

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

“DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ”

Realizado por:

FRANCISCO XAVIER PEÑAHERRERA VELASCO

Director de proyecto:

Ing. Alberto Aguirre Bravo, Ph.D.

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

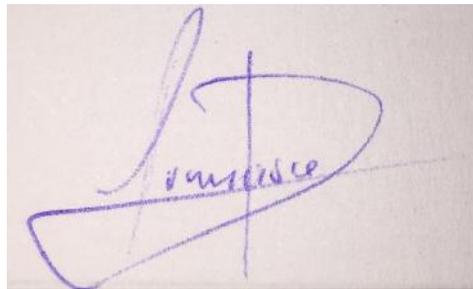
Quito, 15 de febrero de 2022

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN
BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN
DE CAFÉ

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN
BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN
DE CAFÉ

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, FRANCISCO XAVIER PEÑAHERRERA VELASCO, con cédula de identidad # 172094351-1, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento. A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente



FIRMA

172094351-1

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN
BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN
DE CAFÉ

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN
BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA LA
FERMENTACIÓN DE CAFÉ”**

Realizado por:

FRANCISCO XAVIER PEÑAHERRERA VELASCO

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Ha sido dirigido por el profesor

ALBERTO AGUIRRE BRAVO

Quien considera que constituye un trabajo original de su autor



FIRMA

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN
BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN
DE CAFÉ

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los profesores Informantes:

SUSANA CHAMORRO

MIGUEL MARTÍNEZ

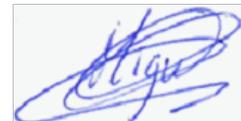
Después de revisar el trabajo presentado,

Lo han calificado como apto para su defensa oral ante

El tribunal examinador



FIRMA



FIRMA

Quito, 15 de febrero del 2022

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN
BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN
DE CAFÉ

DEDICATORIA,

A todos aquellos que buscan una respuesta.

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN
BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN
DE CAFÉ

AGRADECIMIENTO

A mis padres, mi familia y vínculos cercanos que me acompañaron en el proceso,

A mi tutor Alberto Aguirre.

A los laboratorios de la Universidad SEK.

Profesores.

Cafetería “Perla Negra”

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN
BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN
DE CAFÉ

Para someter a:

To be submitted:

**Diseño y evaluación de sistemas gastrointestinales *in vitro* en base a microbiota de
herbívoros y omnívoros para fermentación de café.**

Francisco Peñaherrera Velasco¹, Alberto Aguirre Bravo²

¹Universidad Internacional SEK, Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas, Quito,
Ecuador. Xx/xx/2021 16:30:55

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA: Alberto Aguirre PhD, Universidad Internacional
SEK, Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas, Quito, Ecuador.

Teléfono +593-; email: alberto.aguirre@uisek.edu.ec

Título corto o Running title: Diseño de sistemas gastrointestinales *in vitro* para fermentar café

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

Resumen.

En diversos lugares del mundo se ha utilizado animales como fermentadores *in vivo*, por ejemplo, la civeta de la India que es utilizada para fermentar granos de café. Este tipo de procesos brindan una calidad organoléptica única al producto final; estudios afirman que la microbiota que habita en el sistema gastrointestinal de algunos mamíferos junto a las condiciones fisicoquímicas del medio, dan lugar a procesos de fermentación que brindan cualidades especiales a los granos de café. En este sentido, y como alternativa para evitar el uso de animales para estos procesos, el objetivo de este estudio fue diseñar y evaluar sistemas gastrointestinales *in vitro*, en base a la microbiota de sistemas gastrointestinales de animales omnívoros y herbívoros *in vivo*, para fermentación de café. Por tanto, en este trabajo se diseñaron e implementaron sistemas gastrointestinales *in vitro*, para posteriormente realizar comparaciones entre el perfil organoléptico de café fermentado en los sistemas gastrointestinales *in vitro* con los perfiles de café fermentado en animales y café fermentado convencionalmente (sin el uso de animales y con la microbiota natural presente en la pulpa de café). Se determinó que el café fermentado en sistemas gastrointestinales *in vitro* presenta rasgos únicos en cuanto al perfil organoléptico y calificaciones sensoriales similares a las de un café fermentado en un sistema gastrointestinal *in vivo*. Aunque el café fermentado en sistemas gastrointestinales *in vitro* no logró igualar el puntaje de un café fermentado convencionalmente, se podría considerar un café de especialidad.

Palabras clave: Microbiota, Microbiología, fermentación *in vitro*, café

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

Abstract.

Around the world, animals have been used as *in vivo* fermenters, for example, the Indian civet which is used to ferment coffee beans. This type of process provides a unique organoleptic quality to the final product; Studies affirm that the microbiota that inhabits the gastrointestinal system of some mammals, together with the physicochemical conditions of the environment, give rise to fermentation processes that provide special qualities to coffee beans. In this sense, and as an alternative to avoid the use of animals for these processes, the objective of this study was to design and evaluate *in vitro* gastrointestinal systems, based on the microbiota of gastrointestinal systems of omnivorous and herbivorous animals *in vivo*, for fermentation of coffee. Therefore, in this work, *in vitro* gastrointestinal systems were designed and implemented, to later make comparisons between the organoleptic profile of fermented coffee in *in vitro* gastrointestinal systems with the profiles of coffee fermented in animals and conventionally fermented coffee (without the use of animals and with the natural microbiota present in the coffee pulp). Coffee fermented in *in vitro* gastrointestinal systems was found to exhibit unique traits in terms of organoleptic profile and sensory ratings like those of coffee fermented in an *in vivo* gastrointestinal system. Although coffee fermented in *in vitro* gastrointestinal systems failed to match the score of conventionally fermented coffee, it could be considered a specialty coffee

Key words: Microbiology, microbiota, *in vitro* fermentation, coffee

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN
BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN
DE CAFÉ

Índice de contenidos

1. Introducción	14
2. Hipótesis	15
3. Objetivos	15
Objetivo General	15
Objetivos Específicos	15
4. Materiales y Métodos.....	15
Materiales	15
Equipos.....	16
Reactivos	16
Procedimiento.....	16
Etapa 1: Montaje de sistemas gastrointestinales <i>in vitro</i>	17
Etapa 1.1 Montaje de Fase Ácida (Estómago)	17
1.1.1. Herbívoros:.....	19
1.1.2. Omnívoros:.....	19
1.1.3. Híbrido:	20
Etapa 1.2 Montaje de Fase aerobia (Intestino delgado)	20
Etapa 1.3 Montaje de fase anaerobia (Intestino grueso)	22
1.3.1 Herbívoros	24
1.3.2 Omnívoros	24
1.3.3 Híbrido	24
Etapa 2: Evaluación de la capacidad de los sistemas de fermentación <i>in vitro</i> para obtener nuevos perfiles organolépticos de café de especialidad	25
2.1. Obtención de muestras de café	25
2.2. Fermentación del café	25
2.3. Lavado.....	26
2.4. Secado	26
2.5. Tueste y Molienda.....	27
2.6. Evaluación de muestras de café fermentadas.....	27
2.7 Análisis de evaluación sensorial	27
5. Resultados	28
Etapa 1: Montaje de sistemas gastrointestinal <i>in vitro</i>	28
Etapa 1.1 Montaje de Fase ácida (Estómago).....	28
Etapa 1.2 Montaje de Fase Aerobia (Intestino Delgado).....	29

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

Etapa 1.3 Montaje de fase anaerobia (Intestino grueso).....	31
Etapa 2: Evaluación de la capacidad de los sistemas de fermentación <i>in vitro</i> para obtener nuevos perfiles organolépticos de café de especialidad	32
6. Discusión de Resultados.	42
7. Conclusiones	45
8. Recomendaciones	46
9. Bibliografía.	47
10. Anexos.	50
ANEXO A	50
A1: Café listo para ser procesado en los sistemas gastrointestinales <i>in vitro</i>	50
ANEXO B	51
B1: Proceso de extracción de mucílago de café luego de la fermentación anaerobia	51
ANEXO C	52
C1. Grano seco de café, listo para el tueste. (Omnívoros)	52
C2. Grano seco de café, listo para el tueste. (Herbívoros)	52
C3. Grano seco de café, listo para el tueste. (Híbrido).....	52

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema completo del sistema gastrointestinal con sus respectivas fases y procesos involucrados.....	17
Figura 2. Montaje del sistema en la fase ácida (estómago).	18
Figura 3. Esquema de la Fase Ácida (Estómago) con sus respectivas entradas y condiciones fisicoquímicas utilizadas.....	19
Figura 4. Esquema de la Fase Aerobia (Intestino delgado) con sus respectivas entradas y condiciones fisicoquímicas utilizadas.....	21
Figura 5. Montaje de Fase Aerobia, adición de carga microbiana y compost que incluye enzimas microbianas.....	21
Figura 6. Esquema de la Fase Anaerobia (Intestino Grueso) con sus respectivas entradas y condiciones fisicoquímicas.	22
Figura 7. Montaje de Fase Anaerobia (Intestino grueso).....	24

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

Figura 8. Diagrama del dispositivo utilizado para medición de biogás producido en los matraces.	25
Figura 9. Valores de densidad óptica (DO) a 600 nm del líquido presente en la mezcla de la fase aerobia del sistema herbívoro.	30
Figura 10. Valores de densidad óptica (DO) a 600 nm del líquido presente en la mezcla de la fase aerobia del sistema omnívoro.	30
Figura 11. Producción de biogás durante el tiempo de incubación en la fase anaerobia de herbívoros.	31
Figura 12. Producción de biogás durante el tiempo de incubación en la fase aerobia de omnívoros.	32
Figura 13. Puntaje de los atributos organolépticos del café procesado en el sistema gastrointestinal <i>in vitro</i> herbívoro.	33
Figura 14. Perfil sensorial general del café procesado en el sistema gastrointestinal <i>in vitro</i> herbívoro, presentado de manera cualitativa.	33
Figura 15. Puntaje de los atributos organolépticos del café procesado en el sistema gastrointestinal <i>in vitro</i> omnívoro.	34
Figura 16. Perfil sensorial general del café procesado en el sistema gastrointestinal <i>in vitro</i> omnívoro, presentado de manera cualitativa.	34
Figura 17. Puntaje de los atributos organolépticos del café procesado en el sistema gastrointestinal <i>in vitro</i> híbrido.	35
Figura 18. Perfil sensorial general del café procesado en el sistema gastrointestinal <i>in vitro</i> híbrido, presentado de manera cualitativa.	35
Figura 19. Porcentaje de rendimiento de los granos de café a tostar presentados en el total de granos fermentados en los sistemas gastrointestinales <i>in vitro</i> de herbívoros, omnívoros e híbridos,	36

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

Figura 20. Puntaje de los atributos organolépticos del café procesado en el sistema convencional de fermentación de la empresa “Perla Negra”.	37
Figura 21. Perfil sensorial general del café fermentado de manera convencional por la empresa Perla Negra.	37
Figura 23. Puntaje de atributos sensoriales medidos en tres tipos de café Kopi Luwak (café fermentado <i>in vivo</i> en el sistema gastrointestinal de la civeta de palma).	38
Figura 22. Rendimiento total en cuanto a los defectos que pudiesen presentarse en el grano de café fermentado de manera convencional por la empresa “Perla Negra”.	38
Figura 24. Características aromáticas y puntaje final de tres tipos de café Kopi Luwak (café fermentado <i>in vivo</i> en el sistema gastrointestinal de la civeta de palma).	38
Figura 25. Análisis de componentes principales en base a la información de los atributos organolépticos de los sistemas de fermentación <i>in vitro</i> implementados y evaluados en este trabajo (herbívoro, omnívoro e híbrido), y el sistema de fermentación convencional de café (utilizado por la empresa de café Perla Negra).	39

Índice de Tablas

Tabla 1. Evaluación del rendimiento digestivo (liberación de azúcares) en la Fase Ácida herbívora (estómago) con relación a la cantidad de alimento añadido.	29
Tabla 2. Evaluación del rendimiento digestivo (liberación de azúcares) en la Fase Ácida omnívora (estómago) con relación a la cantidad de alimento añadido.	29

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

Introducción.

