



**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ  
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS PARASITOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y  
TECNOLOGÍA**

**Identificación de levaduras nativas asociadas al  
café, *Coffea arabica*, en Boquete, Panamá.**

**Evangelina López Vdovenko**

**Tesis presentada como  
uno de los requisitos para  
optar al grado de Maestría  
en Microbiología  
Ambiental**

**PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ  
2025**

Luis Carlos Mejía Franco, Investigador del Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología ( INDICASAT-AIP)

CERTIFICA QUE: Evangelina López Vdovenko

Ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis de Maestría, con el título: Identificación de levaduras nativas asociadas al café, *Coffea arabica*, en Boquete, Panamá.

Revisado este trabajo, autorizan su presentación para ser juzgado, y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Panamá el 22 de mayo de 2025.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi coordinador de maestría, el Dr. Alex Martínez, por brindarme la oportunidad de alcanzar un nuevo logro en mi vida profesional.

Agradezco profundamente al Dr. Luis Carlos Mejía por su invaluable paciencia, orientación y constante apoyo durante el desarrollo de este trabajo de investigación, el cual inició desde cero dentro de su laboratorio. Su guía fue esencial en cada etapa del proceso.

A mis colegas, Indira Quintero e Hilda Castillo, por su apoyo incondicional y por estar siempre presentes con palabras de aliento que me motivaron a continuar.

Extiendo un agradecimiento especial al laboratorio de Biología Molecular Naos del Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales, en particular a la Dra. Kristin Saltonstall y a la Ing. Eyda Gómez, por abrirme un espacio cuando más se necesitaba y brindarme su apoyo de forma generosa.

Finalmente, a mis compañeros de maestría, con quienes compartí aprendizajes y momentos memorables que llevaré siempre conmigo.

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mi mamá, papá y hermano, pilares de amor y fortaleza en cada paso de este camino.

A mi abuela, cuya sonrisa, incluso en la distancia y ante la adversidad, me ha enseñado el verdadero significado de la resiliencia.

Y a mí misma, por no rendirme, por levantarme una y otra vez, y por seguir adelante con determinación

## ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	3
DEDICATORIA .....	4
ÍNDICE DE CONTENIDO .....	5
ÍNDICE DE FIGURAS .....	7
ABSTRACT .....	11
INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 Planteamiento del problema.....	13
1.2 Justificación .....	15
OBJETIVOS .....	16
Objetivo general.....	16
Objetivos específicos .....	16
HIPÓTESIS .....	16
ANTECEDENTES .....	17
3.1 Características botánicas del cafeto .....	18
3.2 Variedades de <i>Coffea arabica</i> .....	19
3.3 Anatomía de la fruta del café .....	19
3.4 Procesos de cosecha y post cosecha de café.....	21
3.4.1 Beneficio húmedo.....	21
3.5 Microorganismos en la fermentación del café .....	23
3.5.1 Levaduras.....	23
3.5.2 Hongos filamentosos.....	25
3.6 Identificación taxonómica molecular de levaduras .....	26
MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
4.1 Muestreo y procesamiento de cerezas de café .....	30
4.2 Aislamiento de levaduras a partir de cerezas de café y procesos .....	31
4.3 Identificación molecular de aislamientos de levaduras.....	32
4.4 Análisis de la comunidad fúngica asociada a las cerezas de café y sus procesos mediante metabarcoding.....	33

4.5 Análisis de secuencias de ADN .....	35
RESULTADOS .....	37
5.1 Aislamiento e identificación de levaduras. ....	38
5.2 Metabarcoding de la comunidad fúngica asociada a las cerezas de café y sus .....	39
procesos. ....	39
DISCUSIÓN.....	45
CONCLUSIÓN.....	49
BIBLIOGRAFÍA.....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de una fruta y grano de café. ....	19
<b>Figura 2.</b> Esquema modificado de las regiones ITS y D1/D2 en genes ribosomales de hongos. ....	28
<b>Figura 3 .</b> Procesos de fermentación evaluados en finca. ....	30
<b>Figura 4.</b> Microscopia y apariencia macroscópica de aislados de levaduras identificadas en cereza de cafes y procesos de fermentación. ....	40
<b>Figura 5.</b> Distribución de hongos y levaduras en cereza y procesos de fermentación. ....	44
<b>Tabla 1.</b> Descripción de aislados de levaduras .....	41
<b>Tabla 2.</b> Identificación taxonómica de levaduras aisladas en frutos y procesos. ....	42
<b>Tabla 3.</b> Especies de levaduras encontradas en cerezas de café y procesos .....	43
<b>Tabla 4.</b> Clasificación de levaduras por familia en cerezas de café y procesos de fermentación. ....	43

## RESUMEN

Los granos de café para consumo requieren procesos post-cosecha, algunos de los cuales implican fermentación. No obstante, históricamente la fermentación del café se ha llevado a cabo con poco conocimiento sobre la taxonomía de los microorganismos involucrados. El objetivo de este trabajo fue identificar levaduras nativas a partir de frutos maduros y procesos de café, *Coffea arabica*, en la localidad de Boquete, Panamá. Se realizó recolección de muestras de frutos de café completamente maduros a partir de un total de tres variedades de *C. arabica*: Caturra, Geisha y Catuai. Adicionalmente, en una de las fincas se identificaron levaduras al final de tres procesos de fermentación: café lavado, fermentación anaeróbica seca, y fermentación en un biorreactor. Se hicieron aislamientos de levaduras a partir de diluciones seriadas de las muestras sembradas en medio YEPG. Se realizó una caracterización morfológica de cada aislado basada en microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC) y las características de crecimiento de las colonias. A cada aislamiento de levadura se le realizó amplificación y secuenciación del locus ITS para identificación molecular a través de la comparación de secuencias contra cepas tipo en la base de datos Genbank®. Adicionalmente, a las muestras de frutos recién cosechados y del final de los procesos de fermentación se les hizo análisis de “metabarcoding” para identificar las levaduras y hongos filamentosos presentes por este método independiente de cultivo. Se obtuvieron treinta y un aislamientos de levaduras, los cuales fueron identificados de pertenecer a ocho géneros: *Candida*, *Hanseniaspora*, *Papiliotrema*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Starmerella*, *Saccharomyces*, y *Wickerhamomyces*. De estos géneros, *Wickerhamomyces* se aisló de los tres procesos evaluados, mientras que *Pichia* y *Hanseniaspora* se aislaron solo de la fermentación en saco y en biorreactor. El análisis de metabarcoding de frutos maduros y procesos de fermentación resultó en la identificación de los géneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, como los hongos filamentosos más dominantes mientras que levaduras de los géneros *Papiliotrema*, *Wickerhamomyces*, *Starmerella* fueron detectadas dentro de los 20 géneros más

abundantes. Este trabajo contribuye al uso potencial de levaduras nativas aisladas en procesos de fermentación del café.

## ABSTRACT

Coffee beans intended for consumption require post-harvest processing, some of which involve fermentation. However, historically, coffee fermentation has been carried out with limited knowledge of the taxonomy of the microorganisms involved. The objective of this study was to identify native yeasts from ripe fruits and coffee processing, *Coffea arabica*, in the Boquete region of Panama. Samples were collected from fully ripe coffee fruits belonging to three *C. arabica* varieties: Caturra, Geisha, and Catuai. Additionally, in one of the farms, yeasts were identified at the end of three fermentation processes: washed coffee, dry anaerobic fermentation, and fermentation in a bioreactor. Yeast isolations were performed using serial dilutions of the samples plated on YEPG medium. Morphological characterization of each isolate was conducted using differential interference contrast (DIC) microscopy and colony growth characteristics. Each yeast isolate underwent amplification and sequencing of the ITS locus for molecular identification through sequence comparison with type strains in the GenBank® database. Furthermore, metabarcoding analyses were performed on samples from freshly harvested fruits and at the end of the fermentation processes to identify yeasts and filamentous fungi using this culture-independent method. A total of thirty-one yeast isolates were obtained, which were identified as belonging to eight genera: *Candida*, *Hanseniaspora*, *Papiliotrema*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Starmerella*, *Saccharomyces*, and *Wickerhamomyces*. Among these, *Wickerhamomyces* was isolated from all three evaluated processes, while *Pichia* and *Hanseniaspora* were isolated only from the bag fermentation and bioreactor processes. The metabarcoding analysis of ripe fruits and fermentation processes resulted in the identification of *Fusarium*, *Penicillium*, and *Cladosporium* as the most dominant filamentous fungi, while yeasts from the genera *Papiliotrema*, *Wickerhamomyces*, and *Starmerella* were among the twenty most abundant genera detected. This study contributes to the potential use of native yeasts isolated from coffee fermentation processes.

# INTRODUCCIÓN

## **1.1 Planteamiento del problema**

La fermentación del café es un proceso biológico complejo en el que intervienen diversas comunidades microbianas, incluyendo levaduras y hongos filamentosos, cuya actividad metabólica influye en el perfil sensorial del café. Sin embargo, la comprensión de la microbiota asociada a este proceso aún es limitada, especialmente en lo que respecta a la identidad taxonómica y diversidad de levaduras presentes en diferentes variedades de café y en distintos métodos de fermentación.

Los estudios sobre la microbiota del café suelen centrarse en la identificación de microorganismos mediante aislamiento y cultivo, lo que limita la detección de especies que no crecen en condiciones de laboratorio. Aunque el aislamiento sigue siendo una herramienta fundamental para la caracterización de levaduras, es insuficiente para describir la composición total de la comunidad microbiana. En este contexto, el uso de técnicas de ADN de nueva generación (NGS) en aplicaciones de estudios de biodiversidad, como por ejemplo metabarcoding basado en el locus ITS, permite identificar una mayor diversidad de levaduras y hongos filamentosos presentes en el fruto y durante la fermentación, proporcionando un panorama más completo de los microorganismos involucrados en estos procesos.

Además, la composición taxonómica de la microbiota puede variar según la variedad de café y el tipo de fermentación aplicada. A pesar de que algunos estudios han evaluado la influencia del procesamiento en la diversidad microbiana, hay poca información sobre cómo estas comunidades cambian en función de la variedad del café y del método de fermentación empleado. Esto es relevante porque ciertos microorganismos pueden persistir a lo largo del proceso, mientras que otros aparecen o desaparecen dependiendo de las condiciones del ambiente fermentativo.

