol	4.29	6.40	3.26	8.43	5.42	13.10	11.32	5.63
	3-Octanol	0.68	0.66	0.00	0.00	0.00	0.00	1.21	2.21
	1-Butanol, 2-methyl-	0.63	1.10	0.99	1.53	1.74	1.97	1.33	0.58
	1-Hexanol, 2-ethyl-	0.24	0.19	1.77	0.00	0.00	0.12	0.00	0.00
	2-Heptanol	10.24	9.87	9.86	2.15	1.22	1.53	7.45	9.77
	1-Hexanol	0.06	0.06	0.29	0.13	0.15	0.00	0.65	0.00
	3-Octen-2-ol, (Z)-	0.68	0.00	0.00	0.00	0.33	0.00	0.00	0.00
	2-Hexanol	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	3-Octen-2-ol, (E)-	0.00	1.64	0.00	0.00	0.28	0.21	0.00	0.00
	1-Butanol, 3-methyl-	0.00	0.84	1.55	3.84	4.52	5.38	3.04	0.00
	1-Butanol, 3-methyl-, acetate	9.70	7.60	7.49	19.43	19.81	6.01	0.67	1.82
	1-Pentanol, 4-methyl-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.11	0.00	0.00
	1-Octen-3-ol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.88	4.62
Aldehídos	Benzaldehyde	7.71	6.94	5.91	3.34	8.54	6.19	21.28	0.00
	Tridecanal	0.47	0.16	0.19	0.00	0.09	0.14	0.05	0.00
	Nonanal	1.09	1.13	1.04	0.00	1.06	0.33	0.00	0.00
	2-Octenal, (E)-	0.94	0.96	0.83	1.11	1.00	1.41	1.41	0.00
	Tetradecanal	0.43	0.32	0.24	0.00	0.14	0.45	0.08	0.00
	2-Hexenal	0.57	0.73	0.79	0.41	0.13	0.15	1.19	0.00
	Methional	0.62	0.78	0.61	0.84	0.99	0.55	6.84	0.74
	Hexanal	2.04	1.78	1.79	2.19	2.24	2.08	3.71	0.66
	Pentadecanal-	0.90	0.00	0.87	0.00	0.40	0.95	1.08	0.00
	2-Butenal, 3-methyl-	0.36	0.00	0.00	0.29	0.23	0.14	1.06	1.26
	2-Hexenal, (E)-	0.22	0.00	0.00	0.00	0.15	0.06	0.00	0.09
	2-Nonenal, (E)-	0.00	0.00	0.23	0.30	0.00	0.29	0.00	0.00
	Pentanal	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00
	4-Quinolincarboxaldehyde	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00
	2-Butenal, 2-methyl-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00
Octanal	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.22	0.00	
Alcanos	Tetradecane	5.79	4.76	3.22	6.46	11.33	7.45	3.30	3.69
	Undecane, 2,5-dimethyl-	0.54	0.34	0.39	0.79	0.47	0.05	0.64	3.48
	Tridecane	1.15	0.77	0.82	1.23	1.87	1.41	1.37	1.02
	Dodecane	1.05	0.86	0.79	0.59	0.71	0.40	2.36	2.97
	Decane	0.44	0.00	0.51	0.00	0.00	0.00	0.08	0.00
	Pentadecane	2.80	2.40	1.64	1.08	1.05	1.37	0.00	0.37
	Hexadecane	0.23	0.14	0.14	0.15	0.27	0.23	0.07	0.00
	Nonane, 2,6-dimethyl-	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.37
	Undecane, 3,8-dimethyl-	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.20
	Dodecane, 4,6-dimethyl-	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.18	0.55	1.23
	Tridecane, 2-methyl-	0.00	0.00	0.00	0.18	0.12	0.00	0.31	0.58
	Dodecane, 2,6,11-trimethyl-	0.00	0.00	0.00	0.35	0.00	0.00	0.00	0.00
	Undecane, 4,7-dimethyl-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.42
Hidrocarburos Aromáticos	Toluene	0.92	0.91	0.94	0.46	0.58	1.02	0.09	2.50
	Styrene	9.64	5.99	5.60	1.69	2.07	2.95	3.09	5.47
Bencenos	Ethylbenzene	1.14	0.56	0.28	0.13	0.09	0.12	0.28	0.57
	Benzene, propyl-	0.76	0.40	0.39	0.04	0.00	0.00	0.19	0.32
	Benzene, 1,4-dimethoxy-	0.55	0.74	0.56	0.29	0.27	0.23	0.00	0.00
	Benzene, 1,4-diethyl-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.13	0.00	0.00
	Benzene, 1,3-diethyl-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00
Ésteres	Benzoic acid, 2-hydroxy-, ethyl ester	0.07	0.11	0.11	0.04	0.02	0.02	0.01	0.10
	Acetic acid, 2-ethylhexyl ester	0.32	0.00	0.36	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Acetic acid, 2-phenylethyl ester	2.23	5.34	4.43	5.14	0.00	0.00	0.00	0.00
	Benzeneacetic acid, ethyl ester	3.66	3.27	7.71	4.68	8.05	8.55	0.00	2.45
	Acetic acid, hexyl ester	0.15	0.36	0.35	1.48	1.37	2.11	0.00	0.00
	Acetic acid, butyl ester	0.12	0.05	0.24	0.03	0.05	0.22	0.00	0.00
	Butanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester	0.15	0.17	0.39	0.10	0.10	0.17	0.12	0.21
	Hexanoic acid, methyl ester	0.08	0.04	0.10	0.00	0.00	0.00	0.23	0.41
	Propanoic acid, butyl ester	1.20	1.28	1.78	0.00	0.01	0.03	0.00	1.86