El Ecuador a pesar de ser un país con varios pisos climáticos y diverso con respecto a la producción agrícola, sigue estancado en cuanto a la producción de café a comparación del mercado regional. Este problema se presenta debido a una limitada experiencia técnica y un deficiente control en procesos postcosecha como la fermentación, lavado y secado. (Ordoñez, 2019)

Se conoce que uno de los cafés más valorados en el mundo es el Kopi Luwak (palabras indonesias para café y civeta). Este producto se obtiene gracias a la fermentación de granos de café en el sistema digestivo de *Paradoxurus hermaphroditus*, un mamífero omnívoro que vive en los bosques tropicales de Indonesia. (Marcone, 2004)

La fermentación de café por *Paradoxurus hermaphroditus* ha despertado la curiosidad de varios científicos que han reportado que microorganismos, enzimas o una combinación de ambos, que se encuentran en el sistema gastrointestinal de algunos animales pueden ser utilizados para modificar las propiedades organolépticas de granos de café y que estos procesos fermentativos pueden ser replicados en un laboratorio, evitando el uso indiscriminado de la civeta o cualquier otro animal en esta industria. (Muzaifa et al., 2019) Además de que los costos de producción y operación de los sistemas de fermentación *in vitro* son inferiores. (Fitri et al., 2019).

Otros estudios como el de Fitri *et al* (2019), muestran que el café producido en un sistema gastrointestinal diseñado en un laboratorio se acerca mucho a la calidad que puede obtenerse en un sistema gastrointestinal *in vivo*. En este trabajo se buscó diseñar y evaluar sistemas de fermentación *in vitro* para producir un café de especialidad con rasgos sensoriales únicos, utilizando la microbiota de animales omnívoros como el cerdo y herbívoros como el caballo.

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

Hipótesis

Sistemas gastrointestinales *in vitro* en base a microbiota de herbívoros y omnívoros permiten obtener nuevos perfiles organolépticos de café de especialidad.

Objetivos

Objetivo General

Determinar la capacidad de sistemas gastrointestinales *in vitro* desarrollados en base a microbiota de herbívoros y omnívoros para obtener nuevos perfiles organolépticos de café de especialidad.

Objetivos Específicos

1. Desarrollar sistemas gastrointestinales *in vitro* basados en microbiota de herbívoros y omnívoros para fermentación de café de especialidad.

2. Evaluar la capacidad de los sistemas gastrointestinales *in vitro* desarrollados para obtener nuevos perfiles organolépticos de café de especialidad.

Materiales y Métodos

Materiales

- Probetas
- Pipetas
- Matraces
- Tina de agua
- Vasos de precipitación

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

- Vidrio reloj
- Mangueras de venoclisis
- Termómetros

Equipos

- Refractómetro
- Incubadora
- Calentador de peceras
- Espectrofotómetro
- Estufas
- Balanza de precisión
- pH metro

Reactivos

- H_2SO_4 al 96% v/v
- 1.04 g de H_2KPO_4
- 2.14 g de K_2HPO_4
- NaOH al 50 % m/v

Procedimiento

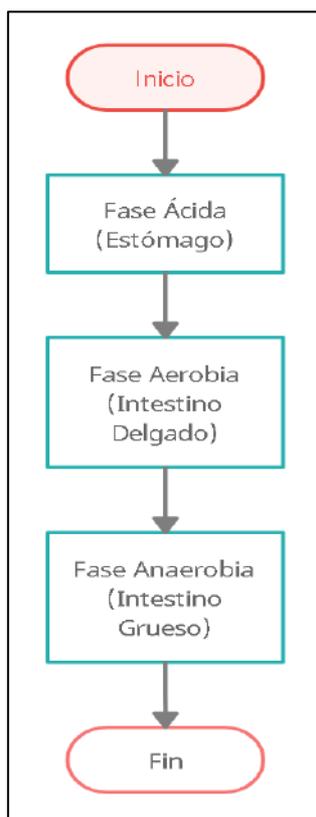
El procedimiento experimental del trabajo se dividió en dos etapas: la Etapa 1 donde se desarrolló el montaje de los sistemas gastrointestinales in vitro, y la Etapa 2 donde se evaluó la capacidad de los sistemas gastrointestinales montados para obtener nuevos perfiles organolépticos de café.

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

Etapa 1: Montaje de sistemas gastrointestinales *in vitro*.

En esta etapa se desarrollaron tres tipos de sistemas gastrointestinales *in vitro*, diseñados en base a sistemas gastrointestinales *in vivo* de animales herbívoros, omnívoros y una combinación de ambos (híbridos). Cada sistema gastrointestinal *in vitro* estuvo compuesto por tres fases: fase ácida (estómago), fase aerobia (intestino delgado) y fase anaerobia (intestino grueso), como se puede observar en la Figura 1.

Figura 1. Esquema completo del sistema gastrointestinal con sus respectivas fases y procesos involucrados



Etapa 1.1 Montaje de Fase Ácida (Estómago)

En esta fase se preparó una mezcla de compuestos para digerir en cada sistema gastrointestinal *in vitro* correspondiente, es decir, para sistemas omnívoros, herbívoros e híbridos. Estas mezclas se realizaron en matraces de 500 ml como se observa en la Figura 2,

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

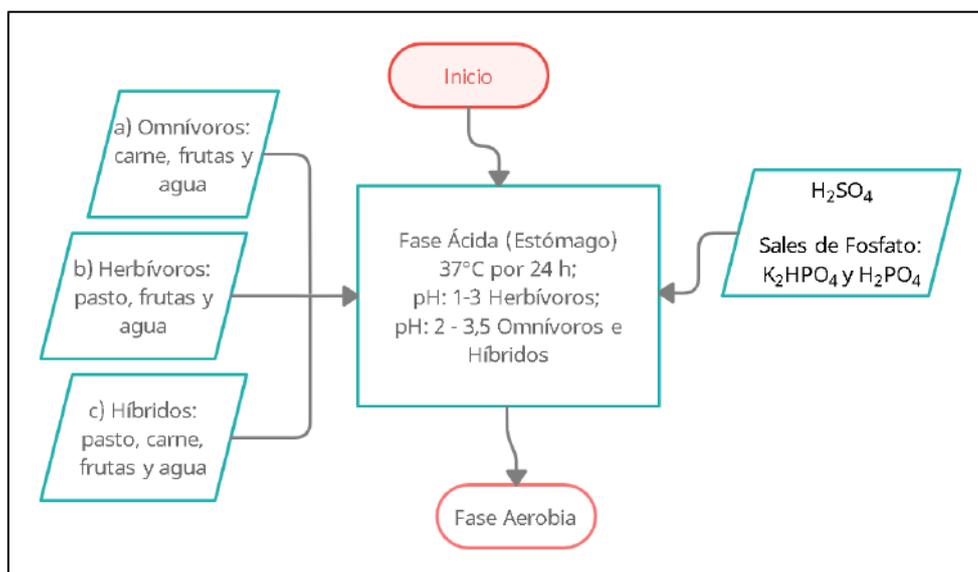
y se evaluaron las condiciones óptimas para una digestión efectiva luego de la adición de H_2SO_4 concentrado. Se procuró que las mezclas a digerir se encuentren entre un pH de 1 a 3 para herbívoros (pH de estómago de caballos) (Murray & Grodinsky, 1989) y 2 a 3.5 (pH de estómago de cerdos) (Lawlor et al., 2005) para omnívoros e híbridos, basados en la fisiología de digestión de estos animales, y posteriormente las mezclas se incubaron por 24 horas a $37^\circ C$. Antes de introducir el ácido se añadieron sales de potasio (2,14 g de K_2HPO_4 y 1,09 g de H_2PO_4) a las mezclas a digerir, para evitar cambios bruscos en el pH de la solución (Asad et al., 2011). En la Figura 3 se indica un esquema de la fase ácida implementada, junto con los distintos tipos de alimentación que ingresaron a la misma y las condiciones fisicoquímicas utilizadas. El tiempo de incubación se determinó luego de que varias pruebas mostraran que en este periodo se obtuvo un mejor rendimiento en cuanto a digestión de carbohidratos, lo cual se pudo reflejar en el valor de grados Brix medidos luego de la adición de H_2SO_4 .

Figura 2. Montaje del sistema en la fase ácida (estómago). Mezclas para digerir de sistemas herbívoros (izquierda) y omnívoros (derecha), con dos réplicas para cada uno.



DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

Figura 3. Esquema de la Fase Ácida (Estómago) con sus respectivas entradas y condiciones fisicoquímicas utilizadas. a) Omnívoros; b) Herbívoros; c) Híbridos.



1.1.1. Herbívoros:

Para formular la mezcla a digerir que ingresó a la fase ácida del sistema gastrointestinal de herbívoros se utilizaron alimentos basados en la dieta de estos animales. Esta mezcla se compuso de pasto (15 g), frutas (15 g) y agua (200 ml); se usaron frutas como papaya, banana, fresa y manzana. El pasto recogido fue triturado y mezclado con las frutas, para luego añadir agua, sales de fosfato y ácido sulfúrico.

1.1.2. Omnívoros:

Para formular la mezcla a digerir que ingresó a la fase ácida del sistema gastrointestinal de omnívoros se utilizaron alimentos basados en la dieta de estos animales. Esta mezcla se compuso de carne molida (15 g), frutas (15 g) y agua (200 ml); se usaron frutas como papaya, banana, fresa y manzana. La carne molida se mezcló con las frutas, para luego añadir agua, sales de fosfato y ácido sulfúrico.