Este estudio se enfocó en identificar la diversidad de levaduras presentes en diferentes variedades de café, *Coffea arabica*, mediante el aislamiento y su caracterización morfológica, así como a través del uso de la técnica de metabarcoding del locus ITS2, a partir de muestras de frutos maduros recién cosechados y al final de tres procesos de fermentación. Este trabajo generó información sobre qué especies de levaduras y hongos filamentosos ocurren en frutos maduros y diferentes procesos de *Coffea arabica* en Boquete, Panamá. La información generada contribuye a la generación de estrategias para la optimización del proceso fermentativo del café.

## 1.2 Justificación

El proceso de fermentación es un paso crítico en la postcosecha del café, ya que influye significativamente a la generación de compuestos aromáticos y a la calidad del café. En Panamá se existe poca documentación sobre la diversidad de levaduras presente durante la fermentación del café. En particular se han utilizado metodologías tradicionales como el cultivo y morfotipado, que permite una identificación preliminar de las levaduras involucradas en el proceso. Sin embargo, este enfoque presenta limitaciones, ya que la identificación basada en características morfológicas no permite una identificación precisa a rango de especie ni la detección de microorganismos no cultivables.

En este contexto, el presente estudio busca superar estas limitaciones mediante el uso de herramientas moleculares como la secuenciación de ITS para la identificación precisa de levaduras y el análisis de metabarcoding para caracterizar la comunidad de hongos y levaduras presentes en el fruto y procesos de fermentación. La aplicación de estas técnicas permitirá una identificación taxonómica más precisa y una comprensión más profunda de la dinámica durante la fermentación del café, incluyendo la presencia de especies de difícil cultivo que pueden tener un impacto en la calidad final del producto.

Además, al combinar técnicas de aislamiento microbiológico con NGS, esta investigación amplió el conocimiento sobre la diversidad de levaduras nativas asociadas a frutos de *C. arabica* en Panamá. La información generada es fundamental para identificar levaduras que podrían jugar un rol importante en la calidad y atributos sensoriales del café.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Identificar levaduras y hongos filamentosos asociados a frutos maduros y diferentes procesos de fermentación de *C. arabica* en Boquete, Panamá.

### Objetivos específicos

- Aislar e identificar levaduras a partir de frutos maduros de diferentes variedades genéticas y diferentes procesos de *C. arabica* en Boquete, Panamá.
- Implementar el uso de metabarcoding del locus ITS2 para identificar levaduras y hongos filamentosos a partir de frutos maduros de diferentes variedades genéticas y diferentes procesos de *C. arabica* en Boquete, Panamá.

## HIPÓTESIS

Existen diferentes especies de levaduras nativas asociadas a frutos maduros de *C. arabica* en Panamá y cuya abundancia relativa podría cambiar a través de procesos de fermentación.

# **ANTECEDENTES**

### 3.1 Características botánicas del cafeto

El café, una de las bebidas más consumidas a nivel mundial, proviene de las semillas de plantas del género *Coffea*, pertenecientes a la familia Rubiaceae. Este género abarca más de 100 especies de plantas, pero solo unas pocas son cultivadas comercialmente para la producción de café. Las dos especies más importantes y comercializadas a nivel global son *Coffea arabica* y *Coffea canephora* (conocida también como robusta). La planta de café es originaria de las regiones tropicales de África, teniendo *C. arabica* su origen en Etiopía y *C. canephora* en el África subsahariana central y occidental.

*Coffea arabica* es una especie alotetraploide con cuatro juegos de cromosomas, los cuales provienen de dos ancestros diploides diferentes: *C. canephora* y *C. eugenioides* (Yu et al., 2011).

Las plantas de Arabica prosperan principalmente en altitudes elevadas, entre 600 y 2000 metros sobre el nivel del mar (m.a.s.l.), y requieren condiciones climáticas específicas, como temperaturas promedio cercanas a 20°C y una cantidad considerable de precipitaciones, superiores a 1200 mm anuales, para un desarrollo óptimo (Bunn et al., 2015; De Sousa et al., 2022).

El café de la especie *C. arabica* presenta aroma y acidez pronunciadas, mientras que el café Robusta se caracteriza por tener mayor cuerpo (Kaur et al., 2018). Ambas especies difieren por sus cualidades botánicas, genéticas, agronómicas, químicas y morfológicas.

### 3.2 Variedades de *Coffea arabica*

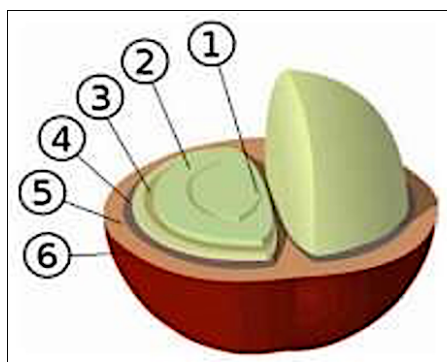
En el caso de Latinoamérica, las variedades tradicionales de arábica provienen originalmente de semillas de unas pocas plantas del centro de origen en Etiopía. Estas variedades son Típica y Bourbon, quienes dieron origen a otras por medio de mutaciones naturales o por cruzamientos espontáneos e inducidos, como Caturra, Mundo Novo, Catuaí, Pache, Villa Sarchí, Pacas, y Maragogipe (“Guía de Las Variedades de Café Guatemala,” 2019). Más recientemente se ha extendido la siembra y cosecha de variedades etíopes locales como Geisha, por la alta calidad de taza que se obtiene de esta variedad. En Panamá, esta variedad también conocida como Geisha Panamá (Catálogo de Variedades de Café de World Coffee Research), es de excepcional potencial de calidad de taza, y a partir de esta variedad se han producido en el país algunos de los cafés de más alto valor comercial en la historia del café. Debido a esto ha surgido el interés en conocer cuáles son los factores bióticos y abióticos, además de la genética de la planta y los procesos postcosecha, que contribuyen a la calidad de café obtenida a partir de esta variedad.

### 3.3 Anatomía de la fruta del café

La fruta del cafeto también conocida como cereza de café, es de estructura compleja que y tiene un papel fundamental en la producción de café. Conocer las diferentes partes que la componen es clave para comprender su procesamiento y los productos que se obtienen de ella.

Esta fruta está formada por varias capas bien diferenciadas, cada una de las cuales influye en la composición y calidad final de los granos de café, como se muestra en la

**Error! Reference source not found..**



**Figura 1.** Esquema de una fruta y grano de café.

1. Embrión, 2. Endospermo, 3. Espermoderma, 4. Endocarpio, 5. Mesocarpio, 6. Epicarpio. Imagen tomada de Wikimedia Commons (2004).  
[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Coffee\\_Bean\\_Structure.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Coffee_Bean_Structure.png)

### Detalle del grano:

- A. Embrión: se encuentra en la parte convexa de la semilla, orientado hacia su extremo puntiagudo. Está formado por un hipocótilo y dos cotiledones, siendo la base del futuro crecimiento de la planta.
  
- B. Endospermo: constituye la semilla en sí misma y es la parte que finalmente se procesa y tuesta para obtener el café.
- C. Espermoderma: (película plateada) es una fina capa que envuelve la semilla, también conocida como integumento seminal.
- D. Endocarpio: (pergamino o cascarilla) es una cubierta dura de color crema o marrón que protege la semilla y debe ser retirada en el procesamiento del café.
- E. Mesocarpio: (mucílago o baba) tiene una textura gelatinosa y un color cremoso. Su contenido en azúcares influye en el dulzor del grano durante el proceso de fermentación.
- F. Epicarpio; (cutícula, cáscara o pulpa) es la capa externa del fruto, de color rojo o amarillo cuando madura. Es jugosa y recubre todas las demás capas de la cereza o fruta de café.

El ciclo de vida completo del cafeto va desde la germinación de la semilla, el crecimiento de la planta, la floración, la producción de frutos y la cosecha. Después de la maduración del fruto, viene la cosecha la cual es seguida de un procesamiento de las cerezas. En general, el proceso incluye despulpado, fermentación, secado, y tostado, posterior a lo cual se puede preparar la bebida. Dependiendo de la especie, la variedad, la localidad y las condiciones de cultivo, la calidad, el sabor y las propiedades del café pueden variar considerablemente. El café se ha convertido en un componente esencial de la cultura y la economía de muchos países tropicales (Castillo & Iriondo, 2022).

### **3.4 Procesos de cosecha y post cosecha de café**

La cosecha consiste en recoger frutos maduros y sanos, y a este tipo de cosecha se conoce como "cosecha selectiva". Para que se cumpla este tipo de cosecha selectiva, es importante que los cafetales estén bien podados, abonados, y limpios. Se considera que lo ideal será cosechar las frutas maduras, con no más de un 3% de granos verdes, aun sin madurar completamente; para no afectar la calidad del grano exportable y en taza (Haile & Kang, 2019b).

**Post Cosecha** La postcosecha se define como el conjunto de actividades que agregan valor a los productos mediante tareas como selección, lavado, clasificación, almacenamiento, conservación, transformación, empaque, transporte y comercialización.

En el caso del café, la postcosecha abarca los procesos de beneficio y secado, que son fundamentales para transformar la cereza de café en café pergamino, listo para su posterior procesamiento y comercialización. Para el proceso de beneficio existen dos vías principales: a) la vía húmeda y b) la vía seca. En la primera está la etapa de beneficio húmedo y seco para el café pergamino y verde, también conocido como oro lavado o suave. En la vía seca se obtiene el café bola que da como resultado al café oro natural.

#### **3.4.1 Beneficio húmedo**

El beneficio es una serie de pasos que se realizan para convertir los frutos de café en granos (de pergamino) de alta calidad física y organoléptica. Para ello el proceso del beneficio consta de las siguientes etapas:

**Despulpado.** Este procedimiento lo realiza una máquina para despulpar y separar el epicarpio y parte del mesocarpio. Se realiza usualmente el mismo día que fueron cosechados los frutos; sin pasar más de las 13 horas en promedio de su recolección, ya que el fruto cosechado inicia una degradación de los azúcares libres y se produce fermentación del fruto.

