



**Solubles  
Instantáneos C.A.**  
DESDE 1960



# “EFECTO DE LAS ENZIMAS PECTOLÍTICAS EN LA REMOCIÓN DEL MUCÍLAGO Y LA CALIDAD SENSORIAL DEL CAFÉ ROBUSTA”

## Informe Técnico

*Luis Alberto Duicela Guambi, Mg. Sc.*

*DOCENTE DE LA ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ  
DOCTORANDO EN CIENCIAS AGRARIAS DE LA UNIVERSIDAD DE ZULIA*

*Rey Gastón Loor Solórzano, Ph. D.*

*COORDINADOR NACIONAL DEL PROGRAMA DE CAFÉ Y CACAO DEL INIAP*

*Elvis Alfonso Portillo Páez, Ph. D.*

*DOCENTE INVESTIGADOR EN CAFÉ Y CACAO DE LA UNIVERSIDAD DE ZULIA*

*Willian Paul Chilán Villafuerte, Mg. Sc.*

*INVESTIGADOR RESPONSABLE DEL PROYECTO CAFÉ DE SOLUBLES INSTANTANEOS C.A.*

**Calceta, febrero 11 del 2019**

## CONTENIDO

	Página
1 INTRODUCCIÓN	2
2 MATERIALES Y MÉTODOS	4
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
4 CONCLUSIONES	15
5 BIBLIOGRAFÍA	16
6 ANEXOS	18

## 1. INTRODUCCION

El café es el término usado para identificar a cualquiera de las 104 especies del género *Coffea* (Missouri Botanical Garden, 2010), todas originarias del continente africano y de Madagascar, de naturaleza cromosómica diploide y alógamas, excepto *Coffea arabica* que es una especie tetraploide y autógama (Charrier & Berthaud, 1985, p. 36-39). El café robusta (*Coffea canephora*) fue descubierto a fines del siglo XIX, entre Guinea y Uganda (van der Vossen, 1985, p. 53) y se distinguen tres grupos: Congolensis (originario del Congo), Guineensis (originarios de Guinea) y Conilón (originario del Congo, a orillas del río Kouilou) (van der Vossen, 1985, p. 55). Los cafés robustos se encuentran distribuidos en muchas zonas tropicales húmedas del mundo, en África, América y Asia; así como, en algunas zonas tropicales secas de Brasil y Ecuador, donde se suple los requerimientos hídricos con irrigación.

En América solo se cultivan los grupos de *C. canephora*: Congolensis y Conilón, el primero introducido en 1951 desde Costa Rica, a través del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), y el segundo desde Brasil en 1986 y 2010. El café robusta se cultiva en las zonas tropicales y subtropicales de la costa, hasta los 700 msnm, en las provincias Guayas, Santa Elena, Los Ríos, Cotopaxi, Bolívar, Manabí, Santo Domingo y Esmeraldas; así como en la Amazonía Norte, principalmente en las provincias de Napo, Orellana y Sucumbíos, hasta una altitud de 900 msnm (Duicela *et al.* 2005, p. 34).

Los cafés robustas se comercializan, a nivel global y en Ecuador, como cafés naturales, esto significa que para obtener el café en grano o “café verde” (en inglés: green coffee), se beneficia (proceso poscosecha hasta obtener el café en grano) con el método por vía seca. El beneficio por vía seca comprende: (a) la recolección de frutos maduros, (b) la deshidratación del café cereza con todas sus envolturas, mediante secado natural o artificial, hasta alcanzar del 10 al 13% de humedad del grano; y, (c) pilada del café “bola seca” usando un equipo descascarador o piladora. El resultado de este proceso es el café natural. A nivel de los países productores de café robusta de América, como Brasil, Ecuador y México, como una respuesta a la mayor demanda de cafés finos se promueve incrementar la oferta de cafés robustas lavados. Para preparar cafés lavados se requiere de la aplicación de métodos de beneficio como: beneficio húmedo convencional, beneficio ecológico o subhúmedo y beneficio húmedo enzimático.

El beneficio por vía húmeda requiere del siguiente procedimiento: cosechar los frutos maduros, realizar el boyado (separación por densidad de los frutos vanos y secos en recipientes con agua), despulpar en un equipo mecánico (despulpadora); dejar en fermentación el café despulpado, en condiciones apropiadas, hasta un punto en que pueda removerse el mucílago adherido al pergamino mediante el lavado. El café pergamino húmedo se seca en forma natural (en tendales, entablillados, camas africanas o marquesina) o artificial (secadores eléctricos, a gas o leña). El café pergamino seco se trilla en un equipo especializado (trilladora) y como resultado del proceso se obtiene el café lavado. Una etapa crítica del proceso de beneficio húmedo es la fermentación del café despulpado, que demora entre 20 y 27 horas, por tanto existe el riesgo de sobre-fermentación o sub-fermentación, que tienen efectos directos sobre la calidad física del grano y organoléptica de la bebida.

El beneficio ecológico o subhúmedo requiere de un equipo integrado por despulpador y desmucilagador mecánico, que por su alto costo no está siendo usado en las localidades productoras de café robusta.

Una alternativa para la preparación de cafés lavados es el beneficio húmedo usando un producto enzimático que acelere el proceso de fermentación del café despulpado. Se constatan varios antecedentes investigativos sobre el uso de productos enzimáticos para la preparación de cafés lavados, arábigos y robustas: En Colombia se probó Rohapect TPL (Peñuela *et. al.*, 2010. p.

241) y Zymucil (IPF, 2011). En Brasil se informa de ensayos con “Novozym 33095” (Matiello *et al.* 2014, p.1). En el Ecuador se ha probado el producto Granozyme 100-Café (Duicela, 2017, p.227).

El mucílago del café es una sustancia gelatinosa que se encuentra adherida al pergamino y para eliminarlo es necesario: a) friccionar usando un desmucilagador mecánico, b) esperar un tiempo para que ocurra la fermentación natural del café despulpado y poder retirarlo mediante el lavado (Peñuela, Pabón y Oliveros, 2011, p.2); o c) aplicar un producto enzimático que reduzca el tiempo de fermentación del café “en baba”. El mucílago del café está compuesto por agua, azúcares, polisacáridos, proteínas, lípidos, minerales y ácidos. Los polisacáridos contienen sustancias pécticas y hemicelulosas (Puerta, 2009, p. 292).