	Butanoic acid, 3-methyl-, ethyl ester	1.80	1.83	3.66	2.79	3.13	3.87	0.78	2.81
	Benzeneacetic acid, methyl ester	0.00	0.21	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.37
	Acetic acid, octyl ester	0.00	0.77	0.63	2.90	2.43	3.90	0.00	0.00
	Butanoic acid, butyl ester	0.00	0.00	0.36	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Hexanoic acid, ethyl ester	0.00	0.00	0.64	1.34	1.44	1.80	0.00	0.00
	Octanoic acid, ethyl ester	0.00	0.00	0.05	0.90	1.57	3.51	0.00	0.00
	Benzoic acid, ethyl ester	0.00	0.00	0.00	0.04	0.17	0.73	0.00	0.00
	Isobutyl acetate	0.86	0.37	0.20	0.61	0.48	0.44	0.00	0.13
	Dodecanoic acid, ethyl ester	0.00	0.00	0.00	0.14	0.26	0.86	0.00	0.00
	Tetradecanoic acid, ethyl ester	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.14	0.00	0.00
	Decanoic acid, ethyl ester	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.35	0.00	0.00
	Acetic acid, nonyl ester	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.32	0.00	0.00
	Pentanoic acid, 3-methyl-, ethyl ester	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00
	Acetic acid, heptyl ester	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.31	0.00	0.00
Butanoic acid, ethyl ester	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	

Éteres	n-Butyl ether	0.60	1.03	0.00	0.02	0.00	0.07	0.00	0.81
Furanos	Furan, 2,3-dihydro-4-methyl-	0.29	0.70	0.89	0.00	0.11	0.07	0.00	0.00
	Furan, 2-pentyl-	0.99	1.47	1.91	0.96	0.70	1.05	0.00	0.59
Cetonas	3-Pentanone	0.78	0.63	0.00	0.08	0.00	0.00	0.08	1.24
	2-Pentanone	0.33	0.00	0.31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.12
	3-Octanone	0.35	0.37	0.28	0.00	0.00	0.00	0.68	0.82
	5-Hepten-2-one, 6-methyl-	0.65	0.63	0.54	0.16	0.12	0.19	0.70	1.00
	2-Heptanone	1.62	1.50	1.66	0.18	0.05	0.09	1.27	1.85
	Acetophenone	0.77	0.57	0.41	0.00	0.00	0.51	0.00	0.00
	Acetoin	0.75	1.16	2.70	0.89	0.98	1.56	0.03	2.61
	2-Nonanone	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2-Acetoxy-3-butanone	0.00	0.00	2.51	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2-Octanone	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00
Pirazinas	Pyrazine, 2-methoxy-3-(2-methylpropyl)-	1.63	2.21	1.76	0.55	0.68	0.62	2.67	5.57
	Pyrazine, 2-methoxy-3-(1-methylpropyl)-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09
Terpenos	o-Cymene	2.21	0.87	0.99	0.13	0.00	0.06	0.36	0.83
	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (Z)-	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	3-Carene	0.07	0.07	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	gamma-Terpinene	0.62	0.00	0.08	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00
	p-Cymene	0.00	0.27	0.36	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Azulene, 1,2,3,3a,4,5,6,7-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1R-(1.alpha.,3a.beta.,4.alpha.,7.beta.)]-.beta.-Guaiane	0.00	0.00	0.25	0.00	0.00	0.26	0.00	0.00
	Valerena-4,7(11)-diene	0.00	0.00	0.00	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00
	Benzene, 1-methyl-3-(1-methylethyl)-, (S)-	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Methyl salicylate	0.96	0.66	1.14	0.00	0.00	0.19	1.07	1.44
	Naphthalene, 1,2,4a,5,8,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,4a.beta.,8a.alpha.)-(+/-)-	0.34	0.08	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10
Otros	Benzene, (1-methylethyl)-	0.27	0.12	0.14	0.00	0.00	0.00	0.08	0.13
	Benzene, 1,3-dimethyl-	1.27	1.00	1.23	0.20	0.17	0.25	0.33	0.84
	Benzene, 1-methoxy-3-methyl-	0.79	0.55	0.63	0.22	0.20	0.36	0.42	0.40
	Benzene, 1,3-dichloro-	0.19	0.06	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Undecane, 2-methyl-	0.28	0.25	0.28	0.30	0.16	0.00	0.91	1.40
	Anisole	0.73	0.08	0.06	0.00	0.05	0.00	0.17	0.25
	cis-2-(2-Pentenyl)furan	0.20	0.13	0.17	0.09	0.00	0.00	0.11	0.34