**Fermentación.** Luego del despulpado aun permanecerá una capa gelatinosa pegada en el grano llamado mucilago, para retirarla es necesario que pase el grano por un proceso de descomposición del mucilago. Mediante la fermentación que es un proceso en el cual sustancias orgánicas son transformadas a otros compuestos orgánicos mediante procesos catabólicos de oxidación, particularmente mediante microorganismos como levaduras o bacterias que transforman azúcares en otras sustancias químicas orgánicas como ácido láctico, ácido butírico y etanol (Puerta, 2010). Según Puerta, 2015, el proceso de fermentación permite dar sabor, textura, aroma y conservar la calidad de alimentos y bebidas. En la fermentación del café con mucilago las levaduras y bacterias utilizan sus enzimas para oxidar azúcares y producir ATP (Adenosín trifostato), etanol, ácido láctico, ácido acético y CO<sub>2</sub>. También durante la fermentación se degradan los lípidos del mucilago, por lo cual cambian el olor, color, la densidad, el pH, los sólidos solubles, la temperatura y la composición microbiana (Puerta, 2012). Los principales microorganismos fermentadores son las levaduras y bacterias lácticas de los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus* (Puerta, 2010). Entre las levaduras más importantes para la fermentación del mucilago de café están: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. lipolytica*, *C. parasilopsis* y *C. pintolopesii* produciendo etanol (Puerta, 2012).

**Lavado y clasificado.** El lavado se realiza para eliminar el mucilago de los granos de café, este proceso se realiza con la adición de agua limpia a los tanques o recipientes de fermentación. Es importante considerar la calidad y cantidad de agua (Puerta, 2015).

**Secado.** Esta etapa consiste en disminuir el contenido de humedad natural del café del 52% al 12% para café exportable, siendo esta etapa muy delicada en el proceso de beneficio para poder almacenar el producto y evitar proliferación de microorganismos (bacterias y hongos) que dañen el producto (Oliveros et al., 2009).

### 3.5 Microorganismos en la fermentación del café

La fermentación de las cerezas de café es un proceso dinámico en el que intervienen diversos microorganismos, cuya composición varía según el entorno, el método de procesamiento y la variedad de café utilizada. Durante el procesamiento de la fruta y la fermentación, se pueden identificar una gran diversidad de bacterias y levaduras, cuya abundancia y composición puede variar significativamente. Reis Evangelista et al. (2015) y Martínez et al. (2022), como se citó en (Rojas-Chacón et al., 2024) reportaron una alta diversidad de bacterias y levaduras presentes tanto en el fruto como durante la fermentación, variando en abundancia, especies y productos sensoriales asociados. Entre los géneros predominantes de levaduras se han reportado *Pichia*, *Klebsiella*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Meyerozyma*, y *Wickerhamomyces*, y las bacterias *Ochrobactrum*, *Chryseobacterium*, *Escherichia*, *Erwinia*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus* y *Bacillus*. Cada uno de estos microorganismos desempeña un papel clave en los cambios bioquímicos que ocurren durante la fermentación, influyendo en el perfil sensorial y en la calidad final del café (Elhalis et al., 2023; Martinez et al., 2021).

#### 3.5.1 Levaduras

Las levaduras son microorganismos eucariotas unicelulares que pertenecen al reino Fungi. Presentan una morfología variable según la especie y las condiciones ambientales. Aunque su forma característica es ovalada o esférica, algunas levaduras pueden mostrar morfologías elongadas o incluso adoptar formas filamentosas bajo ciertas condiciones, como la levadura *Candida albicans*, que puede cambiar entre formas levaduriformes y miceliales en respuesta a estímulos ambientales.

Una de las características morfológicas más distintivas de las levaduras es su capacidad para reproducirse asexualmente mediante un proceso llamado gemación, donde una célula madre genera una protuberancia que eventualmente se separa para formar una nueva célula hija. Algunas levaduras, como *Schizosaccharomyces pombe*, se reproducen mediante fisión binaria, dividiéndose

en dos células hijas de tamaño similar. Además, algunas especies pueden formar estructuras multicelulares como pseudo-hifas, cuando las células hijas no se separan completamente de la célula madre.

El estudio de la morfología de las levaduras es fundamental para su identificación y clasificación, ya que sus características estructurales pueden variar entre especies. Factores como el tamaño, la forma celular y la disposición celular juegan un papel importante en la diferenciación de géneros y especies de levaduras, lo cual es crucial en campos como la microbiología clínica, la industria alimentaria y la biotecnología.

Las levaduras pueden alternar entre la fermentación y la respiración celular, dependiendo de la disponibilidad de nutrientes, en particular la glucosa. En presencia de altas concentraciones de glucosa, las levaduras utilizan predominantemente la fermentación, que permite una rápida producción de energía incluso en condiciones aeróbicas (Guaragnella et al., 2013). Esta flexibilidad metabólica no solo es crucial para su supervivencia en condiciones ambientales variables, sino que también tiene importantes implicaciones para los procesos de fermentación industrial, como en la producción de bebidas alcohólicas y biocombustibles (Xie et al., 2022).

Las levaduras, especialmente especies como *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum* y *Pichia kudriavzevii*, desempeñan un papel fundamental en la fermentación de las cerezas de café. Su actividad enzimática facilita la degradación del mucílago, una capa viscosa que rodea los granos de café, y promueve la fermentación de los azúcares presentes en la fruta (Assayuti et al., 2022; Bae et al., 2021). A través de su metabolismo, estas levaduras generan una variedad de compuestos, como ácidos orgánicos, alcoholes y compuestos aromáticos volátiles, los cuales tienen un impacto significativo en el perfil sensorial del café (Pereira et al., 2016; Shen et al., 2023a).

Las levaduras son microorganismos que se encuentran de forma natural en la superficie de las cerezas de café, y su diversidad puede verse influenciada por factores como la variedad de café, las condiciones ambientales y el método de procesamiento. Entre las especies más comúnmente asociadas con las cerezas de café se encuentran *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum* y *Pichia kudriavzevii* (De Melo Pereira et al., 2015). Estas levaduras son conocidas por su capacidad de producir ésteres y otros compuestos volátiles que contribuyen al perfil aromático y de sabor del café (Elhalis et al., 2021; Zhao et al., 2024). Específicamente, levaduras con actividad pectinolítica, como *Wickerhamomyces anomalus*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Papiliotrema flavescens*, *Pichia kudriavzevii* y *Saccharomyces cerevisiae*, facilitan la degradación de la pectina durante la fermentación, lo que mejora la extracción de compuestos aromáticos de los granos de café (Haile & Kang, 2019a).

### **3.5.2 Hongos filamentosos**

Además del papel fundamental que desempeñan las levaduras en la fermentación del café, se ha identificado la presencia de hongos filamentosos que influyen en la dinámica de la comunidad microbiana y en la calidad del producto final. Durante este proceso, se ha reportado la presencia de diversos microorganismos que interactúan, incluyendo hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, y *Fusarium*; y bacterias ácido-lácticas y pectinolíticas. En este contexto, en estudios realizados en Norte de Santander, Colombia, se reportó una alta prevalencia de hongos filamentosos en granos de café tipo cereza, destacándose *Fusarium*, *Penicillium*, *Geotrichum*, y *Aspergillus* como los géneros predominantes. Su presencia se asoció con las condiciones fisicoquímicas propias de cada región cafetera (Salazar Téllez et al., 2022).

En particular, los hongos filamentosos aparecen en distintas etapas del procesamiento y pueden tener un impacto tanto positivo como negativo. Las especies del género *Aspergillus*, entre ellas *Aspergillus niger* y *Aspergillus ochraceus*, se aíslan con frecuencia de las cerezas de café y son conocidas por

su capacidad de producir micotoxinas, en particular ocratoxina A (OTA), la cual representa un riesgo para la salud del consumidor (Shen et al., 2023b; Teferi & Ayano, 2019). El entorno de fermentación, especialmente en los métodos de procesamiento húmedo, puede influir en el crecimiento de estos hongos. Por ejemplo, las condiciones de inmersión características de la fermentación húmeda pueden reducir la diversidad de especies fúngicas presentes, favoreciendo la predominancia de *Aspergillus* y *Penicillium* (Fernandez-Güimac et al., 2023; Shen et al., 2023b).

Aunque las especies del género *Fusarium* han sido menos estudiadas en el contexto de la fermentación del café en comparación con *Aspergillus*, también forman parte de la comunidad microbiana involucrada en este proceso. Las investigaciones sugieren que *Fusarium* puede encontrarse en las cerezas de café y afectar la dinámica de la fermentación, aunque su función específica no ha sido tan ampliamente caracterizada como la de *Aspergillus* (Silva et al., 2008).

La degradación de la pectina y otros polisacáridos es un proceso fundamental para una fermentación eficiente. En este contexto, hongos como *Aspergillus* son reconocidos por su capacidad de producir enzimas pectinasas, las cuales facilitan esta transformación (Azizah et al., 2023; Ngamnok et al., 2023).