En condiciones naturales, las reacciones de fermentación tienden a ser lentas, pero cuando se adicionan enzimas a un proceso, estas reacciones se activan, haciéndolas más rápidas por la función catalizadora de esta sustancia (Peñuela, Pabón y Oliveros, 2011, p.1). Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadoras (aceleradoras) o reguladoras de las reacciones y procesos químicos, por lo que resultan esenciales para el metabolismo de todo ser vivo y se caracterizan por ser específicas, es decir, existe una enzima para cada reacción, debido a que actúan sobre sustancias llamadas sustratos (Peñuela, Pabón y Oliveros, 2011, p.1).

Los productos enzimáticos Rohapect TPL, Zymucil, Novozym y Granozyme son derivados del microorganismo *Aspergillus niger* (AB Enzymes, 2018; Granotec, 2017; IPF, 2011; Matiello *et al.*, 2014 y Peñuela *et al.*, 2010). En el presente estudio, se probó el producto enzimático Granozyme 100 Café, en dosis de 1, 2 y 3 mL/10 kilos de café cereza, que equivale a 100, 200 y 300 mL por tonelada de café cereza. El producto enzimático es una formulación líquida, de color café con olor aromático, preparado a base de enzimas pectolíticas derivadas del hongo *Aspergillus niger*. La actividad mínima es de 100 PTF mg<sup>-1</sup> (Un PTF mg<sup>-1</sup> corresponde a la actividad enzimática que determina el incremento de la extinción de 0,01 g de enzima en un minuto a pH 5,8 con 35°C de temperatura y 235 nm, en una solución de pectina al 0,5%). El producto cumple los requisitos de: FAO / OMS, JECFA y Food Chemical Codex (FCC) para enzimas de grado alimenticio. El recuento total está dentro del límite superior de 5 x 10<sup>4</sup> g<sup>-1</sup>. El peso específico ≈ 1,17 g mL<sup>-1</sup>. Este producto es una preparación especial que contiene la enzima pectina-transeliminasa (Granotec, 2017).

Cabe destacar que en el Ecuador, con el aval de la Asociación de Cafés Especiales de América (SCAA: siglas en inglés), se promueve la producción y consumo de cafés finos. En este contexto, desde hace tres años, se desarrolla el concurso “Taza Dorada-Robusta” y se evidencia una oportunidad para los cafetaleros ecuatorianos de tener acceso a mercados diferenciados donde los cafés finos son mejor cotizados. Estos antecedentes motivaron a realizar un experimento en café robusta con el propósito de “valorar el efecto de un producto enzimático pectinolítico en la reducción del tiempo de fermentación del mucílago y en la calidad organoléptica del café robusta”.

Los objetivos específicos del estudio fueron:

OE1. Determinar el efecto de tres dosis del producto enzimático sobre la reducción del tiempo de fermentación del mucílago, en café despulpado.

OE2. Comparar los atributos organolépticos de los cafés robustas lavados y naturales, de tres localidades cafetaleras.

La hipótesis de investigación propuesta fue: “El uso de enzimas pectolíticas en la remoción rápida del mucílago del café despulpado no tiene ningún efecto detrimental en la calidad sensorial del café robusta”.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

**Localidades.-** Se tomaron muestras de cafetales robustas del grupo congolensis, en tres provincias productoras de café robusta:

L1. Provincia Guayas. Cantón Isidro Ayora. Hacienda Denisse.

L2. Provincia Santa Elena. Proyecto café robusta “SICA”.

L3. Provincia Orellana. Organización de Productores de Café “ASOSUMACO”.

**Factor en estudio y tratamientos.-** El factor es estudio constituye las “Alternativas de beneficio de café robusta” que lo conforman los cuatro tratamientos para preparar cafés lavados y un tratamiento cinco relacionado con la preparación de café natural (Tabla 1).

En base de los antecedentes investigativos se definió como factor de estudio: los métodos de beneficio para la preparación de cafés lavados y de café natural, con los niveles especificados en la descripción de los tratamientos (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos para la preparación de cafés lavados y café natural.

Tratamientos	Código	Descripción	Tipo de café
1	E1	Beneficio húmedo enzimático usando dosis 1 mL por cada 10 kilos de café cereza (equivale a 100 mL t <sup>-1</sup> de café cereza).	Café lavado
2	E2	Beneficio húmedo enzimático usando dosis 2 mL por cada 10 kilos de café cereza (equivale a 200 mL t <sup>-1</sup> de café cereza).	Café lavado
3	E3	Beneficio húmedo enzimático usando dosis 3 mL por cada 10 kilos de café cereza (equivale a 300 mL t <sup>-1</sup> de café cereza).	Café lavado
4	HC	Beneficio por la vía húmeda de café cereza maduro (Sin la adición de producto enzimático).	Café lavado
5	VS	Beneficio por la vía seca.	Café natural

### ***Procedimiento para la determinación del efecto del producto enzimático Granozime 100 Café en la reducción del tiempo de fermentación del café despulpado.***

Los tratamientos que involucran el uso de enzimas pectolíticas (E1, E2 y E3) y el de la preparación de café lavado mediante el beneficio húmedo convencional (HC), se orientaron a la determinación del “Efecto del producto enzimático en la reducción del tiempo de fermentación del café despulpado”. Estos tratamientos se replicaron en tres localidades cafetaleras (L=3), por tanto, se evaluaron 12 unidades experimentales.

En el café despulpado se encuentran primordialmente levaduras y bacterias lácticas, pero también otras bacterias y algunos hongos (Puerta, 2013, p.3). La fermentación del mucílago de café ocurre por acción de levaduras y bacterias que mediante sus enzimas naturales, oxidan parcialmente los azúcares y producen energía, etanol, ácido láctico, ácido acético y dióxido de carbono, además de alcoholes como propanol y butanol; de ácidos succínico, fórmico y butírico; de sustancias olorosas como aldehídos, cetonas y ésteres; también degradan los lípidos del mucílago y cambian el color, olor, densidad, acidez, sólidos solubles, temperatura y composición química y microbiana (Puerta, 2013, p. 1).