	Benzene, 1,2-dimethoxy-	0.76	0.76	0.58	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	1-Butanol, 2-methyl-, acetate	0.96	1.00	1.08	10.02	3.51	0.00	0.00	0.25
	2-Pentanol, acetate	0.10	0.04	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2,4-Dimethyldodecane	0.41	0.00	0.11	1.09	0.62	0.00	2.49	1.96
	Benzene, 1,2,4-trimethyl-	0.47	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Cyclohexane, pentyl-	0.21	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Heptane, 2,2,4,6,6-pentamethyl-	0.36	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2,6,10-Trimethyltridecane	0.04	0.00	0.00	0.40	0.93	0.54	0.44	0.55
	Benzene, 1,4-dichloro-	0.13	0.16	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Benzene, 1,2,3-trimethyl-	0.48	0.00	0.62	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	trans-4a-Methyl-decahydronaphthalene	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2-Ethyl-oxetane	0.00	7.70	3.06	0.58	1.54	2.67	6.28	7.31
	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-	0.00	0.04	0.03	0.00	0.00	0.00	0.01	0.03
	Nonane, 4,5-dimethyl-	0.00	0.48	0.00	0.20	0.19	0.00	0.28	0.00
	Undecane, 2,6-dimethyl-	0.00	0.35	0.11	0.00	0.07	0.17	0.00	1.64
	Undecane, 3-methyl-	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2-Butanol, 3-methyl-, acetate	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	5-Ethylcyclopent-1-enecarboxaldehyde	0.00	0.36	0.00	1.35	1.14	1.37	0.00	2.20
	3-Ethyl-4-methylpentan-1-ol	0.00	0.16	0.00	0.00	0.00	0.31	0.00	0.00
	Benzene, 1,2,4,5-tetramethyl-	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.03
	Nonane, 5-methyl-5-propyl-	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Undecane, 2,7-dimethyl-	0.00	0.04	0.04	0.15	0.09	0.00	0.59	0.94
	4-Heptanone, 3-methyl-	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Undecane, 2,8-dimethyl-	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	1-Isopropylcyclohex-1-ene	0.00	0.00	0.00	0.09	0.02	0.06	0.00	0.00
	Benzene, 1,3-dimethoxy-	0.00	0.00	0.00	0.14	0.09	0.12	0.15	0.34
	Ammonium acetate	0.00	0.00	0.00	3.40	0.97	0.00	0.00	0.00
	Undecane, 2,4-dimethyl-	0.00	0.00	0.00	0.17	0.11	0.00	0.60	0.98
	Nonane, 3-methyl-5-propyl-	0.00	0.00	0.00	0.15	0.00	0.00	0.35	0.20
	Dodecane, 6-methyl-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.17	0.00	0.41	0.23
	Nonane, 5-(2-methylpropyl)-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
	1H-Benzocycloheptene, 2,4a,5,6,7,8-hexahydro-3,5,5,9-tetramethyl-, (R)-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00
	Benzene, 1-ethyl-2,4-dimethyl-	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	1,4-Dioxane, 2,5-dimethyl-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00
	3,5-Octadien-2-one, (E,E)-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00
	Cyclohexanecarboxaldehyde	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.16	0.00	0.00
	2,4-Heptadienal, (E,E)-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.17	0.00	0.00
	Selina-3,7(11)-diene	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00
	1-Decanol, 2-methyl-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00
	Nonane, 2-methyl-5-propyl-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.73
	Dodecane, 4-methyl-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.58	0.86
	Ethane, 1,1-diethoxy-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00
	Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 3,6,6-trimethyl-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00
(1R,9R,E)-4,11,11-Trimethyl-8-methylenebicyclo[7.2.0]undec-4-ene	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.31	
Cyclohexene, 1-propyl-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	
Cyclohexene, 1-methyl-5-(1-methylethenyl)-, (R)-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.90	
5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-, (E)-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	