### **3.6 Identificación taxonómica molecular de levaduras**

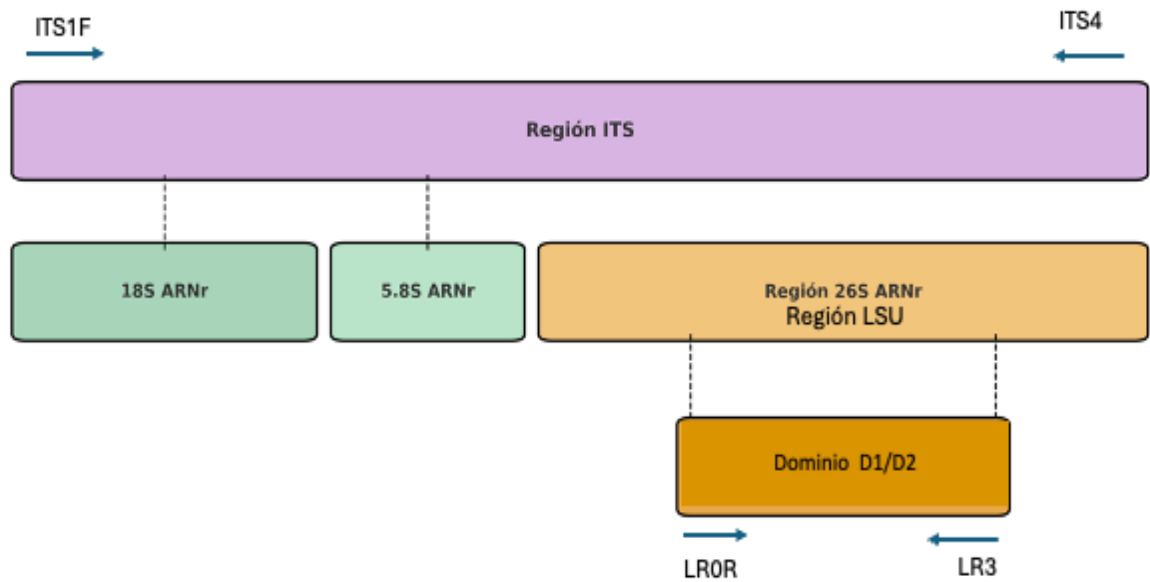
La identificación molecular de levaduras mediante la amplificación por PCR y secuenciación de loci específicos para este propósito y comparación contra bases de datos es un enfoque ampliamente utilizado en microbiología para la detección rápida y precisa de especies de levadura.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite amplificar secuencias específicas de ADN, lo que facilita la identificación a nivel genético de las levaduras en menos tiempo y con mayor precisión. Al utilizar regiones genómicas conservadas, como los espaciadores internos transcritos (ITS) o los genes ribosomales, se pueden diferenciar especies con gran exactitud.

Las secuencias que codifican diferentes ARNr se encuentran extraordinariamente conservadas entre especies e incluso entre géneros, familias y órdenes diferentes. Las regiones de DNA, entre estas secuencias codificantes, denominadas ITS (Internal Transcribed Spacers, secuencias internas transcritas) son regiones variables. Las regiones ITS (ITS1 e ITS2), que están separadas entre sí por el gen 5.8S de ADNr, presentan una alta sustitución de bases y, a menudo, se utilizan para la identificación de especies y géneros de levaduras. Sin embargo, para muchas especies, las secuencias de ITS no dan una resolución a rango de especie, por lo que se hace necesario la generación de secuencias de los dominios D1/D2 del gen que codifica para ARNr 26S (James, S.A., 1996) (Kurtzman y Robnett, 2003).

La secuenciación de la región D1/D2 para la identificación de levaduras, por ejemplo, como empleada en Peterson y Kurtzman en 1991, determinaron que el dominio 2 del ADN ribosómico (ADNr) de la subunidad grande (26S) del ribosoma es lo suficientemente variable para resolver a rango de especie (Figura 2 (Peterson, 1991). Kurtzman y Robnett (1998) ampliaron el trabajo anterior mediante la secuenciación de ambos dominios 1 y 2 (una región de aproximadamente 600 nucleótidos) del ADNr para todas las levaduras de tipo ascomiceto conocidas, proporcionando así una base de datos universalmente disponible para la rápida identificación de especies conocidas. Estas secuencias son de alto valor para la identificación de nuevas especies y su ubicación filogenética. Posteriormente, Fell et al. (2000) publicaron las secuencias D1/D2 de levaduras de tipo basidiomiceto, completando así la base de datos para todas las levaduras conocidas hasta el momento. Este es un método dependiente de cultivo ya que requiere la extracción del ADN desde un cultivo puro. Se basa en la amplificación de la región D1/D2 del gen ARN 26S y de la posterior secuenciación del amplicón resultante (Vallejo, 2013). La secuencia de D1/D2 difiere más de un 1% entre especies distintas y menos de un 1% entre cepas pertenecientes a la misma especie.

**Esquema de las regiones conservadas ITS y D1/D2 utilizadas como dianas de primers específicos**



**Figura 2.** Esquema modificado de las regiones ITS y D1/D2 en genes ribosomales de hongos.

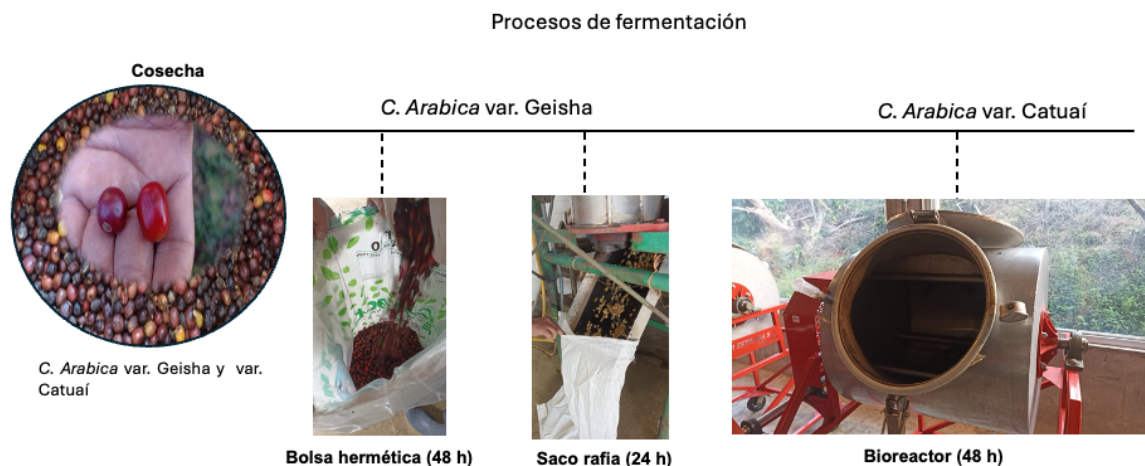
Adaptado de Barcode Biosciences. (s.f.). Microbial identification by DNA sequencing. <https://www.barcodebiosciences.com/micro.html>

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### 4.1 Muestreo y procesamiento de cerezas de café

Frutos de *C. arabica* (cerezas de café) de tres variedades (var.) fueron cosechados en tres fincas ubicadas en el distrito de Boquete, provincia de Chiriquí, Panamá. Las localidades de las fincas fueron las siguientes: Finca Santa Cecilia (8° 48' 10.4" N, 82° 24' 56.7" O), situada a 1,345 m de altitud; Finca Elida Estate (8°48'36.0"N 82°28'48.0"O), ubicada a 1,701 m de altitud; y Finca El Chalfía, localizada en Los Naranjos, distrito de Boquete (sin una georreferencia exacta disponible). Se cosecharon frutos de *C. arabica* var. Caturra en Santa Cecilia, var. Catuai en Elida Estate, y var. Geisha en El Chalfía y Elida Estate.

Las cerezas de café recién cosechadas fueron empacadas inmediatamente en bolsas plásticas Ziploc® y almacenadas en un contenedor térmico con hielo hasta su llegada al laboratorio, donde fueron utilizadas para el aislamiento de levaduras o para la extracción de ADN y metabarcoding de la comunidad fúngica. Un subconjunto de las cerezas de café cosechadas en Elida Estate fue sometido a diferentes procesos de fermentación (**Fig.3**) y muestreado al final del procesamiento, como se detalla a continuación.



**Figura 3 .** Procesos de fermentación evaluados en finca.

Las cerezas de café var. Geisha fueron utilizadas en dos procesos distintos: el primero, conocido como procesamiento lavado el cual se llevó a cabo con cerezas despulpadas utilizando una máquina despulpadora serie 1\_04 101 (J.M Estrada, Colombia) y consistió en depositar las cerezas despulpadas en saco de rafia de polipropileno y dejarlas fermentar durante 24 horas a una temperatura ambiente promedio de 25 °C. El segundo proceso fue una fermentación anaeróbica en seco, en la que las cerezas de café se colocaron dentro de bolsas herméticas Ecotact® cerradas y se dejaron fermentar durante 48 horas a temperatura ambiente promedio de 25°C.

Las cerezas de café var. Catuai fueron procesadas mediante fermentación anaeróbica en seco, en un biorreactor personalizado (J.M Estrada, Colombia) durante 72 horas. Cada proceso se llevó a cabo con 50 kg de cerezas de café. El muestreo se realizó al final de la fermentación, recolectando las muestras en tubos de centrífuga estériles de 50 ml y en bolsas Ziploc®, que fueron almacenadas inmediatamente en un contenedor térmico con hielo y transportadas al laboratorio.

#### **4.2 Aislamiento de levaduras a partir de cerezas de café y procesos**

De cada muestra, se tomaron 20 cerezas y se colocaron en un matraz Erlenmeyer con 200 ml de solución de peptona estéril (NaCl 0.8%, peptona 0.1%). La mezcla se mantuvo en agitación suave durante 20 minutos, seguida de una dilución seriada con 9 ml de solución de peptona (de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ). Se tomó un volumen de 0.1 ml de cada una de estas diluciones y se sembró en duplicado en placas de Petri (100 x 15 mm) que contenían agar YEPG (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa y 2.5% agar), suplementado con cloranfenicol (100 mg/l). La siembra se realizó con un esparcidor estéril en forma de L desechable. Las placas fueron incubadas a 30 °C durante tres días.

Se aislaron y preservaron levaduras con diferentes morfotipos en duplicado. Los aislamientos purificados se almacenaron a -80 °C en caldo YEPG con un 20%

(v/v) de glicerol. Representantes de cada morfotipo de levadura fueron analizados mediante microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC) con un microscopio Olympus BX53, fotografiados con una cámara Olympus DP73 y medidos utilizando el software Olympus CellSens Dimensions (Olympus, Japón).

#### **4.3 Identificación molecular de aislamientos de levaduras**

El ADN genómico de las levaduras aisladas se extrajo a partir de cultivos puros utilizando el kit Gentra Puregene Yeast/Bact. (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se amplificó y secuenció el locus ITS, incluyendo las regiones 1 y 2 y el gen 5.8S rDNA, utilizando los cebadores ITS1F (Gardes y Bruns, 1993) e ITS4 (White et al., 1990). Además, se amplificó la región parcial del LSU (D1/D2) del rDNA con los cebadores LR0R (Rehner & Samuels, 1994) y LR3 (Vilgalys lab).