**Variable experimental O1.-** La variable de respuesta medida para lograr el objetivo 1 fue: “tiempo de fermentación”, que se registró en minutos después de la aplicación del producto

enzimático (E1, E2 y E3) y en el caso del beneficio húmedo convencional (HC), se tomó el tiempo transcurrido desde el momento de terminación del despulpado hasta la culminación de la fermentación.

**Análisis estadístico O1.-** Para la determinación del efecto de tres dosis del producto enzimático Granozyme 100 Café, sobre la reducción del tiempo de fermentación del mucílago, en café despulpado, se probaron tres dosis, que equivalen a 100, 200 y 300 mL t<sup>-1</sup>, contrastado con el tiempo de fermentación en un café lavado sin la adición del producto enzimático, es decir obtenido mediante el beneficio húmedo convencional.

Para verificar que los tiempos de fermentación del café despulpado usando enzimas fueron estadísticamente iguales se usó la prueba no paramétrica “Análisis de varianza por rangos de Friedman”, cuya fórmula de cálculo es la siguiente:

$$X_r^2 = \frac{12}{at(t+1)} \sum R^2 - 3 a (t+1)$$

Donde:

X<sub>r</sub><sup>2</sup>= Estadístico de Friedman

a = localidades

t = tratamientos

∑R<sup>2</sup>= Suma de los rangos de los tratamientos elevados al cuadrado

El estadístico de Friedman se contrasta con el estadístico Ji-cuadrado (X<sup>2</sup>) con grados de libertad GL= t-1 y nivel de significación α=0,05.

Las hipótesis estadísticas que se probaron fueron:

H<sub>0</sub>= No hay diferencia estadística entre tiempos de fermentación. E1=E2=E3

H<sub>1</sub>= Al menos un tratamiento con enzimas es estadísticamente diferente.

La regla de decisión fue la siguiente:

Si X<sub>r</sub><sup>2</sup> < X<sup>2</sup><sub>crítico</sub>: Se acepta H<sub>0</sub>

Si X<sub>r</sub><sup>2</sup> ≥ X<sup>2</sup><sub>crítico</sub>: Se acepta H<sub>1</sub>

***Procedimiento para la comparación de los atributos organolépticos de los cafés robustas lavados y café natural, en función de los métodos de beneficio.***

Los cinco tratamientos (t=5), indicados en la Tabla 1, en tres repeticiones que corresponden a muestras secadas en zarandas con mallas plásticas individualizadas (r=3), en las tres localidades (L=3) y con la evaluación sensorial realizada por un panel de cuatro catadores (S=4), de conformidad al protocolo de la SCAA-R, se orientaron a la comparación de los atributos organolépticos de los cafés robustas lavados y naturales (t=5).

**Unidad experimental.-** La unidad experimental se conformó de una muestra de 10 kg de café cereza para obtener aproximadamente dos kilos de café en grano.

**Preparación de las muestras.-** Para la preparación de las muestras de café, se procedió de la siguiente manera:

- Cosecha del café robusta en una finca selecta (café congolensis), donde se haya aplicado prácticas de manejo en forma adecuada.
- Boyado del café cosechado para separar por densidad los frutos vanos, sobremaduros y secos, usando para tal propósito recipientes con agua.
- El café cereza maduro, luego del boyado, fue pesado en una báscula, separando cinco muestras de 10 kg por tratamiento.

- La muestra de café cereza (10 kg) para el beneficio por vía seca (VS), se colocó inmediatamente en una zaranda para su secado al sol, debajo de una marquesina (secador solar).
- Las otras cuatro muestras de 10 kg fueron despulpadas en una despulpadora calibrada según el tamaño de los frutos. Cada muestra de 10 kg de café cereza equivale a 6 kg de café despulpado o café “en baba”.
- Las muestras de café despulpado fueron colocadas en recipientes de plástico, aplicándose acciones diferenciadas, según los tratamientos. En el recipiente con la muestra de café despulpado que no involucraba la adición de enzimas (HC), se tomó el tiempo de inicio de la fermentación natural o sin enzimas, sin añadir agua, hasta alcanzar el punto de fermentación óptima que ocurrió a las 20 horas. Concluida la fermentación se procedió a lavar el café fermentado, con agua limpia, en tres enjuagues. El café pergamino húmedo se colocó en una zaranda metálica, individualizada para cada muestra, debajo de un secador solar (marquesina) hasta alcanzar del 10 al 13% de humedad del grano.
- En las muestras de café despulpado que involucraron la adición del producto enzimático (E1, E2 y E3), se procedió de la siguiente manera:
  - En una botella de plástico de 500 mL, se colocó agua limpia, aproximadamente el 50% del volumen e inmediatamente se añadió el producto enzimático, con una jeringuilla, en la dosis especificada por tratamiento: 1 mL, 2 mL y 3 mL.
  - La botella conteniendo el agua y el producto enzimático se agitó intensamente y luego se añadió directamente sobre la masa de café despulpado.
  - La masa de café despulpado luego de la adición del producto enzimático, se removió intensamente por varios minutos para asegurar su completa dispersión. Esta acción se realizó de manera continua con intervalos de reposo.
  - Por valoración visual y mediante la prueba del tacto, basada en la sensación en las manos al restregar el grano como si fuese cascajo, que se siente cuando se ha desprendido el mucílago del pergamino, se determina el punto óptimo de fermentación y concluye el proceso.
  - El café fermentado en su punto óptimo se procede a lavarlo con abundante agua limpia.
  - La muestra del café pergamino húmedo se procede a separar en tres zarandas individuales (tres repeticiones) para su secado debajo de una marquesina.
- Los cafés en estado de pergamino seco, con el 10-13% de humedad del grano, correspondientes a los tratamientos HC, E1, E2 y E3, se colocan en fundas de polipropileno para conservarlo hasta realizar los análisis pertinentes. De la misma manera se procedió con el café “bola seca” que resulta de la deshidratación del café cereza con todas sus envolturas para preparar el café natural (VS).

**Variables experimentales O2.-** Las 10 características organolépticas fueron valoradas en una escala de 1 a 10, por el panel de cuatro catadores, de conformidad con los protocolos de la Asociación de Cafés Especiales de América (SCAA-R). Los atributos sensoriales evaluados fueron: Fragancia/aroma, sabor, sabor residual, equilibrio sal: acidez, equilibrio amargo: dulce, cuerpo, uniformidad de la taza, balance, limpieza o taza limpia y puntaje de catador. La calificación sensorial corresponde a la suma de los puntajes parciales y se valora sobre 100 puntos.