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

1.1.3. Híbrido:

Para formular la mezcla a digerir en la fase ácida híbrida se usaron partes iguales del alimento usado en la fase ácida de herbívoros y la fase ácida de omnívoros. Esta mezcla se compuso de carne molida (7,5 g), pasto (7,5 g), frutas (15 g) y agua (200 ml); se usaron frutas como papaya, banana, fresa y manzana. La carne molida se mezcló con el pasto triturado y posteriormente con las frutas, agua, sales de fosfato y ácido sulfúrico.

La implementación del sistema híbrido surgió por la recomendación del personal que realizó la cata correspondiente del café fermentado en los sistemas herbívoro y omnívoro en las fases finales del experimento, por lo que no se tiene un registro amplio de las pruebas realizadas para este sistema híbrido desde el inicio de la experimentación.

Etapa 1.2 Montaje de Fase aerobia (Intestino delgado)

El siguiente paso fue la digestión aerobia, que simuló el intestino delgado en el sistema gastrointestinal. Luego de la digestión realizada en la fase ácida (estómago), se utilizaron los productos salientes de dicha fase para llevar a cabo este procedimiento. En este proceso se realizó el mismo protocolo para todos los tratamientos (omnívoro, herbívoro e híbrido), como se indica en la Figura 4.

En esta fase a los productos salientes de la fase ácida se les añadió 2 gramos de compost a cada uno, que aportó tanto microorganismos como enzimas para la descomposición del material orgánico presente en esta fase. Durante esta fase se mantuvo constante la temperatura (37°C) y el pH (7.0). El pH se reguló tras la adición de NaOH concentrado al 50% m/v. Se incubó durante 72 horas, debido a que en este lapso se pudo determinar un crecimiento notorio en la actividad microbiana luego de la adición de compost y con esto una digestión en los

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

compuestos de las mezclas. Posteriormente, se realizó un monitoreo de la densidad óptica (DO) de la fase líquida de la mezcla a una longitud de onda de 600 nm, esto último para evidenciar el crecimiento de microorganismos sobre la mezcla, lo cual es indicativo de que los compuestos orgánicos están siendo degradados. En la Figura 5 se indican fotografías de los envases en donde se realizó la fase aerobia en el laboratorio.

Figura 4. Esquema de la Fase Aerobia (Intestino delgado) con sus respectivas entradas y condiciones fisicoquímicas utilizadas.

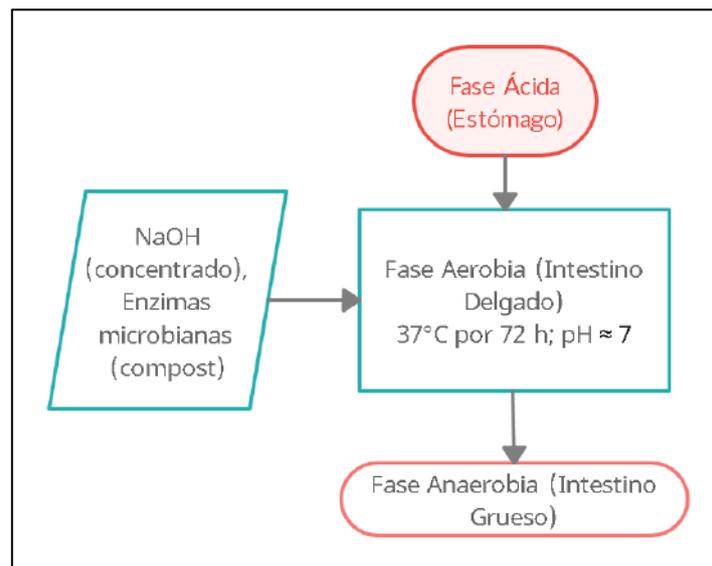


Figura 5. Montaje de Fase Aerobia, adición de carga microbiana y compost que incluye enzimas microbianas (se observa sobre el papel aluminio) a los sistemas gastrointestinales con su respectiva réplica. Sistemas omnívoros (izquierda) y sistemas herbívoros (derecha)

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

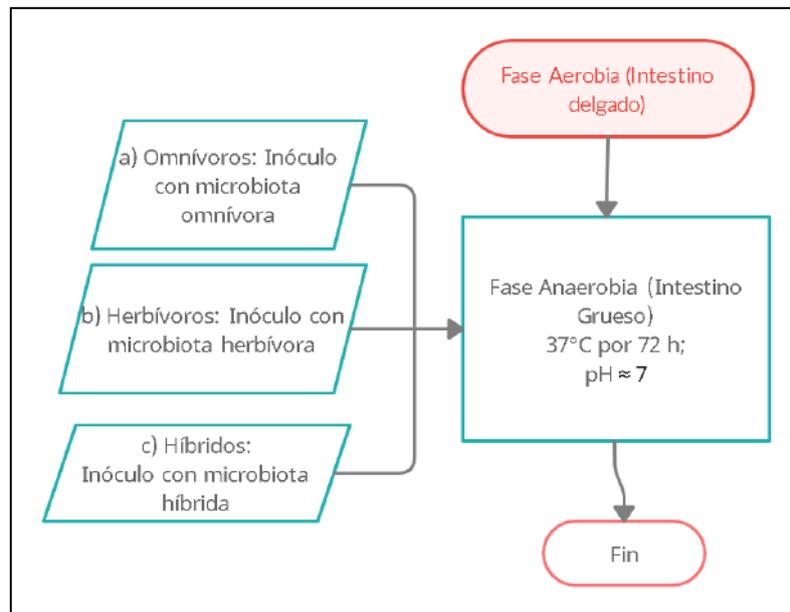


Etapa 1.3 Montaje de fase anaerobia (Intestino grueso)

En esta fase del proceso se trató de replicar lo que sucede en el intestino grueso de un sistema gastrointestinal, tal y como se detalla en el esquema de la Figura 6. Para tal objetivo, al producto que salió de la fase aerobia (intestino delgado) se le añadió un inóculo enriquecido (heces animales) para simular el funcionamiento de un intestino grueso. Para el enriquecimiento del inóculo se inocularon heces en matraces conteniendo agua y sustratos similares que los animales de donde procedieron las heces utilizan, y posteriormente los matraces se incubaron a 32°C en condiciones anaerobias por 72 horas.

Figura 6. Esquema de la Fase Anaerobia (Intestino Grueso) con sus respectivas entradas y condiciones fisicoquímicas.

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ



Se montó el sistema en una tina llena de agua como se observa en la Figura 7, la temperatura del agua en la tina se reguló gracias a un calentador de agua para peceras. También se instalaron varias probetas parcialmente llenas de agua alrededor de la tina en una posición invertida y conectadas a mangueras que salían de los matraces utilizados para la fermentación, como se observa en la Figura 8. Esto nos permitió constatar la actividad microbiana mediante la cuantificación de biogás generado en este proceso a través del desplazamiento del volumen de agua dentro de las probetas en cada uno de los sistemas gastrointestinales montados. Se incubaron estas mezclas durante 72 horas (Parajuli, 2011).

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

Figura 7. Montaje de Fase Anaerobia (Intestino grueso)



1.3.1 Herbívoros

En los herbívoros se utilizaron heces de caballo para el inóculo enriquecido y después se agregaron al matraz del tratamiento correspondiente.

1.3.2 Omnívoros

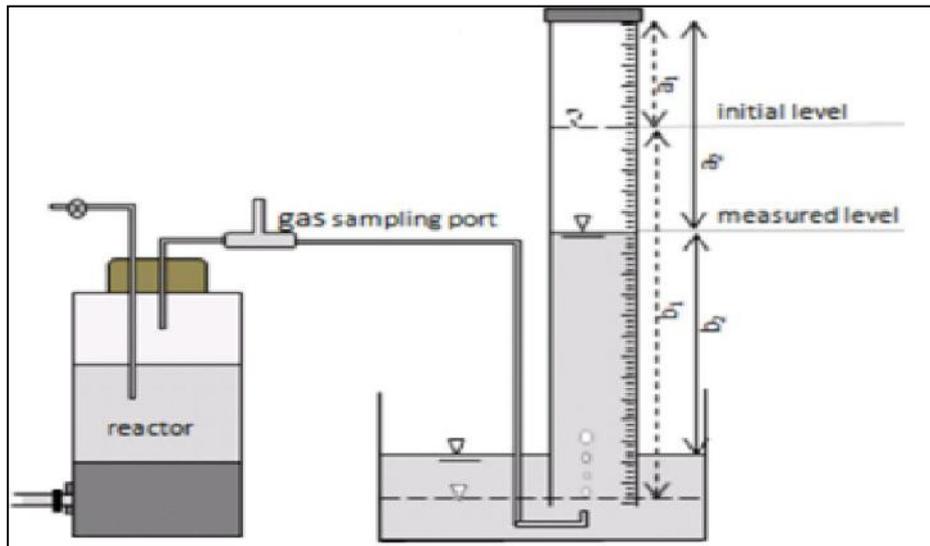
En los omnívoros se utilizaron heces de cerdo para el inóculo enriquecido, y después se agregaron al matraz del tratamiento correspondiente.

1.3.3 Híbrido

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

Para los híbridos se utilizó una mezcla de heces de cerdo y caballo en el inóculo enriquecido, después se las agregaron al matraz del tratamiento correspondiente.

Figura 8. Diagrama del dispositivo utilizado para medición de biogás producido en los matraces. a y b: representan alturas de gas y líquido, respectivamente. Subíndices 1, 2: Condición antes de la medición y después de la medición. Imagen tomada de Parajuli (2019)



Etapas 2: Evaluación de la capacidad de los sistemas de fermentación *in vitro* para obtener nuevos perfiles organolépticos de café de especialidad

2.1. Obtención de muestras de café

Los granos de café utilizados se los obtuvo de finca “Perla Negra”, productora de café en el cantón Quito, parroquia de Nanegal. Las muestras de café utilizadas en este trabajo correspondieron a café Arábico de la variedad *típica* mejorada.

2.2. Fermentación del café

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

Se colocaron aproximadamente 120 g de café en la entrada de cada fase del sistema montado, desde la fase ácida (estómago) y se continuó de manera secuencial el proceso hasta llegar a la fase anaerobia.

2.3. Lavado

Luego de que los granos cumplieron su tiempo de fermentación, se sometieron a un proceso de lavado con agua potable y se retiró el mucílago (mesocarpio) presente en la cereza del café fermentado. Después se procedió a pesar el material restante para enviar los granos lavados al secado correspondiente.