Las amplificaciones se realizaron en reacciones de 25 µl en un termociclador (Applied Biosystems, Foster, CA) bajo las siguientes condiciones: 100 ng de ADN genómico, 400 µM de cada dNTP, 0.06 U/µl de Taq ADN polimerasa (Qiagen, Hilden, Alemania), 0.5 µM de cada cebador y el tampón 10X suministrado con 15 mM de MgCl<sub>2</sub>.

El programa de amplificación para ITS fue el siguiente:

- Desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min
- 33 ciclos de:
  - 45 s a 94 °C
  - 30 s a 55 °C
  - 90 s a 72 °C
- Extensión final de 10 min a 72 °C.

Para la amplificación de la región hipervariable del LSU, se utilizó una temperatura de alineamiento de 58 °C.

Los productos amplificados se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% en tampón 1X TAE (Tris, ácido acético y Na<sub>2</sub>-EDTA). Los geles fueron teñidos con RedGel® y las bandas se observaron y fotografiaron bajo luz UV. El tamaño de los fragmentos se estimó mediante comparación con estándares de ADN (100-bp DNA Ladder y 1kb DNA Ladder, Promega, Madison, WI, EE.UU.).

Los productos de PCR fueron enviados a Macrogen (Corea del Sur) para ser secuenciados. La secuenciación fue realizada mediante la técnica de Sanger, utilizando un secuenciador automático modelo Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer, basado en electroforesis capilar.

La reacción de secuenciación se efectuó en ambas direcciones (sentidos 5'–3' y 3'–5'), empleando los mismos cebadores utilizados en la amplificación por PCR. Los fragmentos fueron enviados sin purificar, según los requerimientos del servicio estándar de Macrogen.

#### **4.4 Análisis de la comunidad fúngica asociada a las cerezas de café y sus procesos mediante metabarcoding**

Se utilizó 1 mL de la solución de peptona que contenía la comunidad fúngica liberada de las cerezas de café para la extracción total de ADN, tanto de cerezas recién cosechadas antes de cualquier procesamiento como de cerezas al final de cada proceso evaluado. Cada muestra se centrifugó a 12,000 rcf durante 1 minuto. El ADN del precipitado se extrajo utilizando el PowerPlant Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante, con una elución final de 50 µL. El ADN extraído se cuantificó con un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.).

Para estudiar la diversidad y composición taxonómica de la comunidad fúngica de las cerezas de café, se utilizó un método de PCR en dos etapas para preparar las muestras para secuenciación masiva de amplicones. La primera PCR se realizó en triplicado para cada muestra, amplificando la región ITS2 con los cebadores específicos fITS7 (Ihrmark et al., 2012) e ITS4 (White et al., 1990), que incluían adaptadores para lecturas de Illumina. Cada PCR se llevó a cabo utilizando la enzima del kit KAPA3G Plant PCR (Kapa Biosystems, Ciudad del Cabo, Sudáfrica) bajo las siguientes condiciones:

- Desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos
- 32 ciclos de:
  - 20 s a 95 °C
  - 15 s a 55 °C
  - 25 s a 72 °C
- Extensión final de 1 minuto a 72 °C.

Los triplicados de cada muestra se combinaron para realizar una segunda PCR, en la que se usaron 2 µL de cada mezcla para agregar adaptadores de celda de flujo de Illumina y códigos de barras de identificación de muestras. Posteriormente, 5 µL de cada amplicón de la segunda PCR se combinaron en un microtubo de 1.5 mL y se purificaron utilizando perlas paramagnéticas AMPure XP (Beckman Coulter, Indianápolis, IN, EE.UU.). El control de calidad final de la biblioteca de amplicones se realizó con un Agilent TapeStation usando el ensayo D1000 DNA Screen Tape (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.). Finalmente, la secuenciación se realizó en formato de finales pareados de 2 × 300 bp utilizando un secuenciador Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EE.UU.), disponible en el Laboratorio de Genómica del Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología de Panamá (INDICASAT, Ciudad del Saber, Panamá).

#### **4.5 Análisis de secuencias de ADN**

Las secuencias completas de ITS obtenidas de cultivos puros fueron editadas utilizando Sequencher® DNA sequence analysis software versión 5.4.6 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, EE.UU.) y comparadas con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank utilizando la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, National Center for Biotechnology Information, MD, EE.UU.) Se consideró una identidad de secuencia del 99% o mayor con material tipo de GenBank como criterio suficiente para identificación taxonómica a rango de especie.

Los datos de secuenciación masiva fueron analizados utilizando el programa QIIME2 versión 2023.2 (Caporaso et al., 2010). Las secuencias generadas se procesaron siguiendo el protocolo de análisis DADA2 (Callahan et al., 2016) implementado en QIIME2. El control de calidad incluyó la eliminación de bases de baja calidad y adaptadores de secuenciación mediante denoise-single con parámetros predeterminados, los cuales realizaron el recorte de lecturas. Las secuencias identificadas como quimeras fueron filtradas utilizando el método de verificación de quimeras por consenso en DADA2.

Tras la eliminación de ruido, se aplicó un filtrado para remover variantes de secuencias de amplicones (ASVs, posibles especies) de baja abundancia, reteniendo solo aquellas con una frecuencia mínima de 10 lecturas en todas las muestras. La clasificación taxonómica de los ASVs se realizó utilizando la base de datos UNITE (versión UNITE-ver9-99-classifier-25.07.2023). El clasificador fue entrenado con el método Naïve Bayes implementado en el complemento feature-classifier-classify-sklearn de QIIME2. Se eliminaron del conjunto de datos las secuencias clasificadas como “No asignadas” o aquellas que no pertenecían a hongos antes de continuar con los análisis.

La tabla final de ASVs y las asignaciones taxonómicas fueron visualizadas mediante gráficos de barras generados en QIIME2. Posteriormente, se

generaron tablas de abundancia relativa, las cuales fueron exportadas para análisis adicionales. La visualización de los datos se realizó en R versión 4.3.1 (2023-06-16) utilizando los paquetes ggplot2, dplyr y RColorBrewer.

# RESULTADOS

### 5.1 Aislamiento e identificación de levaduras.

Se aislaron un total de 31 cepas de levaduras, cuya identificación taxonómica se realizó mediante la amplificación y secuenciación del locus ITS y parte de la región LSU (D1/D2). La identificación de cada cepa, junto con su origen (ya sea de muestras de fruto o del proceso de fermentación), se presenta en la **Tabla 1**.

El análisis taxonómico reveló la presencia de ocho géneros distintos de levaduras, distribuidos en 8 familias (**Tabla 2**). De estas, solo una cepa pertenece al grupo de levaduras del género *Saccharomyces* (**Tabla 3**). Los otros géneros de levaduras encontrados fueron: *Candida*, *Hanseniaspora*, *Papiliotrema*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Starmerella*, y *Wickerhamomyces*.

Posteriormente, se llevó a cabo la caracterización morfológica de cada cepa. A nivel macroscópico, las colonias fueron evaluadas en función de su color, textura y margen, identificándose diferencias que se ilustran en la **Figura 4**. Estas variaciones fenotípicas pueden estar relacionadas con la diversidad taxonómica de las cepas aisladas.

A nivel microscópico, se documentaron la forma y el tamaño celular mediante la medición del ancho x largo de células por cepa. Los valores obtenidos se resumen en la **Tabla 4**, donde se observa que la mayoría de las cepas presentaron células elipsoidales y ovaladas, aunque algunas exhibieron morfologías redondeadas. Estas diferencias pueden reflejar la variabilidad entre especies o adaptaciones específicas a su entorno de origen

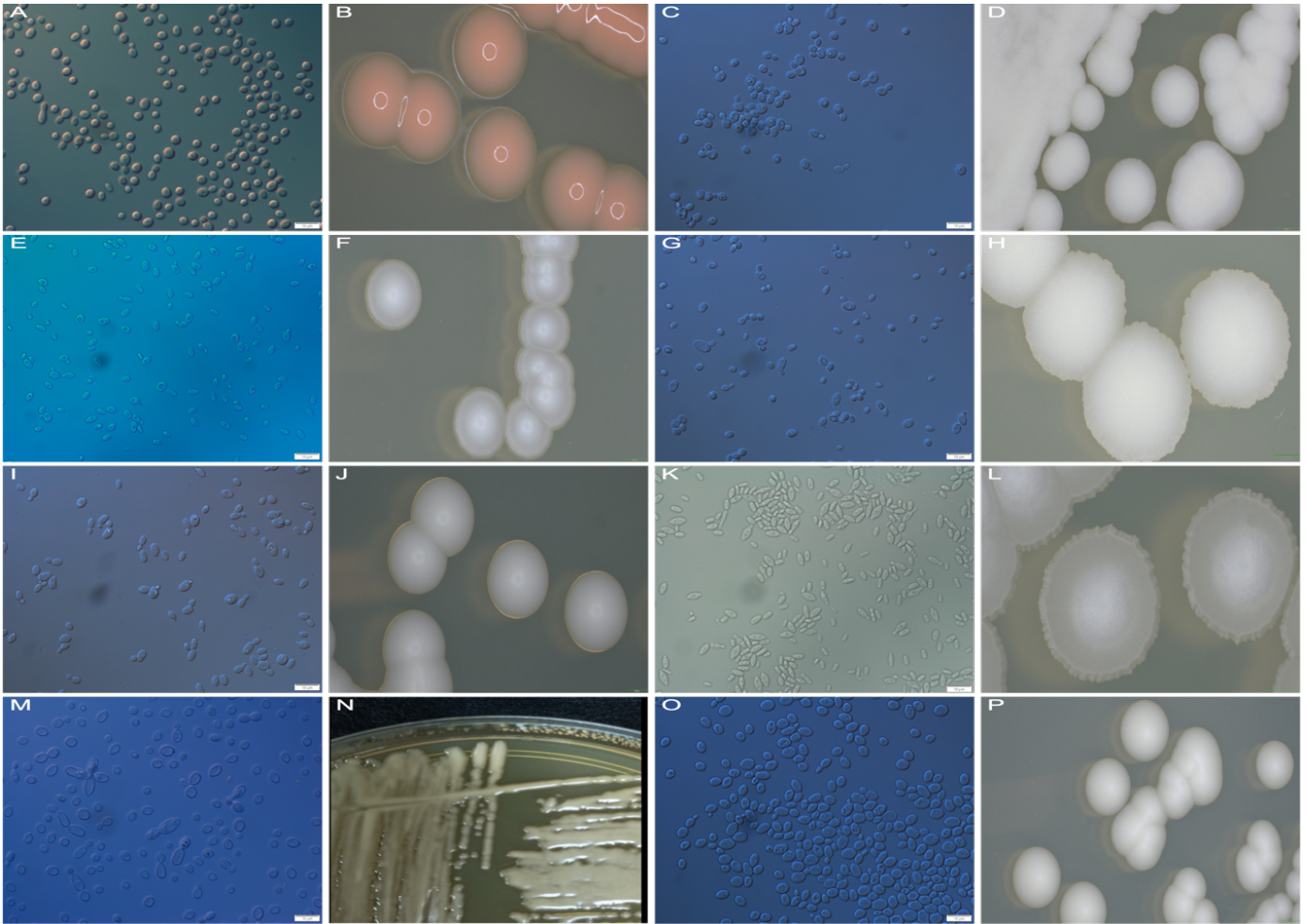
Los resultados mostraron la presencia de ocho especies distintas de levaduras. *Wickerhamomyces anomalus* fue la especie más frecuentemente aislada (32.6%), seguida de *Hanseniaspora uvarum* (25.8%) y *Pichia kluyveri* (19.3%). *Wickerhamomyces anomalus* y *H. uvarum* se encontraron en las cerezas de café y en los procesos de fermentación, mientras que *P. kluyveri* se detectó al final del procesamiento lavado y fermentación en sacos de rafia y en el biorreactor.