Fragancia/Aroma.- La fragancia se evalúa sobre base seca (tostado-molido) y el aroma sobre base húmeda (con adición de agua hirviendo).

Sabor.- Es la impresión combinada de todas las sensaciones gustativas y aromas retronasales que van de la boca a la nariz (notas a frutas, nueces, especias y dulces).

Sabor residual.- Se define como las cualidades positivas del sabor que emanan de la parte posterior de la lengua y permanecen después de que el café es escupido.

Equilibrio Sal/acidez.- Es un atributo originado por la mezcla de sabores. La acidez resulta de la apreciación de los ácidos orgánicos.

Equilibrio amargo/dulce.- Esta relación es un atributo determinante del sabor. El amargo surge principalmente de los niveles de potasio y cafeína. El dulce se deriva del ácido clorogénico y de los niveles de azúcares.

Cuerpo.- Es la sensación en la boca, por la estimulación de los vapores, al momento de absorber, quedando una sensación táctil en la boca que se valora en distinto grado.

Uniformidad de la taza.- Se refiere al gusto constante en las distintas tazas. La variación entre tazas de una misma muestra indica que no hay uniformidad.

Equilibrio de la taza.- Indica que el conjunto de atributos de la taza debe tener suficiente complejidad sin que una característica abrume u opaque a las demás.

Limpieza.- También llamada limpidez se refiere a la transparencia de la taza, a la ausencia de impresiones negativas que interfieren desde la primera ingestión hasta el regusto.

Puntaje del catador.- El catador realiza una valoración global de la calidad de la taza, según su criterio que es considerado como una variable.

La evaluación sensorial corresponde a la suma de los puntajes parciales, por tanto cada muestra tiene una calificación sobre 100 puntos, de conformidad con la norma de la Asociación de Cafés Especiales de América (SCAA-R). Los puntajes asignados por los cuatro catadores, a cada uno de los atributos, en tres repeticiones y cinco tazas/muestra, proporcionan los puntajes de evaluación sensorial. Si hay sabores extraños, contaminaciones o gustos negativos, a la suma total se restan dos puntos por cada taza con defectos secundarios y cuatro puntos por cada taza con defectos capitales (Duicela, 2017, p. 2379).

**Panel de catación.-** El panel estuvo conformado por cuatro catadores: Henry Benalcazar (Catador líder-CQI), Diana Farfán, Sofía Velázquez y Fanny Zambrano (investigadoras acreditadas en SENESCYT). El panel de catadores, en la preparación de las muestras del grano (granulometría, densidad y defectos), tostión (color del tueste, calidad del agua, finura de la molienda) y procedimientos de evaluación sensorial, se basó en los protocolos de la SCAA-R.

**Análisis estadístico O2.-** El análisis estadístico involucró los aspectos descriptivos, análisis de varianza, comparaciones ortogonales, análisis de correlaciones momento producto de Pearson y análisis de conglomerados jerárquicos.

En la estadística descriptiva se enfatizó en el cálculo de los estadígrafos  $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$  (media  $\pm$  error típico) y los límites inferior y superior de la media poblacional  $\mu$  con el 95% de confianza, considerando como variable la calificación sensorial (evaluación sobre 100 puntos que resulta de la suma de los 10 atributos organolépticos calificados por el panel de catadores), en función de cada uno de los cinco tratamientos.

El análisis de varianza se realizó en base del diseño de bloques al azar (BA) de cinco tratamientos para la preparación de cafés lavados y café natural, con un arreglo factorial de tres localidades, tres repeticiones y cuatro catadores. En el análisis de varianza se integró las

comparaciones ortogonales a partir de la desagregación de la suma de cuadrados de los tratamientos, comparando las medias: E1 vs E2, E2 vs E3; E1, E2, E3 vs HC y HC vs VS.

Los análisis de correlaciones lineales bivariados “momento-producto de Pearson” se realizaron con los datos promedios de los 10 atributos organolépticos, con un nivel de significación  $\alpha=0,05$ . Con esta información se construyó una matriz de correlaciones lineales.

El análisis multivariado se refiere a los métodos estadísticos que analizan simultáneamente medidas múltiples de cada individuo u objeto sometido a investigación. En el presente estudio se usó el análisis de conglomerados jerárquicos (ACJ) o de Clúster (en inglés). El ACJ permite agrupar las variables en función de criterios de clasificación, basado en su similitud de distancias. Los criterios de agrupamiento que se enfatizó se refiere a los cinco métodos de beneficio: E1, E2, E3, HC y VS; mientras que los 10 atributos organolépticos corresponden a las variables: fragancia/aroma, gusto, regusto, equilibrio sal/acidez, equilibrio amargo/dulce, sensación en la boca, uniformidad de la taza, equilibrio de la taza, limpidez y puntaje del catador. No se consideró como variable la calificación sensorial sobre 100 puntos.

El método usado para la formación de los grupos fue el de Ward que se basa en el criterio de la varianza mínima dentro de la varianza total del clúster. En cada paso, un par de clúster con distancia mínima se mezcla y luego, en el siguiente paso, se busca incrementar un mínimo con respecto a la varianza total. La distancia Euclidiana es la medida que se adoptó para la estimar la similitud entre los grupos (métodos de beneficio).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la determinación del efecto del producto enzimático Granozyme 100 Café sobre la reducción del tiempo de fermentación del mucílago, en café despulpado, se probaron tres dosis, que equivalen a 100, 200 y 300 mL t<sup>-1</sup>, contrastando con el tiempo de fermentación en un café lavado sin la adición de enzimas. En el café despulpado se encuentran primordialmente levaduras y bacterias lácticas, así como otras bacterias y algunos hongos (Puerta, 2013, p.3) que se activan progresivamente en condiciones naturales pero que aceleran su multiplicación con la adición de enzimas.

En las tres localidades estudiadas: Guayas (L1), Santa Elena (L2) y Orellana (L3), el tiempo promedio de la fermentación del café despulpado, sin la adición del producto enzimático, fue 1200 ±29 minutos (20 horas), que usando el producto enzimático se redujo a solo 39-42 minutos, que equivale al 3,2-3,5% del tiempo de fermentación cuando se aplica el método de beneficio húmedo convencional (HC) (Tabla 2).