2.4. Secado

Para poder tostar el café fermentado y seco, se necesita llegar a una humedad del 10-12% en el grano, por lo cual en este proceso se utilizó una estufa (Muzaifa et al., 2019). Se fijó una temperatura de 50°C y se dejó secar por 17 horas para alcanzar una humedad de aproximadamente 12% (Jurado et al., 2009). Para determinar el porcentaje de humedad final del grano de café se utilizó la ecuación planteada:

Ecuación 1. Contenido final de humedad en granos de café. Obtenida de (Jurado et al., 2009)

$$Chf = \left[1 - \frac{Pi(1 - Chi)}{Pf} \right] 100$$

Donde:

Pi: es la masa inicial del café en gramos

Chi: es el contenido inicial de humedad en porcentaje (53% constante)

Pf: el peso de la masa final en gramos

Chf: contenido final de humedad estimada en porcentaje

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

2.5. Tueste y Molienda

El tueste del café se realizó en la cafetería “Perla Negra”, ubicada en el centro histórico de la ciudad de Quito, Ecuador. Se utilizó una máquina tostadora de café, a 220°C. La molienda se realizó con moledora especial para café.

2.6. Evaluación de muestras de café fermentadas

Para poder asegurar que el café fermentado en los sistemas gastrointestinales *in vitro* presentó nuevos perfiles organolépticos (en comparación con el café fermentado de forma convencional) se sometió al café fermentado (seco, tostado y molido) en los sistemas gastrointestinales *in vitro* a un proceso de cata en la cafetería “Perla Negra”, realizado por Lupe Rogel Zabala (Catador Q Grader, 5701 DEM), donde en base a su experiencia se evaluaron los aspectos más importantes del producto final fermentado.

2.7 Análisis de evaluación sensorial

Dentro del análisis que se llevó a cabo se evaluaron atributos organolépticos en base al formulario de cata de la “Asociación de cafés especiales de América”, que evalúa 11 aspectos diferentes, en donde se califica sobre 10 puntos el análisis, donde 10 es extraordinario y 6 es bueno. También se toma en cuenta los defectos que se presentan en el grano de café en cuanto al rendimiento total de este, y por último se hace una caracterización del perfil sensorial con relación al aroma y sabor que el grano de café presenta.

Una vez completado el análisis sensorial de las muestras de café fermentado en los sistemas gastrointestinales *in vitro*, se realizó un análisis de componentes principales utilizando los puntajes de cada uno de los atributos sensoriales para determinar si existió similitud o diferencia en los perfiles organolépticos de café obtenidos en los distintos sistemas gastrointestinales *in vitro* y convencional.

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

Resultados

Etapa 1: Montaje de sistemas gastrointestinal *in vitro*.

Etapa 1.1 Montaje de Fase ácida (Estómago)

Para constatar que existió una digestión de los compuestos orgánicos añadidos a la mezcla luego de agregar ácido sulfúrico, se midieron los grados Brix a través de un refractómetro óptico (Ugwu et al., 2018). Esto nos permite determinar la ruptura de carbohidratos de cadena larga tras el incremento de azúcares en la mezcla. (Klein, 2014) El aumento de azúcares es directamente proporcional al valor reflejado en grados Brix y que por consecuencia representa una digestión efectiva tras la adición de ácido sulfúrico en esta fase.

Para conseguir una digestión de mejor rendimiento, se evaluó la proporción de alimentación al sistema con la cantidad de azúcares liberados en grados Brix, como se puede visualizar en la Tabla 1 y 2 para los sistemas herbívoros y omnívoros, respectivamente. Luego de siete pruebas realizadas para la fase ácida de los sistemas gastrointestinales omnívoro y herbívoro, se determinó que la prueba N°7 obtuvo un mejor rendimiento en cuanto a liberación de azúcares y proporción de alimento, en ambos casos. Por tanto, a partir de ese momento se seleccionó a la proporción de alimento y las condiciones fisicoquímicas (pH) de la prueba 7 como condiciones a ser usadas para la Fase ácida de los sistemas gastrointestinales *in vitro*. Con este procedimiento estandarizado, se procedió a montar y evaluar la Fase aerobia de los sistemas gastrointestinales.

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

Tabla 1. Evaluación del rendimiento digestivo (liberación de azúcares) en la Fase Ácida herbívora (estómago) con relación a la cantidad de alimento añadido.

Herbívoros					
<i>N° pruebas</i>	Fruta (g)	Pasto (g)	Agua (ml)	Brix (sin ácido)	Brix (con ácido)
1	28,5	20	275	0	8
2	19	20	250	0	8
3	12,5	10	175	2	9
4	12,5	15	200	1	11
5	12,5	15	200	2	11
6	15	15	200	1	11
7	15	15	200	1	12

Tabla 2. Evaluación del rendimiento digestivo (liberación de azúcares) en la Fase Ácida omnívora (estómago) con relación a la cantidad de alimento añadido.

Omnívoros					
<i>N° pruebas</i>	Fruta (g)	Carne (g)	Agua (ml)	Brix (sin ácido)	Brix (con ácido)
1	28,5	22,65	275	3	8
2	19	13	150	3	7
3	12,5	12,5	175	3	10
4	12,5	12,5	200	2	12
5	12,5	12,5	200	2	13
6	15	15	200	2	13
7	15	15	200	2	13

Etapa 1.2 Montaje de Fase Aerobia (Intestino Delgado)

En esta fase se evaluó el crecimiento microbiano a partir de una curva trazada en base al promedio de siete repeticiones con los datos de Densidad Óptica (DO) medidos en las mezclas a digerir de la fase aerobia utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600nm, como se observa en las Figuras 9 y 10. El aumento de Densidad Óptica (DO) nos permitió determinar que efectivamente hubo aumento poblacional microbiano en las mezclas

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

a digerir, como también confirmar la actividad enzimática deseada para una digestión efectiva dentro de esta fase del sistema. (Stevenson et al., 2016)

Figura 9. Valores de densidad óptica (DO) a 600 nm del líquido presente en la mezcla de la fase aerobia del sistema herbívoro. Los puntos muestran el promedio de 7 réplicas independientes de esta fase y las barras representan la desviación estándar del promedio.

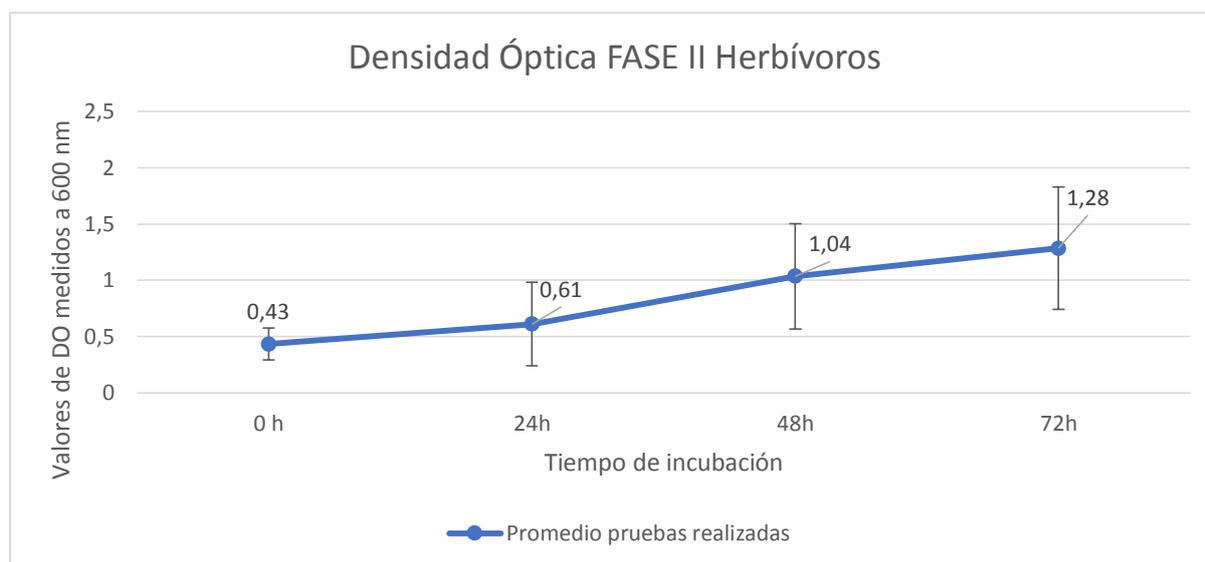
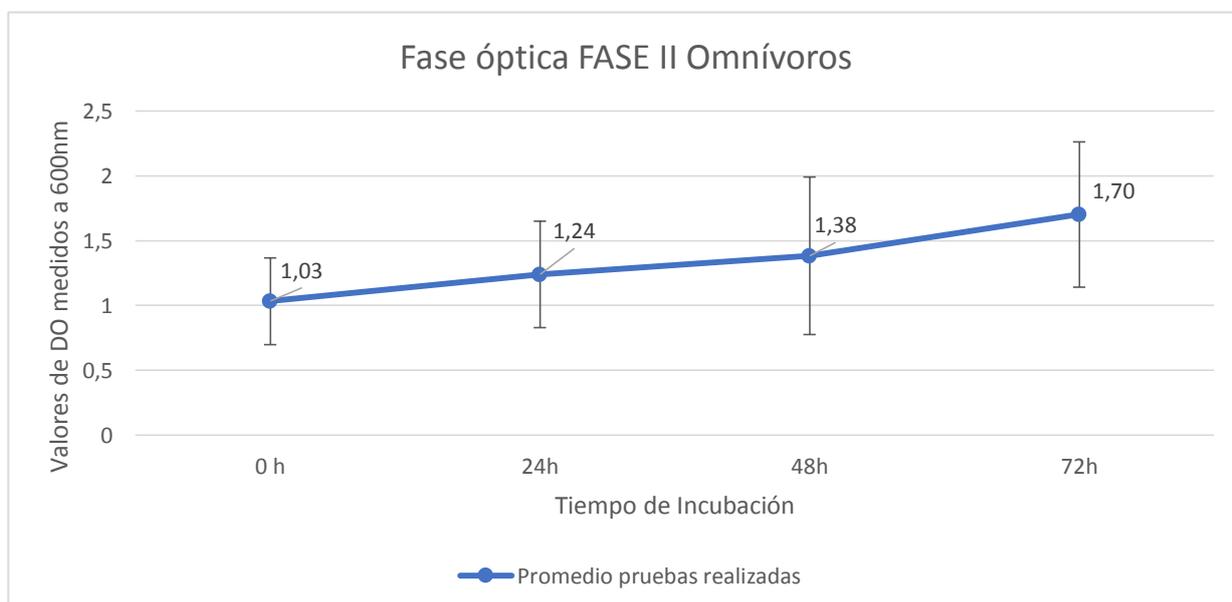