## 5.2 Metabarcoding de la comunidad fúngica asociada a las cerezas de café y sus procesos.

Se utilizó **metabarcoding** para estudiar la diversidad y la composición taxonómica de la comunidad fúngica asociada a las muestras de cereza de café y de los procesos, así como para evaluar su abundancia relativa. Además, buscamos detectar géneros de levaduras que no fueron aislados mediante métodos de cultivo.

La comunidad fúngica asociada a las diferentes etapas de la fermentación del café mostró perfiles distintos según la variedad de café y el método de procesamiento (**Figura 5**). Las cerezas de café recién cosechadas de todas las variedades (Catuai, Caturra y Geisha) presentaron comunidades diversas dominadas por hongos filamentosos *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Cystofilobasidium*, *Aureobasidium* y el género de levaduras *Papiliotrema*.

Se observaron cambios en la abundancia relativa de los géneros fúngicos entre las cerezas de café recién cosechadas y el final de cada proceso. La fermentación del café en biorreactores y en bolsas herméticas Ecotact® promovió la dominancia del género filamentoso fermentativo *Penicillium*, que alcanzó hasta un 50.5% al final del proceso, mientras que *Fusarium* persistió en niveles del 14%-28% en los tres procesos evaluados. Los procesos lavado y anaeróbico favorecieron el aumento en la abundancia relativa de especies adaptadas a la fermentación, incluyendo *Wickerhamomyces*, *Papiliotrema* y *Starmerella*.



**Figura 4.**Microscopia y apariencia macroscópica de aislados de levaduras identificadas en cereza de cafés y procesos de fermentación.

Las levaduras identificadas en este estudio incluyen: *Rhodotorula mucilaginosa* (A, B), *Wickerhamomyces anomalus* (C, D), *Starmerella bacillaris* (E, F), *Pichia kluyveri* (G, H), *Candida oleophila* (I, J), *Hanseniaspora opuntiae* (K, L), *Papiliotrema flavescens* (M, N) y *Saccharomyces cerevisiae* (O, P).

**Tabla 1.** Descripción de aislados de levaduras

levadura	Descripción celular		Descripción de colonia		
	forma	tamaño ( $\mu\text{m}$ )	color	textura	margin
<b>(A, B)</b> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	esféricas a elongadas	3.99 x 3.91	rosada	húmeda	liso
<b>(C, D)</b> <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	esféricas a elipsoidales	4.67 x 4.13	blanco	lisa	liso
<b>(E, F)</b> <i>Starmerella bacillaris</i>	apiculadas a ovoides	5.79 x 3.69	blanca	húmeda	liso
<b>(G, H)</b> <i>Pichia kluyveri</i>	ovoides a elipsoidales	5.75 x 3.26	blanca	lisa	irregular
<b>(I, J)</b> <i>Candida oleophila</i>	elipsoidales	5.50 x 3.21	blanca	lisa	liso
<b>(K, L)</b> <i>Hanseniaspora opuntiae</i>	apiculadas a ovoides	3.71 x 2.16	crema	lisa	irregular
<b>(M, N)</b> <i>Papiliotrema flavescens</i>	globosas a ovoides	6.17 x 8.48	crema	Húmeda a mucosa	liso
<b>(O, P)</b> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ovoides a esféricas	6.18 x 4.64	blanca	lisa	liso

Descripción después de 5 días a 28 °C en medio YEPG.

**Tabla 2.** Identificación taxonómica de levaduras aisladas en frutos y procesos.

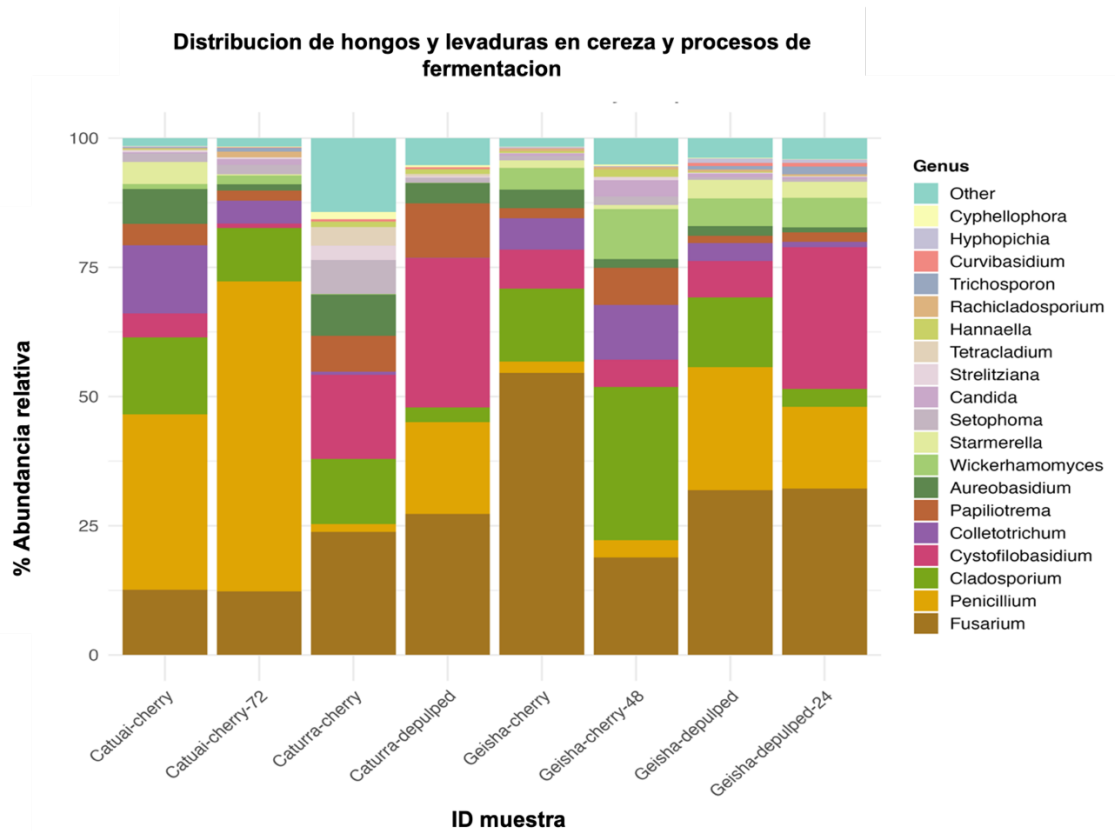
Cepa	Identificación	ITS similitud (%)	D1/D2 similitud (%)	C. arabica Variedad - proceso
LFC 01	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	100%	100%	Geisha
LFC 02	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99.67%	100%	Geisha
LFC 03	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99.46%	100%	Geisha
LFC 04	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99.80%	100%	Geisha
LFC 05	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99.48%	100%	Caturra
LFC 06	<i>Starmerella bacillaris</i>	100%	100%	Caturra
LFC 07	<i>Pichia kluyveri</i>	98.70%	100%	Caturra
LFC 08	<i>Pichia kluyveri</i>	98.90%	98%	Caturra
LFC 09	<i>Candida oleophila</i>	99.38%	100%	Caturra
LFC 10	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	99.87%	100%	Geisha
LFC 11	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99.87%	100%	Caturra -
LFC 12	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	100.00%	100%	Caturra
LFC 13	<i>Pichia kluyveri</i>	98.70%	100%	Caturra
LFC 14	<i>Papiliotrema flavescens</i>	99.81%	100%	Geisha
LFC 15	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	95.94%	100%	Geisha
LFC 17	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99.72%	100%	Geisha -
LFC 22	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99.84%	100%	Geisha - hermetic (48H)
LFC 23	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	100.00%	100%	Geisha - hermetic (48H)
LFC 35	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	100.00%	100%	Catuai
LFC 37	<i>Pichia kluyveri</i>	99.45%	100%	Catuai - reactor (27H)
LFC 38	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99.25%	100%	Catuai - reactor (27H)
LFC 39	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99.84%	100%	Catuai - reactor (27H)
LFC 40	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99.67%	100%	Catuai - reactor (27H)
LFC 42	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99.73%	100%	Catuai - reactor (27H)
LFC 43	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99.84%	100%	Catuai - reactor (27H)
LFC 44	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99.84%	100%	Catuai-reactor (27H)
LFC 45	<i>Pichia kluyveri</i>	99.78%	100%	Geisha - sack (24H)
LFC 46	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	100.00%	100%	Geisha - sack (24H)
LFC 48	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	97.59%	100%	Geisha - sack (24H)
LFC 49	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99.51%	100%	Geisha - sack (24H)
LFC 50	<i>Pichia kluyveri</i>	99.78%	100%	Geisha - sack (24H)