En Colombia recomiendan usar el Zynmucil en dosis de un mL por cada 10 kg de café despulpado, iniciándose el lavado a las tres horas (Peñuela, Pabón y Oliveros, 2011, p.8), que equivale a 180 minutos; en Brasil, usando Novozym 33095 se redujo el tiempo de fermentación a 150 minutos (Matiello *et al.* 2014, p.1). Esto significa que usando el producto enzimático Granozyme 100 Café se redujo significativamente el tiempo de fermentación del café despulpado, a una fracción del 3,2 al 3,5% respecto de la demora en la fermentación sin la adición del producto enzimático. El tiempo de fermentación del café robusta, logrado con la adición de Granozyme 100 Café, varía de 39±2 a 42±3 minutos, resultando menor que los tiempos reportados en Brasil (150 minutos) y Colombia (180 minutos), según informan Matiello *et al.* (2014, p.1) y Peñuela, Pabón y Oliveros (2011, p.8).

Tabla 2. Tiempos de fermentación del café despulpado en función de las dosis de producto enzimático.

Producto enzimático (mL /10 kg café cereza)	Tiempos de fermentación (en minutos)			Media ±Error típico (minutos)	Proporción de tiempo
	Guayas	Santa Elena	Orellana		
0	1200	1250	1150	1200 ±29	100%
1	42	37	46	42±3	3,5%
2	34	40	45	40±3	3,3%
3	36	38	42	39±2	3,2%

Las varianzas del tiempo de fermentación, para los tratamientos con adición del producto enzimático: E1, E2 y E3 fueron homocedásticas y estaban muy distantes de la varianza del tiempo de fermentación del tratamiento HC (heterocedástica).

Considerando que las localidades en estudio tienen distintas condiciones climáticas y edáficas, se usó la prueba no paramétrica “Análisis de varianza por rangos de Friedman” para comparar los efectos de las tres dosis del producto enzimático. Este análisis permitió establecer que los tiempos de fermentación del café despulpado con las tres dosis resultaron estadísticamente iguales.

El estadístico de Friedman calculado fue:

$$X_r^2 = \frac{12}{3(3)(4)} \sum 110 - 3(3)(4) = 0,67$$

El valor de Ji cuadrado ( $X^2$ ) con GL=t-1 y  $\alpha=0,05 = X^2_{crítico} = 5,99$

Como  $X^2_r < X^2_{crítico}$ : Se acepta  $H_0$ . Por lo tanto, no hay diferencia estadística significativa entre tiempos de fermentación en los tratamientos con la adición del producto enzimático:  $E1=E2=E3$ .

Para la determinación de los efectos de los métodos de beneficio HC, E1, E2, E3 y VS sobre los atributos organolépticos de los cafés robustas (OE2) se realizaron varios análisis: Estadística descriptiva, análisis de varianza y separación de medias, análisis de correlaciones lineales y análisis de clúster. Los promedios de calificación sensorial por cada tratamiento, el error típico y los límites inferior y superior de  $\mu$  con el 95% de confianza (Tabla 3), permiten establecer que los cafés lavados tienen una calificación promedio de 80,28 puntos mientras que los cafés naturales tienen un promedio de 76,44 puntos. Los cafés lavados, usando el producto enzimático en dosis de 3 mL/10 kg de café cereza (E3) tiene una media de  $80,66 \pm 0,34$  puntos y el café lavado mediante el beneficio húmedo convencional (HC) tiene una media de  $80,72 \pm 0,34$  puntos.

Los puntajes de evaluación sensorial  $\geq 80$ , en la escala SCAA-R, se valoran como cafés especiales. Los cafés lavados preparados con el método húmedo convencional (HC) y con la adición del producto enzimático (E1, E2 y E3) posibilitan obtener de cafés con puntajes promedios superiores a 80 puntos (Tabla 3).

Las 15 muestras (5 tratamientos x 3 localidades) con tres repeticiones y cuatro catadores permitieron tener  $n=180$  datos de calificaciones sensoriales, de los cuales 95 tazas, que equivale al 53%, tuvieron calificaciones sensoriales  $\geq 80$  puntos, por tanto se valoran como cafés especiales y 85 tazas (47%) tuvieron calificaciones sensoriales  $< 80$  puntos (cafés corrientes). Cabe destacar que una muestra de café está integrada por cinco tazas que son calificadas por cada catador, de conformidad con los protocolos de la SCAA-R.

Tabla 3. Promedios de evaluación sensorial, error típico y límites inferior y superior de  $\mu$  con el 95% de confianza, para los cafés robustas lavados y natural.

Tratamientos	Tipo de café	Evaluación sensorial Media $\pm$ error típico	Límite Inferior de $\mu$ (95% de confianza)	Límite Superior de $\mu$ (95% de confianza)	
1 mL/ 10 kg de café cereza	E1	Lavado	$79,81 \pm 0,55$	78,73	80,88
2 mL/ 10 kg de café cereza	E2	Lavado	$79,92 \pm 0,39$	79,16	80,69
3 mL/ 10 kg de café cereza	E3	Lavado	$80,66 \pm 0,34$	80,00	81,32
Húmedo convencional	HC	Lavado	$80,72 \pm 0,34$	80,05	81,40
Vía seca	VS	Natural	$76,44 \pm 0,59$	75,30	77,59

El análisis de varianza, en un diseño de bloques al azar, para los 180 datos que se originan en 3 localidades x 3 repeticiones x 5 tratamientos y 4 catadores (Tabla 4), permitió establecer que no hay diferencia estadística significativa entre catadores ( $p=0,86$ ), y si hubo diferencias estadísticas significativas para las fuentes de variación: localidades ( $p=0,0037$ ), repeticiones ( $p=0,0004$ ), tratamientos ( $p=0,00001$ ) e interacción localidad x tratamiento ( $p=0,00001$ ). El coeficiente de variación del experimento fue 2,95%.