Figura 10. Valores de densidad óptica (DO) a 600 nm del líquido presente en la mezcla de la fase aerobia del sistema omnívoro. Los puntos muestran el promedio de 7 réplicas independientes de esta fase y las barras representan la desviación estándar



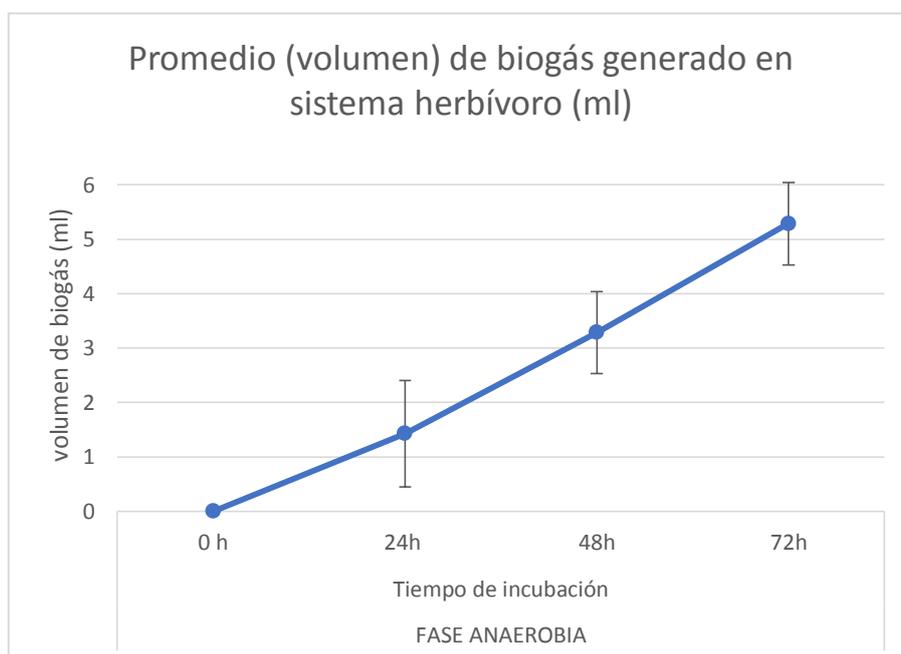
DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

Etapa 1.3 Montaje de fase anaerobia (Intestino grueso)

En esta etapa se pudo comprobar la digestión anaerobia con la ayuda del dispositivo indicado en la Figura 8, el cual permitió cuantificar la producción de biogás (volumen) a través de la medición del volumen de agua desplazada en la probeta invertida. La producción de biogás es un indicador que permite confirmar la presencia de microorganismos anaerobios y su actividad en esta fase de la digestión (Parajuli, 2011).

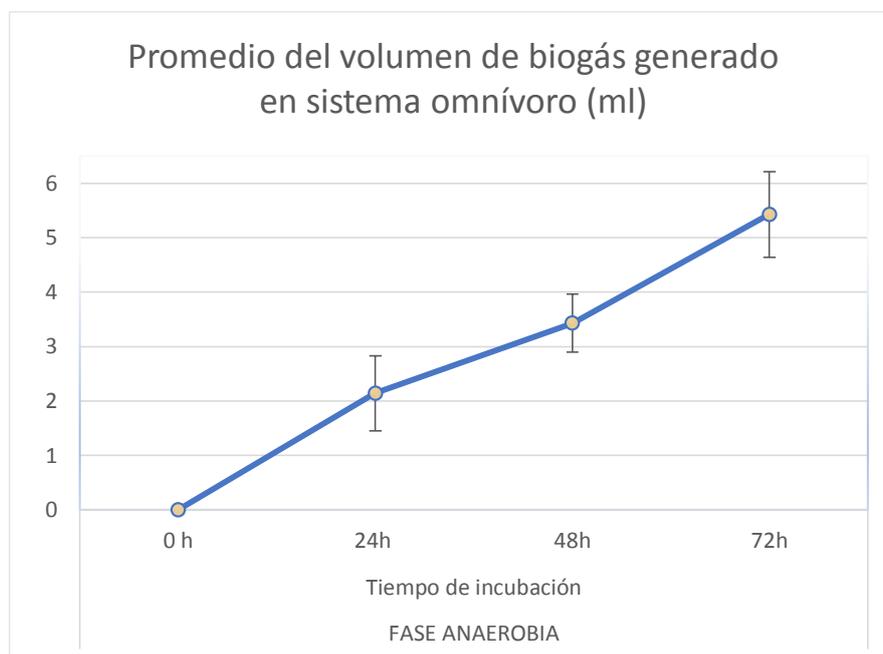
En las Figuras 11 y 12 se indica la producción (volumen) de biogás durante la fase anaerobia de los sistemas gastrointestinales herbívoros y omnívoros en siete pruebas realizadas, con un evidente incremento en el desplazamiento del volumen de agua en la probeta invertida con respecto al tiempo. Esta actividad microbiana determina la actividad microbiana y con ello la digestión de componentes presentes en el mucílago del grano de café en los sistemas gastrointestinales *in vitro*. (Watanabe et al., 2020)

Figura 11. Producción de biogás durante el tiempo de incubación en la fase anaerobia de herbívoros. Los puntos representan el promedio de siete pruebas realizadas con respecto al tiempo de incubación y las barras indican la desviación estándar del promedio.



DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

Figura 12. Producción de biogás durante el tiempo de incubación en la fase aerobia de omnívoros. Los puntos representan el promedio de siete pruebas realizadas con respecto al tiempo de incubación y las barras indican la desviación estándar con respecto al promedio.



Etapa 2: Evaluación de la capacidad de los sistemas de fermentación *in vitro* para obtener nuevos perfiles organolépticos de café de especialidad

2.7. Análisis de evaluación sensorial

En las Figuras 13, 15 y 17 se indica el puntaje obtenido al realizarse el análisis cuantitativo de los atributos organolépticos del café fermentado en los sistemas gastrointestinales *in vitro*. En cuanto a la evaluación de los defectos encontrados en granos de café luego de la fermentación, se obtuvo un puntaje de rendimiento total del 90%, donde solo el 10% del total de granos presentó defectos como broca, quakers y granos inmaduros, en todos los sistemas gastrointestinales *in vitro*, como se puede apreciar en las Figura 19. Y por último en las Figuras 14, 16 y 18 se puede visualizar una descripción cualitativa del perfil sensorial más general del café.

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

2.7.1 Herbívoros

Figura 13. Puntaje de los atributos organolépticos del café procesado en el sistema gastrointestinal in vitro herbívoro. El puntaje se representa en una escala del 1 al 10, en donde 1 es deficiente y 10 excelente.

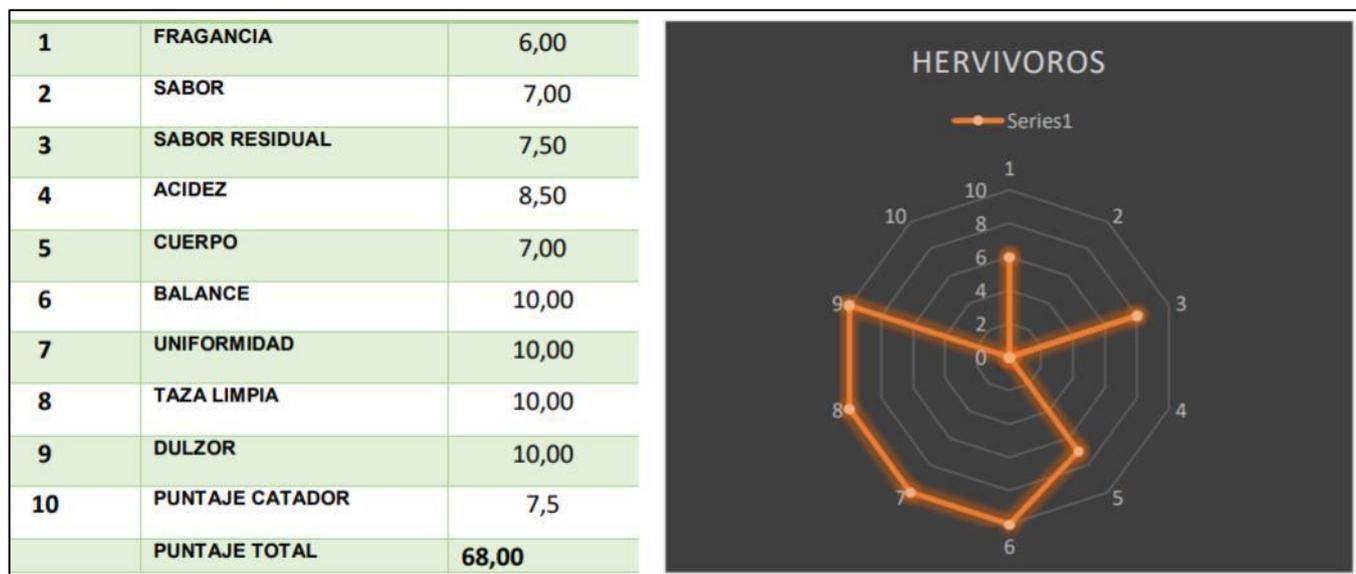


Figura 14. Perfil sensorial general del café procesado en el sistema gastrointestinal in vitro herbívoro, presentado de manera cualitativa.

PERFIL SENSORIAL	
Fragancia/Aroma	Aroma pasto (heces)
Sabor	Dulce con notas a vino blanco, uvas verdes y manzana
Dulzor	Medio y armónico
Acidez	Muy brillante y jugosa similar a un sauvignon blanc
Cuerpo	ligero
Residual	Corto seco y agrio

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

2.7.2 Omnívoros

Figura 15. Puntaje de los atributos organolépticos del café procesado en el sistema gastrointestinal in vitro omnívoro. El puntaje se representa en una escala del 1 al 10, en donde 1 es deficiente y 10 excelente.



Figura 16. Perfil sensorial general del café procesado en el sistema gastrointestinal in vitro omnívoro, presentado de manera cualitativa.

PERFIL SENSORIAL	
Fragancia/Aroma	Aroma frutos rojos y amarillos (heces)
Sabor	Dulce con notas a papaya, ciruela negra y té de piña
Dulzor	Alto y armónico
Acidez	Refrescante y jugosa
Cuerpo	Alto y cremoso
Residual	Prolongado y persistente.

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

2.7.3 Híbrido

Figura 17. Puntaje de los atributos organolépticos del café procesado en el sistema gastrointestinal in vitro híbrido. El puntaje se representa en una escala del 1 al 10, en donde 1 es deficiente y 10 excelente.