**Tabla 3.** Especies de levaduras encontradas en cerezas de café y procesos de fermentación.

Saccharomyces	No - Saccharomyces
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Pichia kluyveri</i>
	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
	<i>Starmerella bacillaris</i>
	<i>Candida oleophil</i>
	<i>Papiliotrema flavescens</i>

**Tabla 4.** Clasificación de levaduras por familia en cerezas de café y procesos de fermentación.

Familia	Especie	Sample ID
Saccharomycetaceae	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LFC 38
Sporidiobolaceae	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	LFC 01
Wickerhamomycetaceae	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	LFC 02, LFC 04, LFC 22, LFC 23, LFC 39, LFC 40, LFC 43, LFC 44, LFC 48, LFC 49
Saccharomycodaceae	<i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>Hanseniaspora opuntiae</i>	LFC 03, LFC 05, LFC 11, LFC 12, LFC 15, LFC 17, LFC 35, LFC 42, LFC 46, LFC 10
Pichiaceae	<i>Pichia kluyveri</i>	LFC 07, LFC 08, LFC 13, LFC 37, LFC 45, LFC 50
Debaryomycetaceae	<i>Candida oleophila</i>	LFC 09
Trichomonascaceae	<i>Starmerella bacillaris</i>	LFC 06
Rhynchogastremaceae	<i>Papiliotrema flavescens</i>	LFC 14



**Figura 5.** Distribución de hongos y levaduras en cereza y procesos de fermentación.

(<sup>1</sup> Fermentación anaeróbica en bioreactor, <sup>2</sup> fermentación anaeróbica en bolsa Ecotac, <sup>3</sup> despulpado lavado).

# DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio muestran una asociación de levaduras y hongos filamentosos con las cerezas de café y los procesos de fermentación evaluados. A través del aislamiento y la identificación molecular, se aislaron 31 cepas de levaduras las cuales fueron identificadas y caracterizadas por secuenciación del locus ITS y la región parcial LSU (D1/D2) y análisis morfológico. El uso de estas regiones ha demostrado ser eficaz para identificar y diferenciar especies cercanamente relacionadas, lo que los convierte en marcadores confiable para la delimitación de especies dentro de diversos géneros de levaduras (Kurtzman, 2007; Wang, Begerow, et al., 2015; Wang, Groenewald, et al., 2015).

Las especies dominantes de levadura aisladas de cereza y procesos fueron *Wickerhamomyces anomalus* (32.6%), *Hanseniaspora uvarum* (25.8%) y *Pichia kluyveri* (19.3%) en donde a nivel de género (*Hanseniaspora* y *Pichia*) es consistente con estudios previos que han reportado estos géneros de levaduras en sistemas de fermentación de café arábico a través de estudios de morfoespecies realizados en el área del distrito de Boquete, Chiriquí (Castillo Avilés et al., 2024) donde se reportó *Hanseniaspora* sp., y *Pichia* sp. Además de otros géneros que en nuestro registro fueron menos frecuentes (un solo aislado) como es el caso de *Rhodotorula* sp. y *Saccharomyces* sp.

Este patrón de géneros frecuentes también ha sido previamente reportado en estudios sobre fermentación de café, donde *Hanseniaspora uvarum*, también ha sido aislada en procesos de fermentación (Avallone et al., 2001) y en frutas (Arias et al., 2002; Las Heras-Vazquez et al., 2003). De igual forma se ha reportado un incremento en las poblaciones de levaduras durante la fermentación de *Coffea arabica* en Brasil (Silva et al., 2000), identificando a *Pichia kluyveri* como una levadura predominante a lo largo de todo el proceso, incluyendo la fase de secado. *Wickerhamomyces anomalus*, anteriormente clasificado como *Pichia anomala* y *Hansenula anomala*, es una levadura con una amplia diversidad de funciones ecológicas y aplicaciones en distintos procesos. Varios estudios han logrado aislar *W. anomalus* a partir del fruto del café, evidenciando su potencial como cultivo iniciador en fermentaciones controladas. En particular, la investigación de (Haile &

Kang, 2019a) destaca su participación en la degradación enzimática de la pectina, un proceso fundamental para optimizar la fermentación y mejorar la calidad sensorial del café.

En cuanto a nuestro análisis de la comunidad fúngica a través de metabarcoding tenemos que las cerezas de café recién cosechadas albergan comunidades fúngicas diversas, cuya composición varía entre las variedades analizadas: Catuai, Caturra y Geisha. Este estudio evidencia que las comunidades fúngicas asociadas a las cerezas de café y a los procesos evaluados están dominadas por hongos filamentosos de los géneros *Fusarium*, *Penicillium* y *Cladosporium*. Estos hongos suelen encontrarse en la superficie de las cerezas de café y desempeñan un papel clave en las fases iniciales del proceso de fermentación. Su alta presencia, especialmente la de hongos filamentosos, puede estar influenciada por el entorno de fermentación, en particular en los métodos de procesamiento húmedo, donde las condiciones favorecen su crecimiento. Por ejemplo, la inmersión característica de la fermentación húmeda puede reducir la diversidad de especies fúngicas presentes, lo que facilita la predominancia de géneros como *Aspergillus* y *Penicillium* (Fernandez-Güimac et al., 2023; Shen et al., 2023b).

Además de estos géneros dominantes, otros géneros relativamente abundantes identificados en este estudio, como *Cystofilobasidium*, *Aureobasidium* y *Papiliotrema*, contribuyen a la diversidad microbiana general y podrían influir en el proceso de fermentación mediante la producción de metabolitos que afectan el sabor y aroma del café (M. Muynarsk et al., 2019; Oktaviani et al., 2020).

El proceso lavado y los procesos anaeróbicos evaluados en este estudio favorecieron la proliferación de géneros adaptados a ambientes fermentativos, como *Wickerhamomyces*, *Papiliotrema* y *Starmerella*. Estos géneros son conocidos por su capacidad para generar compuestos volátiles que realzan las características sensoriales del café, especialmente su sabor y aroma (Galarza & Figueroa, 2022; Koskei et al., 2015).

Durante la fermentación de las cerezas de café, la composición microbiana experimenta cambios significativos. Las comunidades diversas presentes en las cerezas frescas son gradualmente reemplazadas por una microbiota más especializada y adaptada al ambiente fermentativo. Esta transformación está influenciada por factores como el método de procesamiento seleccionado y las condiciones específicas en las que se lleva a cabo la fermentación (de Pereira et al., 2015; Waters et al., 2015).

Las 31 cepas de levaduras identificadas en este estudio fueron preservadas y constituyen un recurso genético disponible a productores y la industria del café y que puede ser utilizado para llevar a cabo procesos de fermentación controlada en la cual estas sean empleadas para determinar cómo pueden afectar la calidad del café. En particular levaduras de géneros y especies conocidas por atributos que sean de interés para el productor o para algún proceso de café en particular. Los resultados de este trabajo abren el camino a posibilidades biotecnológicas que favorezcan los procesos de café en Panamá y utilizando levaduras nativas adaptadas a las condiciones del país y no importadas de otros ambientes o sustratos. Este trabajo contribuyó a la identificación de factores bióticos (comunidades fúngicas de levaduras y hongos filamentosos) que podrían ser relevantes para comprender el éxito de los cafés especiales de Panamá y contribuir con la consistencia de buenos resultados y sostenibilidad de la caficultura nacional.

# CONCLUSIÓN

- Los resultados de este estudio evidencian que las comunidades fúngicas asociadas a las cerezas de café y sus procesos de fermentación están conformadas tanto por levaduras como por hongos filamentosos, cuya composición varía según el método de procesamiento y la variedad del café. A través del aislamiento y la identificación molecular, se logró detectar una diversidad de levaduras, predominando *Wickerhamomyces anomalus*, *Hanseniaspora uvarum* y *Pichia kluyveri*. La presencia de estos géneros es consistente con estudios previos sobre fermentación de café, lo que refuerza su importancia en el proceso fermentativo.
- El análisis de comunidades fúngicas mediante secuenciación masiva de ITS2 (metabarcoding) confirmó que las cerezas de café albergan hongos filamentosos dominantes, como *Fusarium*, *Penicillium* y *Cladosporium*, los cuales desempeñan un papel clave en las primeras fases de la fermentación. Su abundancia puede estar influenciada por el método de procesamiento, particularmente en la fermentación húmeda, donde las condiciones de inmersión pueden favorecer la predominancia de ciertos géneros fúngicos. Además, se identificaron otros géneros relativamente abundantes, como *Cystofilobasidium*, *Aureobasidium* y *Papiliotrema*, que contribuyen a la diversidad microbiana del proceso.
- Por otro lado, los procesos evaluados, especialmente el lavado y la fermentación anaeróbica, promovieron el crecimiento de levaduras adaptadas a ambientes fermentativos, como *Wickerhamomyces*, *Papiliotrema* y *Starmerella*. Estas levaduras han sido previamente descritas como relevantes en la fermentación del café debido a su capacidad para degradar el mucílago y facilitar el desarrollo del proceso fermentativo.

# **RECOMENDACIONES**

Los resultados obtenidos proporcionan información de línea base sobre levaduras nativas presentes en la fermentación del café. Las levaduras aquí identificadas y preservadas representan un recurso genético disponible para realizar estudios adicionales o para evaluar la actividad enzimática y el potencial metabólico de las cepas aisladas, con el fin de comprender mejor su impacto en la fermentación y en la calidad final del café. Asimismo, futuras investigaciones con un mayor número de muestras permitirán obtener resultados más robustos, contribuyendo al desarrollo de estrategias que optimicen los procesos fermentativos y potencien la aplicación de levaduras nativas en la producción de cafés de especialidad.