Las comparaciones ortogonales permitieron definir el siguiente resultado para los tratamientos:  $HC=E3=E2=E1 > VS$ . Por tanto, la calidad sensorial de los cafés lavados usando enzimas, en dosis de 100, 200 y 300 mL  $t^{-1}$  de café cereza, resultaron estadísticamente iguales a los cafés lavados, beneficiados por la vía húmeda convencional. Los cafés lavados resultaron superiores en puntaje de evaluación sensorial comparados con los café naturales (beneficio por la vía seca).

Tabla 4. Análisis de varianza de la evaluación sensorial de los cafés robustas.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	F <sub>0,05</sub>	F <sub>0,01</sub>	p	Significación estadística
Localidad	2	64,01	32,01	5,81	3,05	4,74	0,00370	**
Repetición	2	89,25	44,63	8,10	3,05	4,74	0,00040	**
Tratamientos	4	448,11	112,03	20,34	2,43	3,44	0,00001	**
<i>E1 vs E2</i>	<i>(1)</i>	<i>0,22</i>	<i>0,22</i>	<i>0,04</i>	<i>3,90</i>	<i>6,80</i>	<i>(0,840)</i>	<i>(NS)</i>
<i>E2 vs E3</i>	<i>(1)</i>	<i>9,86</i>	<i>9,86</i>	<i>1,79</i>	<i>3,90</i>	<i>6,80</i>	<i>(0,180)</i>	<i>(NS)</i>
<i>E1,E2,E3 vs HC</i>	<i>(1)</i>	<i>9,40</i>	<i>9,40</i>	<i>1,71</i>	<i>3,90</i>	<i>6,80</i>	<i>(0,193)</i>	<i>(NS)</i>
<i>HC vs VS</i>	<i>(1)</i>	<i>329,73</i>	<i>329,73</i>	<i>59,84</i>	<i>3,90</i>	<i>6,80</i>	<i>0,00000001</i>	<i>(**)</i>
Catadores	3	4,12	1,37	0,25	2,66	3,91	0,8617	NS
Interacción localidad x tratamiento	8	256,54	32,07	5,82	2,00	2,62	0,00001	**
Error experimental	160	881,08	5,51					
Total	179	1743,1						

Nota: En cursiva se indican los resultados del análisis mediante comparaciones ortogonales.

La separación de medias de evaluación sensorial en relación a los cinco métodos de beneficio se realizó usando mediante la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ), demostrando con los rangos que se verifica:  $E1=E2=E3=HC > VS$  (Tabla 5),

Usando la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ), también se determinaron los rangos de significación estadística de los puntajes totales de evaluación sensorial para las localidades en estudio, siendo Orellana la que obtuvo mayor puntaje comparado con Guayas y Santa Elena, que fueron estadísticamente iguales (Tabla 6).

Tabla 5. Medias de evaluación sensorial, error estándar y rangos de Tukey en relación con los métodos de beneficio del café robusta.

Tratamientos: métodos de beneficio		Media $\pm$ Error estándar	n	Rangos de Tukey <sub>0,05</sub>
Beneficio húmedo enzimático 1 mL /10 kg de café cereza	E1	79,81 $\pm$ 0,39	36	A
Beneficio húmedo enzimático 2 mL /10 kg de café cereza	E2	79,82 $\pm$ 0,39	36	A
Beneficio húmedo enzimático 3 mL /10 kg de café cereza	E3	80,66 $\pm$ 0,39	36	A
Beneficio húmedo convencional	HC	80,72 $\pm$ 0,39	36	A
Beneficio por vía seca	VS	76,44 $\pm$ 0,39	36	B

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Tabla 6. Medias de evaluación sensorial, error estándar y rangos de Tukey en relación con las localidades de muestreo del café robusta.

Localidad	Media	Error estándar	n	Rangos de Tukey $_{0,05}$
Orellana	80,35	0,30	60	A
Santa Elena	79,17	0,30	60	B
Guayas	79,02	0,30	60	B

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Los análisis de correlaciones lineales entre los atributos organolépticos y la calificación sensorial se exponen en la Tabla 7. Se establece que hay asociación estadística entre la evaluación sensorial y ocho atributos valorados en la catación ( $p < 0,05$ ), excepto con la limpieza y uniformidad de la taza ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, estos dos atributos de la taza, limpieza y uniformidad, si se correlacionan positivamente ( $r = 0,901^*$ ). Esto significa que en la preparación de los cafés lavados y naturales, se debe mantener un riguroso procedimiento para obtener altas calificaciones sensoriales.

Tabla 7. Matriz de correlaciones lineales entre los atributos organolépticos y calificación sensorial de los cafés robustas.

Atributos de taza	Fragancia Aroma	Sabor	Sabor residual	Equilibrio sal: acidez	Equilibrio amargo: dulce	Cuerpo	Uniformidad	Balance	Limpidez	Puntaje de catador	Calificación sensorial
Fragancia Aroma	1										
Sabor	0,947*	1									
Sabor residual	0,941*	0,992**	1								
Equilibrio sal: acidez	0,976**	0,977**	0,977**	1							
Equilibrio amargo: dulce	0,956*	0,950*	0,966**	0,991**	1						
Cuerpo	0,910*	0,986**	0,996**	0,964**	0,956*	1					
Uniformidad	0,009	0,322	0,292	0,148	0,101	0,357	1				
Balance	0,922*	0,997**	0,991**	0,960**	0,933*	0,990**	0,386	1			
Limpidez	-0,136	0,126	0,054	-0,062	-0,150	0,099	0,901*	0,181	1		
Puntaje de catador	0,936*	0,997**	0,999**	0,974**	0,957*	0,996**	0,328	0,996**	0,101	1	
Calificación sensorial	0,925*	0,997**	0,993**	0,969**	0,946*	0,993**	0,372	0,999**	0,157	0,998**	1

\*. La correlación es significativa en el nivel de significación  $\alpha = 0,05$  (2 colas).

\*\* . La correlación es significativa en el nivel de significación  $\alpha = 0,01$  (2 colas).

El análisis de conglomerados jerárquicos (ACJ) permitió establecer que los cafés lavados preparados con los métodos: HC, E1, E2, E3 conforman un grupo símil, completamente diferenciado del café natural (VS). Este resultado es un indicativo de la coincidencia con los resultados del análisis de varianza ( $HC=E3=E2=E1>VS$ ).

El ACJ resulta ser una prueba muy sensible a la distancia Euclidiana que se conforma a partir de los datos de las variables originales, referidas a los 10 atributos sensoriales, pues, del dendrograma se deduce que HC y E3 dan similares calidades de taza (Figura 1).