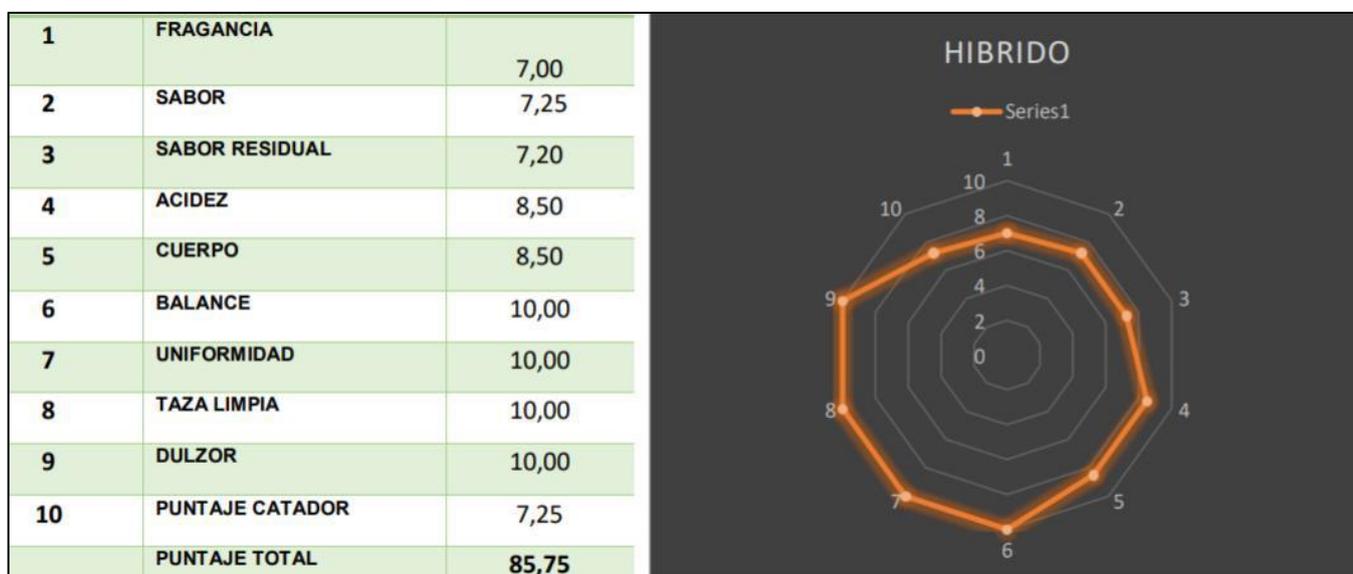


Figura 18. Perfil sensorial general del café procesado en el sistema gastrointestinal in vitro híbrido, presentado de manera cualitativa.

PERFIL SENSORIAL	
Fragancia/Aroma	Aroma frutos rojos y amarillos (heces)
Sabor	Dulce con notas a papaya, vino blanco y té de piña
Dulzor	Alto y armónico
Acidez	Refrescante y jugosa
Cuerpo	Alto y cremoso
Residual	Prolongado y persistente con acidez mineral.

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

Figura 19. Porcentaje de rendimiento de los granos de café a tostar presentados en el total de granos fermentados en los sistemas gastrointestinales *in vitro* de herbívoros, omnívoros e híbridos, donde solo un 10% presentó defectos.

DEFECTOS	
Quakers	2%
Broca	1%
Grano agrio	0
Grano negro	0
Blanqueados	%
Inmaduros	1%
caracolillos	0
% RENDIMIENTO	90%

Para determinar si los sistemas gastrointestinales *in vitro* cumplieron con su propósito, se compararon los datos obtenidos del análisis sensorial (de los cafés fermentados en sistemas *in vitro*) con datos de análisis sensorial del mismo grano de café, pero con un tratamiento fermentativo convencional como el que se maneja dentro de los procesos de la Empresa de café “Perla Negra”. Los resultados del análisis sensorial del tratamiento convencional de fermentación de café de la empresa Perla Negra se indican en las Figuras 20, 21 y 22.

También se pudo encontrar en la bibliografía un análisis sensorial de café fermentado *in vivo*, en el sistema gastrointestinal de una civeta de palma en Indonesia. Estos valores se pueden visualizar en las Figuras 23 y 24.

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

Figura 20. Puntaje de los atributos organolépticos del café procesado en el sistema convencional de fermentación de la empresa “Perla Negra”. El puntaje se representa en una escala del 1 al 10, en donde 1 es deficiente y 10 excelente.

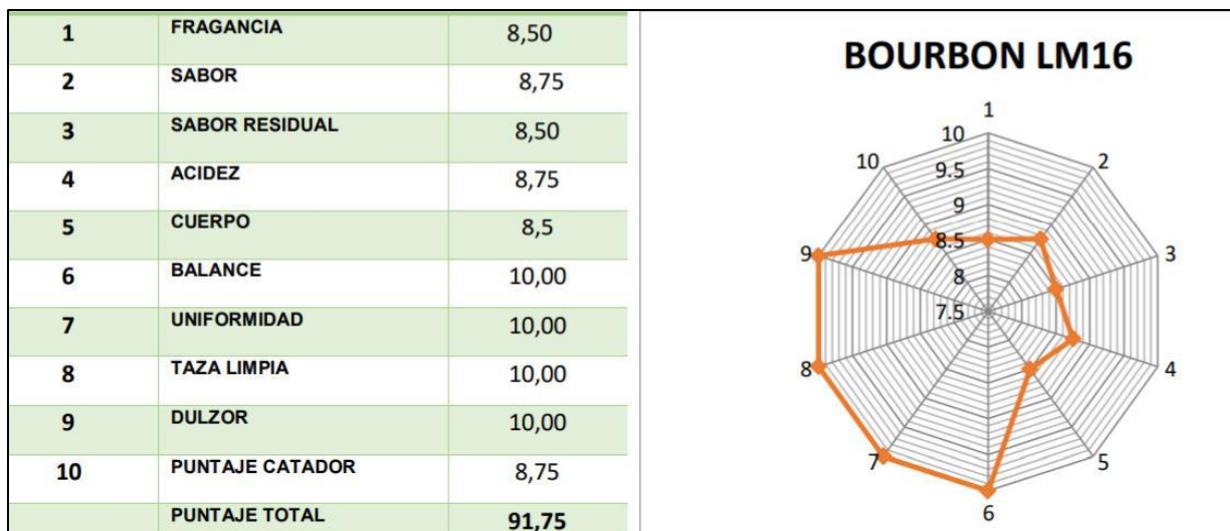


Figura 21. Perfil sensorial general del café fermentado de manera convencional por la empresa Perla Negra.

PERFIL SENSORIAL	
Fragancia/Aroma	Aroma floral y tuti fruti con notas a lirios y azahares arándano rojos, melocotón y ciruela negra
Sabor	Dulce con notas a te de piña y mermelada de frutos rojos
Dulzor	Alto y equilibrado
Acidez	Jugosa y brillante
Cuerpo	Cre moso y envolvente
Residual	Prolongado con notas a leve cardamomo y miel de cacao

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

Figura 23. Rendimiento total en cuanto a los defectos que pudiesen presentarse en el grano de café fermentado de manera convencional por la empresa “Perla Negra”.

DEFECTOS	
Quakers	2%
Broca	1%
Grano agrio	0
Grano negro	0
Blanqueados	%
Inmaduros	1%
caracolillos	0
% RENDIMIENTO	96%

Figura 22. Puntaje de atributos sensoriales medidos en tres tipos de café Kopi Luwak (café fermentado *in vivo* en el sistema gastrointestinal de la civeta de palma). Obtenido de Muzaifa et al. (2017).

Sample (location)	Fragrance	Flavour	Aftertaste	Acidity	Body	Balance	Overall
A (<i>Wih Panas</i>)	8.00	7.80	7.50	7.50	8.00	7.80	7.80
B (<i>Blang Panas</i>)	8.00	8.00	7.80	7.50	7.80	7.50	8.00
C (<i>Kenawat Redelong</i>)	7.80	7.50	7.80	7.50	8.00	8.00	7.80

Figura 24. Características aromáticas y puntaje final de tres tipos de café Kopi Luwak (café fermentado *in vivo* en el sistema gastrointestinal de la civeta de palma). Obtenido de Muzaifa et al. (2017).

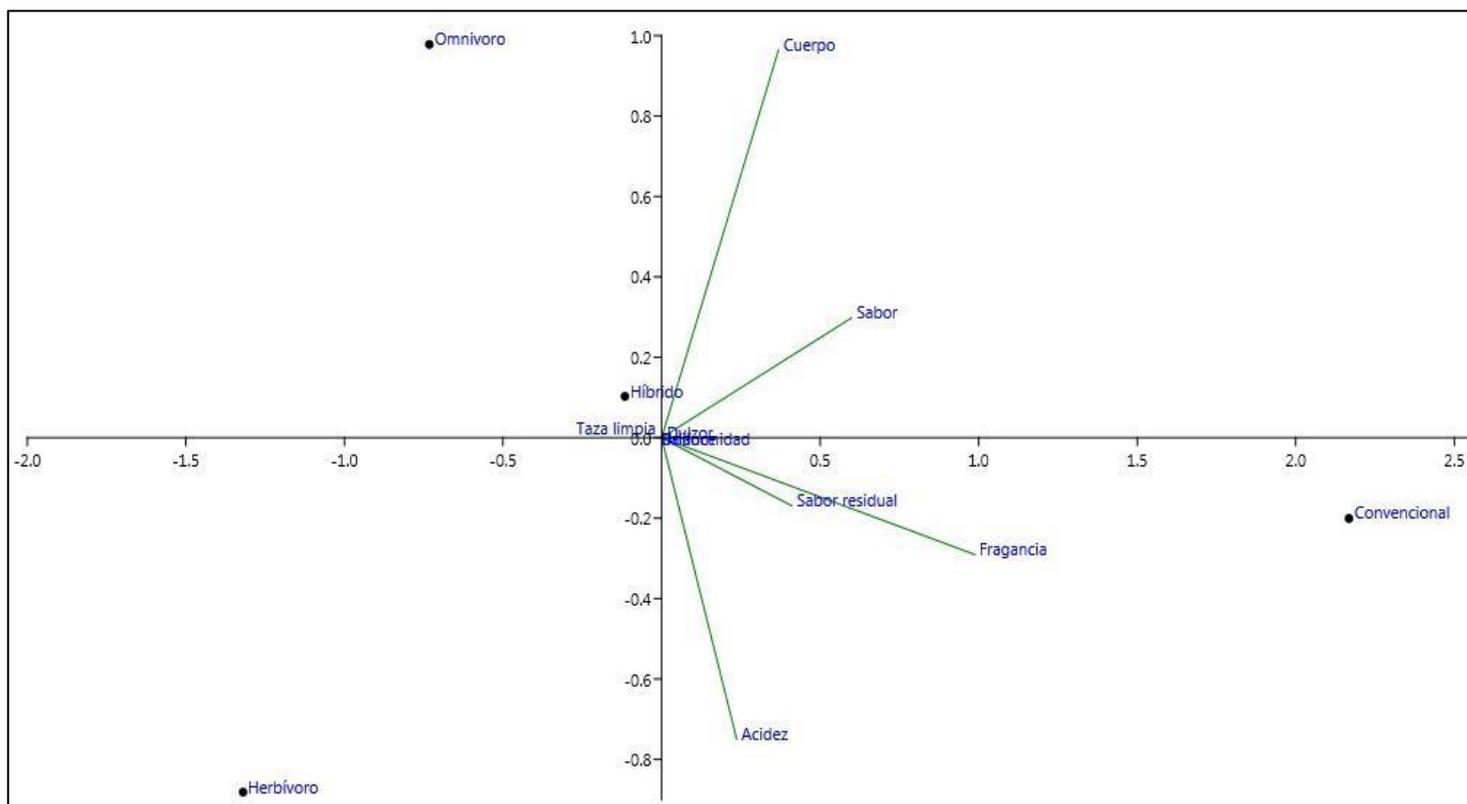
Sample (location)	Aroma remarks noted by Q-grader	Final score
A (<i>Wih Panas</i>)	Nutty, wattery, fishy, chocolaty, citrusy, slighty woody, sweet	84.00
B (<i>Blang Panas</i>)	Nutty, chocolaty, wattery, fishy, biscuity, gardenpeas, herby	84.75
C (<i>Kenawat Redelong</i>)	Nutty, aged, chocolaty, toasty, herby, fishy, slight earthy	83.75