Al considerar las localidades de muestreo como criterio de conglomeración y los 10 atributos organolépticos como variables, se determinó que el café de Orellana es superior en calidad de taza comparado con los cafés de Guayas y Santa Elena, que resultaron ser similares (Figura 2). Los resultados del ACJ que se aprecian en los dendrograma, sustentan los resultados del análisis de varianza (Tabla 4).

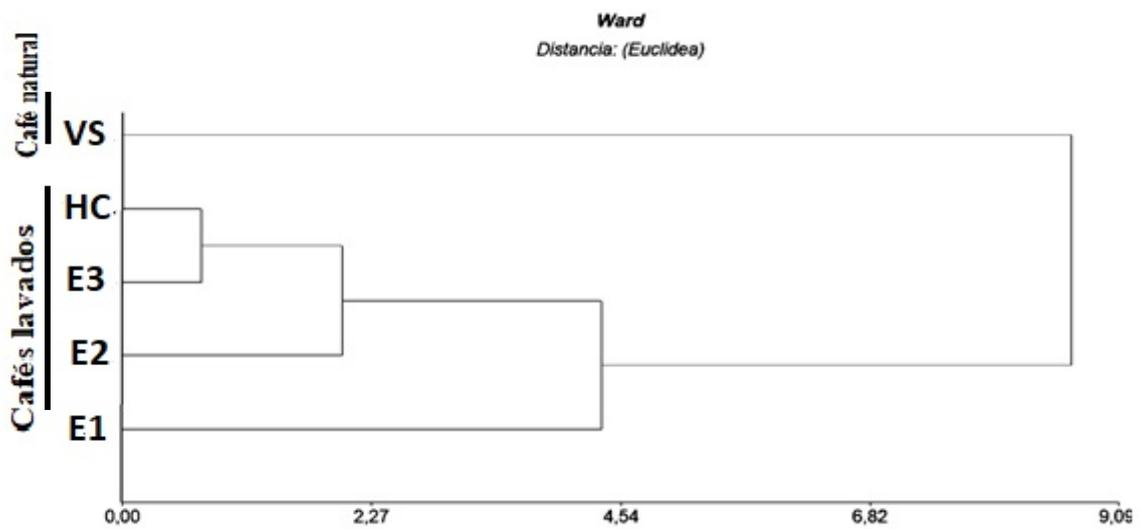


Figura 1. Similitudes en las calificaciones sensoriales de los cafés robustas en función de los métodos de beneficio.

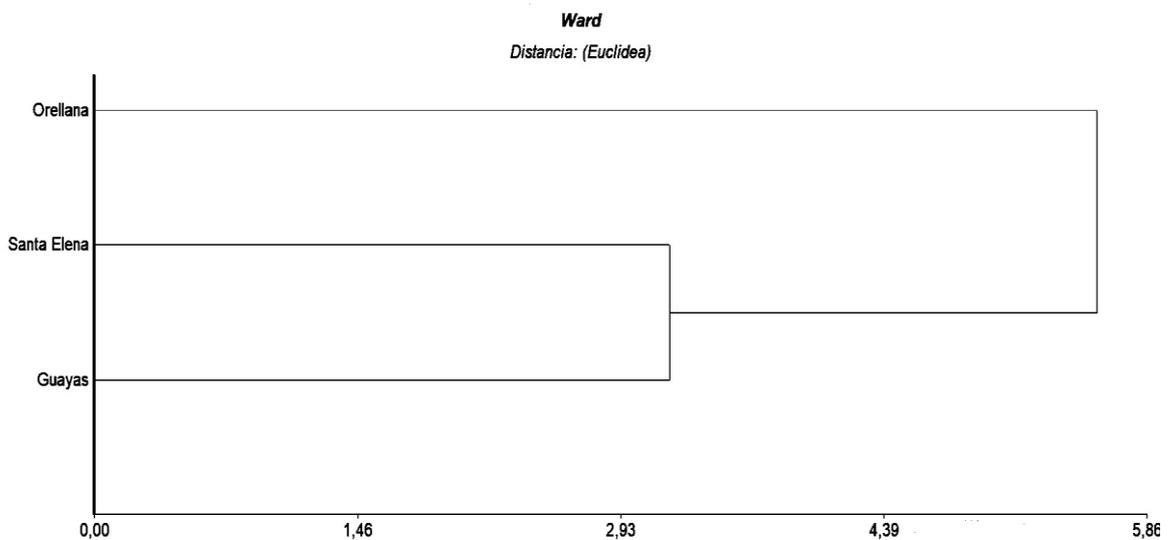


Figura 2. Agrupamiento de las localidades de muestreo por la similitud en la calificación sensorial de los cafés robustas.

Los procesos de fermentación del café despulpado, en condiciones naturales tienden a ser lentas, pero cuando se adicionan enzimas, estas reacciones se activan por la función catalizadora de la sustancia (Peñuela, Pabón y Oliveros, 2011, p.1), además, con el uso de enzimas se evita la pérdida de peso en la fermentación (Matiello *et al.* 2014, p.2).

La recolección selectiva de los frutos maduros o café cereza es esencial para obtener calidades superiores. La limpieza de los sacos, cestos o recipientes usados para la cosecha es uno de los aspectos a considerar en el proceso. Los frutos inmaduros dan a la bebida un gusto a crudo o hierba verde; los frutos cosechados en condiciones de sobre madurez causan alteraciones en el color del grano, con tendencia a una tonalidad marrón, así como una bebida con un gusto a fermento. Se debe considerar que los granos de café absorben fácilmente todos los olores y contaminaciones del ambiente (Duicela *et al.* 2005, p. 23).

Según Puerta (2010, p.87), los productos enzimáticos no tienen efecto en la calidad de la bebida. Matiello *et al.* (2014, p.2) informan que, en Brasil, no encontraron diferencias estadísticamente significativas en calidad de taza, al usar enzimas, por el contrario, evita posibles fermentaciones indeseables por descuido en el proceso. Los resultados del presente estudio demuestran que la preparación de cafés lavados con y sin la adición del producto enzimático (acelerador de la fermentación del mucílago) fueron estadísticamente iguales, lo que significa que no hay ningún efecto detrimental de la calidad de taza. Puerta (2009, p. 291) señala que no se justifican el uso de enzimas en el beneficio del café, cuando el secado del grano no se realiza de forma inmediata después del lavado.