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales que se muestra en la Figura 25, demostró que los sistemas gastrointestinales *in vitro* generaron distintos perfiles organolépticos en el café (en relación al sistema de fermentación convencional), por tanto esto permitió aceptar la hipótesis planteada en el trabajo. Adicionalmente, el análisis de componentes principales indica que también hay diferencias en perfiles organolépticos entre los sistemas gastrointestinales *in vitro* implementados. No obstante, se identifica que el perfil organoléptico del sistema gastrointestinal omnívoro es más cercano al perfil organoléptico del sistema híbrido, en relación a los perfiles organolépticos del sistema herbívoro y del sistema convencional.

Figura 25. Análisis de componentes principales en base a la información de los atributos organolépticos de los sistemas de fermentación *in vitro* implementados y evaluados en este trabajo (herbívoro, omnívoro e híbrido), y el sistema de fermentación convencional de café (utilizado por la empresa de café Perla Negra).



DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

Herbívoros

Dentro de todos los sistemas gastrointestinales *in vitro* evaluados, este fue el que menor calificación obtuvo en cuanto a sus atributos organolépticos, como se observa en la Figura 13. Se destaca un extraordinario balance, uniformidad y dulzor. El sabor, cuerpo y sabor residual se describen como muy buenas. Dentro de sus características se pudo remarcar también su muy buena calificación en acidez. Pero su valoración en fragancia es la más baja en comparación a otros rasgos, incluso a la de los otros sistemas gastrointestinales *in vitro* por su aroma pronunciado a heces.

Al comparar los perfiles sensoriales de las Figuras 13, 21 y 24, se determina que el café fermentado en el sistema gastrointestinal herbívoro *in vitro* apenas tiene similitud en el dulzor en relación con los sistemas de fermentación *in vivo* y el sistema de fermentación convencional. El resto de propiedades son características únicas del sistema herbívoro, como por ejemplo, las notas a vino blanco, uvas verdes y manzana en la fragancia o una acidez brillante y jugosa, dejando un sabor residual corto, seco y agrio.

Con una calificación final de 68/100, se llegó a la conclusión de que el sistema gastrointestinal herbívoro *in vitro* se aleja del rango aceptable de calidad en cuanto a un café procesado *in vivo* como el Kopi Luwak y un café fermentado convencionalmente y no puede considerarse como un café de especialidad.

Omnívoros

Se puede observar en la Figura 15 una calificación general de 84/100 con respecto a los atributos organolépticos de este sistema gastrointestinal *in vitro* donde destaca el balance, la uniformidad, y un dulzor extraordinario. En cuanto al sabor, la acidez y el sabor residual se puede llegar a la conclusión de que es muy bueno y que tiene un gran cuerpo. Con respecto a la fragancia el resultado es regular, presentando tintes de frutos rojos y amarillos, pero su

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

calificación se ve afectada debido a que permaneció un olor a heces en el producto final, como se detalla en la Figura 16.

El café fermentado en el sistema gastrointestinal omnívoro *in vitro* presenta mejor cuerpo y balance que los valores mostrados de un proceso fermentativo *in vivo* del Kopi Luwak, observado en la Figura 23, aunque también se encontraron valores bajos en fragancia con respecto al café tratado en el sistema gastrointestinal *in vivo* de Kopi Luwak.

Al obtener un puntaje final de 84/100 y compararlo con los valores de la Figura 20 y la Figura 23, se pudo determinar que el sistema gastrointestinal omnívoro *in vitro* se encuentra dentro un rango de calidad aceptable en relación a un sistema gastrointestinal *in vivo*. También se determinó que comparte un gran balance, uniformidad, taza limpia y dulzor un sistema de fermentación convencional.

Al superar la calificación de 80/100, se podría considerar a este café fermentado *in vitro* como un café de especialidad.

Híbrido

Este fue el sistema gastrointestinal *in vitro* que mayor calificación general obtuvo en cuanto a sus propiedades organolépticas, como se observa en la Figura 17. En comparación con los otros sistemas gastrointestinales *in vitro* éste refleja una mejor fragancia, sabor y sabor residual, conservando también su extraordinario balance, uniformidad y dulzor; además de tener buen cuerpo, mantiene la acidez característica del café fermentado en el sistema gastrointestinal herbívoro *in vitro*.

Al analizar los datos del sistema gastrointestinal *in vivo* de Kopi Luwak presentes en las Figuras 23 y 24 y compararlos con los resultados del café fermentado en el sistema gastrointestinales *in vitro* híbrido expuestos en las Figuras 17 y 18, se observa una similitud en

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

rasgos como su dulzor alto, su jugosidad y refrescancia. En cuanto a los otros atributos del perfil organoléptico del café fermentado en el sistema gastrointestinal *in vitro* híbrido, se asemejan mucho a los obtenidos en sistemas gastrointestinales *in vitro* de omnívoros.

Un rasgo característico en el perfil organoléptico del café fermentado en el sistema gastrointestinal *in vitro* híbrido fue su cremosidad.

Al comparar el sistema gastrointestinal *in vitro* híbrido con el sistema de fermentación convencional de “Perla Negra” se puede afirmar que ambos sistemas coinciden en la calificación de atributos organolépticos como la acidez, cuerpo, uniformidad, taza limpia y dulzor. En cuanto a fragancia, sabor y sabor residual, el sistema gastrointestinal *in vitro* híbrido difiere del sistema convencional.

Este sistema gastrointestinal *in vitro* obtuvo una calificación general de 85.75/100, lo que posiciona al café fermentado en este sistema como el de mejor valor en cuanto a sus atributos organolépticos en comparación con los otros sistemas gastrointestinales *in vitro* evaluados en este trabajo, incluso superando la calificación obtenida en el análisis sensorial de sistemas gastrointestinales *in vivo* mostrado en la Figura 24.

Discusión de Resultados.

Se determinó que la fermentación de café en sistemas gastrointestinales *in vitro* basados en la microbiota de animales herbívoros y omnívoros puede generar nuevos perfiles organolépticos, debido a una digestión de compuestos que se encuentran presentes en el mucílago de la pulpa de café (Fitri et al., 2019). Esta degradación permite que el café fermentado adquiera características sensoriales únicas, dependiendo del sistema de

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

fermentación que se utilice, este adquiere rasgos específicos de sabor y aroma (Wei et al., 2015).

El proceso de acidificación y una fermentación sumergida están estrechamente relacionados con la degradación de mucílago (mesocarpio) del café, al simular las condiciones naturales del estómago en un sistema gastrointestinal *in vivo* (Marcone, 2004).

Los sistemas gastrointestinales *in vitro* no alcanzaron el mismo puntaje de atributos organolépticos que los sistemas convencionales y esto se debe a que uno de los problemas más comunes de los sistemas de fermentación sumergida de café es la falta de control en el tiempo del fermentado en el sistema, lo que puede generar cambios negativos en el aroma del café. (Wei et al., 2015) Como se pudo observar en los sistemas gastrointestinales *in vivo*, el tiempo fue un factor que pudo haberse controlado con más cautela si se hubiesen realizado más pruebas, para determinar el mejor resultado de análisis sensorial en diferentes periodos de fermentación.

El sistema gastrointestinal *in vivo* híbrido obtuvo la calificación más alta de todos los sistemas gastrointestinales *in vitro* evaluados en este trabajo, adquiriendo un perfil organoléptico único y presentando rasgos sensoriales positivos que caracterizan a los sistemas herbívoros y omnívoros a la vez. Las bacterias lácticas son las preferidas para una fermentación sumergida y presumiblemente se relacionen con los atributos organolépticos que adquiere el café luego de la fermentación, como lo menciona Marcone, (2004) en su estudio.

Se sabe que la bacteria láctica *Streptococcus lutetiensis*, produce la mayor cantidad de ácido láctico en caballos y es conocida por su rápida producción de ácido en el medio haciendo que el pH baje bruscamente (Biddle et al., 2013), lo que podría explicar la acidez característica del sistema gastrointestinal *in vitro* herbívoro, la misma que se presenta en el sistema gastrointestinal *in vivo* híbrido también.

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

En varios estudios se ha demostrado que existe una menor cantidad de bacterias lácticas en herbívoros que en omnívoros, ya que ningún género de bacterias presentes en este sistema supera el 1% del total de la microbiota en animales monogástricos como el caballo (Kobayashi et al., 2020). En el caso de los omnívoros como el cerdo, la especie *Lactobacillus* está encargada de la producción de ácido láctico en el intestino grueso en asociación con *Megasphaera*, la misma que utiliza el lactato para producir butirato; ésta representa la ruta metabólica principal de digestión en animales como el cerdo, haciendo que las condiciones de fermentación sean únicas y que probablemente puedan estar relacionadas con los efectos organolépticos que el café adquiere en el proceso de digestión *in vitro* en el sistema gastrointestinal *in vitro* omnívoro y por consecuencia en la híbrido también (Kobayashi et al., 2020).

El café fermentado en los sistemas gastrointestinales omnívoros e híbridos se podría clasificar como un café de especialidad al obtener una calificación final en sus atributos organolépticos que supera la calificación mínima que necesita un café para denominarse de especialidad (80/100) (de Oliveira Junqueira et al., 2019), a excepción del café fermentado en el sistema gastrointestinal *in vitro* herbívoro. Ambos sistemas mencionados también igualan la calidad de atributos organolépticos de un café fermentado en un sistema gastrointestinal *in vivo*. (Patria, 2018)

El café fermentado en el sistema gastrointestinal *in vitro* herbívoro obtuvo la calificación más baja en cuanto a sus atributos organolépticos, aunque polisacáridos como la celulosa o hemicelulosa (presentes en el mucílago de la pulpa de café) podrían haberse digerido gracias a la actividad de enzimas microbianas, algunos compuestos no degradados y una menor cantidad de aminoácidos libres pudieron afectar los atributos organolépticos del café. (Granados-Sánchez et al., 2008) Los aminoácidos libres producto de una proteólisis digestiva

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

se hacen más propensos a participar en la reacción de Maillard, donde posteriormente adquiere propiedades organolépticas medibles en aroma y sabor. (Marcone, 2004)

Se determinó que los sistemas gastrointestinales *in vitro* implementados en este trabajo permitieron obtener nuevos perfiles organolépticos de café en relación con el obtenido por el sistema de fermentación convencional, dando como resultado una variedad de rasgos sensoriales que no se encuentran en el café “Perla Negra” ni en un sistema gastrointestinal *in vivo* como el de la civeta de Indonesia, aceptándose de esta manera la hipótesis planteada al inicio de este trabajo.

Se podría obtener un mejor resultado en cuanto a la calidad de la fermentación del café si se modifican algunos parámetros de los sistemas gastrointestinales *in vitro*, como por ejemplo usar enzimas proteolíticas específicas como la tripsina o pepsina, etc. en la fase ácida de los sistemas gastrointestinales *in vitro* (Marcone, 2004).

Estos sistemas gastrointestinales *in vitro* también podrían ser implementados en fincas cafetaleras, en donde existan mecanismos de control más minuciosos en cada fase del sistema, y una mayor capacidad de producción donde se puedan obtener lotes de café fermentado a gran escala, con rasgos organolépticos únicos a un precio de producción relativamente bajo (Wei et al., 2015). En la industria del café fermentado se sabe que este tiene un sabor superior a los fermentados en seco y con ello un precio también más elevado (Marcone, 2004).

Conclusiones.

- Se desarrollaron sistemas gastrointestinales *in vitro* basados en microbiota de herbívoros y omnívoros para fermentación de café de especialidad, aunque una combinación de ambos sistemas (sistema gastrointestinal *in vitro* híbrido) mostró un mejor resultado en cuanto a los atributos organolépticos del café.

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

- Se determina que los sistemas gastrointestinales *in vitro* en base a microbiota de omnívoros e híbridos tienen la capacidad de presentar variaciones interesantes dentro del perfil organoléptico del café tras un proceso de fermentación. Adicionalmente, se demostró que el café procesado en los sistemas gastrointestinales *in vitro* puede ser catalogado como un café de especialidad con valores muy cercanos a los de un café obtenido en condiciones convencionales de fermentación y el de un café fermentado *in vivo* en el sistema de una civeta de palma de Indonesia.

Recomendaciones.

- Se recomienda hacer una evaluación minuciosa del peso total de material a fermentar, debido a que se pierde una gran cantidad de masa luego de retirar el mucílago de la cereza del café y esto puede perjudicar al proceso en caso de llevar los granos a tostar y catar, donde es necesario cumplir un cierto peso para los análisis respectivos.
- Podrían derivarse trabajos de tesis a partir de esta investigación, como por ejemplo el estudio de la digestibilidad de diferentes tipos de alimentos en cada fase del sistema gastrointestinal *in vitro*, o a su vez analizar la actividad de la microbiota animal y la influencia de esta en alimentos con diferentes condiciones bioquímicas presentes en el metabolismo de algunos organismos. También podrían estudiarse nuevos perfiles organolépticos para otros granos utilizando estos sistemas gastrointestinales *in vitro* para mejorar la calidad un producto.

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

Bibliografía.

- Asad, S., Torabi, S. F., Fathi-Roudsari, M., Ghaemi, N., & Khajeh, K. (2011). Phosphate buffer effects on thermal stability and H₂O₂-resistance of horseradish peroxidase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48(4), 566–570.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.01.021>
- Biddle, A. S., Black, S. J., & Blanchard, J. L. (2013). An In Vitro Model of the Horse Gut Microbiome Enables Identification of Lactate-Utilizing Bacteria That Differentially Respond to Starch Induction. *PLoS ONE*, 8(10), 1–13.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077599>
- de Oliveira Junqueira, A. C., de Melo Pereira, G. V., Coral Medina, J. D., 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.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-45002-8>
- Fitri, Tawali, A. B., & Laga, A. (2019). Luwak coffee in vitro fermentation : literature review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 230(1).
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/230/1/012096>
- Granados-Sánchez, D., Ruíz-Puga, P., & Barrera-Escorcía, H. (2008). Ecología de la herbivoría. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 14(1), 51–63.
- Jurado, J. ., Montoya, E. ., Oliveros, C. ., & García, J. (2009). Método para medir el contenido de humedad del café pergamino en el secado solar del café. *Revista Cenicafé*, 60(2), 135–147. <http://infocafes.com/portal/wp-content/uploads/2015/12/Mtodo-para-medir-el-contenido-de-humedad-del-cafe-pergamino.pdf>

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

Klein, B. G. (2014). Sección III: Fisiología cardiovascular. In *Cunningham Fisiología Veterinaria*.

Kobayashi, R., Nagaoka, K., Nishimura, N., Koike, S., Takahashi, E., Niimi, K., Murase, H., Kinjo, T., Tsukahara, T., & Inoue, R. (2020). Comparison of the fecal microbiota of two monogastric herbivorous and five omnivorous mammals. *Animal Science Journal*, 91(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/asj.13366>

Lawlor, P. G., Lynch, P. B., Caffrey, P. J., & Lawlor, P. G. (2005). Peer Reviewed Pig Diets. *Canadian Journal of Animal Science*, 58(8), 447–452.

Marcone, M. F. (2004). *Composition and properties of Indonesian palm civet coffee (Kopi Luwak) and Ethiopian civet coffee*. 37, 901–912. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.05.008>

MURRAY, M. J., & GRODINSKY, C. (1989). Regional gastric pH measurement in horses and foals. *Equine Veterinary Journal*, 21(7 S), 73–76. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1989.tb05660.x>

Muzaifa, M., Hasni, D., Rahmi, F., & Syarifudin. (2019). What is kopi luwak? A literature review on production, quality and problems. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 365(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/365/1/012041>

Ordoñez, G. (2019). *Facultad Agropecuaria Y De Recursos*. November. [https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/22705/1/GABRIELA MAYTTE ORDOÑEZ ORDOÑEZ.pdf](https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/22705/1/GABRIELA%20MAYTTE%20ORDO%C3%91EZ%20ORDO%C3%91EZ.pdf)

Parajuli, P. (2011). Biogas Measurement techniques and the associated errors. *University of Jyväskylä Department Department of Biological an Environmental Science Renewable Energy Programme*.

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

Patria, A. (2018). *Physicochemical and sensory characteristics of luwak coffee from Bener*

Physicochemical and sensory characteristics of luwak coffee from Bener Meriah , Aceh-Indonesia.

Stevenson, K., Mcvey, A. F., Clark, I. B. N., Swain, P. S., & Pilizota, T. (2016). General calibration of microbial growth in microplate readers. *Nature Publishing Group, July*, 4–10. <https://doi.org/10.1038/srep38828>

Ugwu, K. C., Mbajorgu, C. C., Okonkwo, W. I., & Ani, A. O. (2018). Design, fabrication and performance evaluation of a portable hand-held refractometer. *Nigerian Journal of Technology*, 37(2), 537. <https://doi.org/10.4314/njt.v37i2.33>

Watanabe, H., Ng, C. H., Limvipuvadh, V., Suzuki, S., & Yamada, T. (2020).

Gluconobacter dominates the gut microbiome of the Asian palm civet *Paradoxurus hermaphroditus* that produces kopi luwak. *PeerJ*, 8. <https://doi.org/10.7717/peerj.9579>

Wei, L., Wai, M., Curran, P., Yu, B., & Quan, S. (2015). Coffee fermentation and flavor – An intricate and delicate relationship. *FOOD CHEMISTRY*, 185, 182–191.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.124>

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

Anexos.

ANEXO A

A1: Café listo para ser procesado en los sistemas gastrointestinales *in vitro*



DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS GASTROINTESTINALES *IN VITRO* EN BASE A MICROBIOTA DE HERBÍVOROS Y OMNÍVOROS PARA FERMENTACIÓN DE CAFÉ

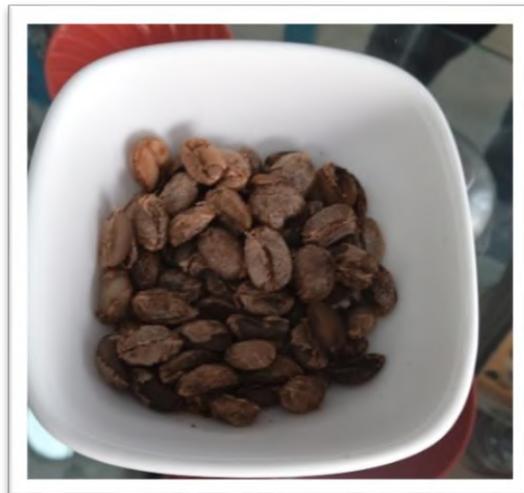
ANEXO B

B1: Proceso de extracción de mucílago de café luego de la fermentación anaerobia

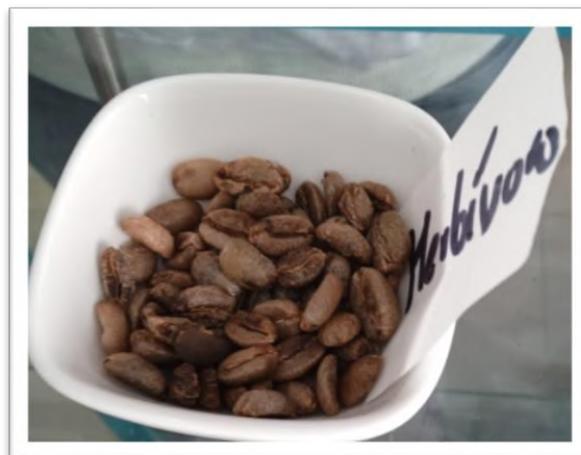


ANEXO C

C1. Grano seco de café, listo para el tueste. (Omnívoros)



C2. Grano seco de café, listo para el tueste. (Herbívoros)



C3. Grano seco de café, listo para el tueste. (Híbrido)