Los costos del uso del producto enzimático se estiman entre \$0,87 y \$1,0 por cada quintal de café pergamino seco, que se compensa por la oportunidad de iniciar el secado el mismo día de la cosecha y, coincidiendo con Matiello *et al.* (2014, p.2), se evita problemas por fermentaciones defectuosas.

#### 4. CONCLUSIONES

El estudio de los efectos del producto enzimático pectinolítico GRANOZIME 100 CAFÉ, en la reducción del tiempo de fermentación del mucílago del café despulpado y en la calidad organoléptica del café robusta permitieron definir las siguientes conclusiones:

1. El tiempo de fermentación del café robusta despulpado, en condiciones naturales, tuvo una duración promedio de 20 horas, que equivale 1200 minutos. El tiempo de fermentación usando enzimas pectinolíticas se redujo a un rango que varió de 39 a 42 minutos, que equivale al 3,2-3,5% del tiempo empleado con el beneficio húmedo convencional.
2. Los atributos organolépticos de los cafés robustas lavados, usando enzimas pectinolíticas, en las dosis de 1, 2 y 3 mL por cada 10 kg de café cereza (E1, E2 y E3), resultaron estadísticamente iguales al café lavado preparado con el método de beneficio húmedo convencional (HC); mientras que los cafés naturales (VS), resultaron de inferior calidad organoléptica ( $p < 0,05$ ); esto significa:  $E1=E2=E3=HC > VS$ .

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AB Enzymes. 2018. Rohament CL. (En línea). Consultado en Diciembre 20 del 2018. Disponible en <https://www.abenzymes.com/en/your-industry/brewing-and-distilling/distilling/rohament-cl/>
- Charrier, A. y Berthaud, J. 1985. Botanical classification of coffee. En 1985. Coffee: Botany, biochemistry and production of beans and beverage. Editores M.N. Clifford & K.C. Willson. The Avi Publishing Company. Sidney, Australia. p. 13-47. ISBN: 0-87055-491-3.
- Duicela, L. 2017. Café robusta: Producción y poscosecha. Ed. Humus. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí. Guayaquil, Ecuador. 292 p. ISBN: 978-9942-8595-8-7.
- Duicela, L.A., García, J., Corral, R., Farfán, D. y Fernández, F. 2005. Calidad física y organoléptica de los cafés robustas ecuatorianos. Consejo Cafetalero Nacional. Manta, Ecuador. 49 p.
- GRANOTEC. 2017. Granozyme: Ficha técnica. Nutrición y biotecnología para la salud. Guayaquil, Ecuador. 1 p.
- IPF (Ingredientes y Productos Funcionales, Col.). 2011. Zynmucil: enzima para eliminar en menor tiempo el mucílago del café. Disponible en: <https://es.slideshare.net/altotrafico/zynmucil>
- Matiello, J. B., Jordão Filho, M., Ferreira, I. B., Vart, A., Cesar Filho, J. C. L. & Höhn, A. 2014. Efeito de enzima na retirada de mucilagem de cafés despulpados. Fundación PROCAFÉ. Brasil. 14 p. Disponible en: [http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/6530/81\\_40-CBPC-2014.pdf?sequence=1](http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/6530/81_40-CBPC-2014.pdf?sequence=1)
- Missouri Botanical Garden. 2010. Coffea: Species in *Coffea*. En línea. Consultado Marzo 30 de 2017. Disponible en : <http://www.theplantlist.org/browse/A/Rubiaceae/Coffea/>
- Peñuela, A., Pabón, J. & Oliveros, C. 2011. Enzimas: Una alternativa para remover rápida y eficazmente el mucílago del café. Avances Técnicos Cenicafe 406. 8 p. Disponible en: <http://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/33>
- Peñuela, A.E.; Pabón, J.P.; Rodríguez, N. y Oliveros, C.E. 2010. Evaluación de una enzima pectinolítica para el desmucilaginado del café. Cenicafe 61(3):241-250. Disponible en: <http://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/41>
- Puerta, G. I. 2010. Rendimientos y calidad de *Coffea arabica* L según el desarrollo del fruto y la remoción del mucílago. Cenicafe 61(1): 67-89. Disponible en: <http://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/41>
- Puerta, G. I. 2013. Factores procesos y controles en la fermentación del café. Avances Técnicos Cenicafe 422. 12 p. Disponible en: <http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/327/1/avt0422.pdf>
- Puerta, G.I. 2009. Efecto de enzimas pectolíticas en la remoción del mucílago de *Coffea arabica* L., según el desarrollo del fruto. Cenicafe 60(4):291-312. Disponible en: <http://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/57>
- van der Vossen, H.A.M. 1985. Botanical classification of coffee. En 1985. Coffee: Botany, biochemistry and production of beans and beverage. Editores M.N. Clifford & K.C. Willson. The Avi Publishing Company. Sidney, Australia. p. 49-96. ISBN: 0-87055-491-3.

## **AGRADECIMIENTO**

El presente trabajo ha tenido la contribución técnica y económica de la empresa Solubles Instantáneos (SICA), de la Asociación de Producción Agropecuaria ASOSUMACO de Orellana (ASOSUMACO), de la Estación Experimental Tropical Pichilingue del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, de la Universidad de Zulia y de la empresa GRANOTEC. De manera especial, los autores agradecen a las siguientes personas: Jorge Salcedo Benítez, Wilson Yáñez, Auro Macías Navarrete, Carlos Molina y Jessica Velázquez; así como a los integrantes del panel de catación conformado por Henry Benalcazar, Diana Farfán, Sofía Velázquez y Fanny Zambrano.

# **ANEXOS**

## HACIENDA DENISE



Foto 1. Preparación de las muestras de cafe robusta en Guayas

## SANTA ELENA



Foto 2. Preparación de las muestras de café en Santa Elena

## ASOSUMACO



Foto 3. Preparación de las muestras de café robusta en Orellana

## CATACIÓN DE CAFÉ ROBUSTA



Foto 4. Evaluación sensorial. Estación Pichilingue del INIAP. Enero 7-9 del 2019