# **BIBLIOGRAFÍA**

- Arias, C. R., Burns, J. K., Friedrich, L. M., Goodrich, R. M., & Parish, M. E. (2002). Yeast Species Associated with Orange Juice: Evaluation of Different Identification Methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1955–1961. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1955-1961.2002>
- Assayuti, M., Fadhil, R., & Erika, C. (2022). Effect of Fermentation with The Addition of Yeast Tape on The Sensory Quality of Gayo Arabica Coffee. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1116(1), 012022. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1116/1/012022>
- Avallone, S., Guyot, B., Brillouet, J.-M., Olguin, E., & Guiraud, J.-P. (2001). Microbiological and Biochemical Study of Coffee Fermentation. *Current Microbiology*, 42(4), 252–256. <https://doi.org/10.1007/s002840110213>
- Azizah, Hidayah, A. A., Amelia, R., Wiyono, H. T., Siswoyo, & Muzakhar, K. (2023). Pectinase Production of *Aspergillus* sp. VTM5 Through Solid State Fermentation Using Coffee Pulp Substrate and Its Purification. In A. Lelono, M. Akbar Bahar, S. Wathon, K. Senjarini, A. Ginanjar Arip, R. Putrasetya, B. Andika, & N. Ayu Sukma (Eds.), *Proceedings of the 4th International Conference on Life Sciences and Biotechnology (ICOLIB 2021)* (pp. 492–500). Atlantis Press International BV. [https://doi.org/10.2991/978-94-6463-062-6\\_50](https://doi.org/10.2991/978-94-6463-062-6_50)
- Bae, H. M., Haile, M., & Kang, W. H. (2021). Evaluation of Antioxidant, Organic Acid, and Volatile Compounds in Coffee Pulp Wine Fermented With Native Yeasts Isolated From Coffee Cherries. *Food Science and Technology International*. <https://doi.org/10.1177/10820132211051874>

- Bunn, C., Läderach, P., Pérez Jimenez, J. G., Montagnon, C., & Schilling, T. (2015). Multiclass Classification of Agro-Ecological Zones for Arabica Coffee: An Improved Understanding of the Impacts of Climate Change. *PLOS ONE*, *10*(10), e0140490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140490>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, *13*(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Peña, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., ... Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, *7*(5), 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- Castillo Avilés, G. A., Hofmann, T. A., & Cardona, J. (2024). Identificación de levaduras nativas en café Geisha (*Coffea arabica*) y su efecto como cultivo iniciador en las características sensoriales y químicas de café lavado. *Ceiba*, *57*(1), 29–50. <https://doi.org/10.5377/ceiba.v57i1.18140>
- Castillo, M. D. del, & Iriando, A. (2022). *El café*. CSIC.
- De Melo Pereira, G. V., Neto, E., Socol, V. T., Medeiros, A. B. P., Woiciechowski, A. L., & Socol, C. R. (2015). Conducting starter culture-controlled fermentations of coffee beans during on-farm wet processing: Growth, metabolic analyses and sensorial effects. *Food Research International*, *75*, 348–356. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.027>

- de Pereira, G. V., Soccol, V. T., Brar, S. K., Neto, E., & Soccol, C. R. (2015). Microbial Ecology and Starter Culture Technology in Coffee Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1067759>
- De Sousa, G. F., Silva, M. A., De Morais, E. G., Van Opbergen, G. A. Z., Van Opbergen, G. G. A. Z., De Oliveira, R. R., Amaral, D., Brown, P., Chalfun-Junior, A., & Guilherme, L. R. G. (2022). Selenium enhances chilling stress tolerance in coffee species by modulating nutrient, carbohydrates, and amino acids content. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1000430. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1000430>
- Elhalis, H., Cox, J., Frank, D., & Zhao, J. (2021). Microbiological and Chemical Characteristics of Wet Coffee Fermentation Inoculated With *Hansinaspora Uvarum* and *Pichia kudriavzevii* and Their Impact on Coffee Sensory Quality. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.713969>
- Elhalis, H., Cox, J., & Zhao, J. (2023). Yeasts are essential for mucilage degradation of coffee beans during wet fermentation. *Yeast*, 40(9), 425–436. <https://doi.org/10.1002/yea.3888>
- Fernandez-Güimac, S. L. J., Perez, J., Mendoza, J. E., Bustamante, D. E., & Calderon, M. S. (2023). Exploring the diversity of microorganisms and potential pectinase activity isolated from wet fermentation of coffee in northeastern Peru. *Food Science and Technology*, 43, e81922. <https://doi.org/10.1590/fst.81922>
- Galarza, G., & Figueroa, J. G. (2022). Volatile Compound Characterization of Coffee (*Coffea Arabica*) Processed at Different Fermentation Times Using SPME–GC–MS. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules27062004>

- Guia de las variedades de café Guatemala. (2019, March). *Asociación Nacional Del Café, Anacafé, segunda edición*, 48.
- Haile, M., & Kang, W. H. (2019a). Isolation, Identification, and Characterization of Pectinolytic Yeasts for Starter Culture in Coffee Fermentation. *Microorganisms*, 7(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100401>
- Haile, M., & Kang, W. H. (2019b). The Role of Microbes in Coffee Fermentation and Their Impact on Coffee Quality. *Journal of Food Quality*, 2019, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2019/4836709>
- Kaur, M., Tyagi, S., & Kundu, N. (2018). Effect of Brewing Methods and Time on Secondary Metabolites, Total Flavonoid and Phenolic Content of Green and Roasted coffee *Coffea arabica*, *Coffea canephora* and Monsooned Malabar. *European Journal of Medicinal Plants*, 23(1), 1–16. <https://doi.org/10.9734/EJMP/2018/40565>
- Koskei, K. R., Patrick, M., & Simon, M. (2015). Effects of Coffee Processing Technologies on Physico-Chemical Properties and Sensory Qualities of Coffee. *African Journal of Food Science*. <https://doi.org/10.5897/ajfs2014.1221>
- Kurtzman, C. P. (2007). *Blastobotrys americana* sp. Nov., *Blastobotrys illinoisensis* sp. Nov., *Blastobotrys malaysiensis* sp. Nov., *Blastobotrys muscicola* sp. Nov., *Blastobotrys peoriensis* sp. Nov. And *Blastobotrys raffinosisfermentans* sp. Nov., novel anamorphic yeast species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(5), 1154–1162. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64847-0>
- Las Heras-Vazquez, F. J., Mingorance-Cazorla, L., Clemente-Jimenez, J. M., & Rodriguez-Vico, F. (2003). Identification of yeast species from orange fruit and

- juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast Research*, 3(1), 3–9. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2003.tb00132.x>
- M. Muynarsk, E. S., de Pereira, G. V., Mesa, D., Soccol, V. T., de Carvalho, J. C., Binder Pagnoncelli, M. G., & Soccol, C. R. (2019). Draft Genome Sequence of *Pediococcus Acidilactici* Strain LPBC161, Isolated From Mature Coffee Cherries During Natural Fermentation. *Microbiology Resource Announcements*. <https://doi.org/10.1128/mra.00332-19>
- Martinez, S. J., Simão, J. B. P., Pylro, V. S., & Schwan, R. F. (2021). The Altitude of Coffee Cultivation Causes Shifts in the Microbial Community Assembly and Biochemical Compounds in Natural Induced Anaerobic Fermentations. *Frontiers in Microbiology*, 12, 671395. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.671395>
- Ngamnok, T., Nimlamool, W., Amador-Noguez, D., Palaga, T., & Meerak, J. (2023). Efficiency of *Lactiplantibacillus plantarum* JT-PN39 and *Paenibacillus motobuensis* JT-A29 for Fermented Coffee Applications and Fermented Coffee Characteristics. *Foods*, 12(15), 2894. <https://doi.org/10.3390/foods12152894>
- Oktaviani, L., Astuti, D. I., Rosmiati, M., & Abduh, M. Y. (2020). Fermentation of Coffee Pulp Using Indigenous Lactic Acid Bacteria With Simultaneous Aeration to Produce Cascara With a High Antioxidant Activity. *Heliyon*. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04462>
- Pereira, G. V. D. M., De Carvalho Neto, D. P., Medeiros, A. B. P., Soccol, V. T., Neto, E., Woiciechowski, A. L., & Soccol, C. R. (2016). Potential of lactic acid bacteria to improve the fermentation and quality of coffee during on-farm processing.

*International Journal of Food Science & Technology*, 51(7), 1689–1695.

<https://doi.org/10.1111/ijfs.13142>

Rojas-Chacón, J. A., Echeverría-Beirute, F., Jiménez Madrigal, J. P., & Gatica-Arias, A. (2024). Microorganismos de suelo y su relación con la calidad de la bebida de café: Una revisión. *Agronomía Mesoamericana*.  
<https://doi.org/10.15517/am.2024.57260>

Salazar Téllez, C. F., Morales Acevedo, W. A., Rojas Contreras, L., & Cajiao Pedraza, A. M. (2022). Prevalencia de hongos filamentosos en granos de café cultivado en norte de Santander, Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 14(1). <https://doi.org/10.22490/21456453.5900>

Shen, X., Wang, B., Zi, C., Huang, L., Wang, Q., Zhou, C., Wen, W., Liu, K., Yuan, W., & Li, X. (2023a). Interaction and Metabolic Function of Microbiota during the Washed Processing of *Coffea arabica*. *Molecules*, 28(16), 6092.  
<https://doi.org/10.3390/molecules28166092>

Shen, X., Wang, B., Zi, C., Huang, L., Wang, Q., Zhou, C., Wen, W., Liu, K., Yuan, W., & Li, X. (2023b). Interaction and Metabolic Function of Microbiota during the Washed Processing of *Coffea arabica*. *Molecules*, 28(16), Article 16.  
<https://doi.org/10.3390/molecules28166092>

Silva, C. F., Batista, L. R., & Schwan, R. F. (2008). Incidence and distribution of filamentous fungi during fermentation, drying and storage of coffee (*Coffea arabica* L.) beans. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(3), 521–526.  
<https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000300022>

Silva, C. F., Schwan, R. F., Sousa Dias, E., & Wheals, A. E. (2000). Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in

- Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 60(2–3), 251–260.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00315-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00315-9)
- Teferi, D., & Ayano, A. (2019). *Mycotoxigenic Moulds Associated With Coffee and Their Management (A Review)*. <https://doi.org/10.7176/jbah/9-8-06>
- Wang, Q.-M., Begerow, D., Groenewald, M., Liu, X.-Z., Theelen, B., Bai, F.-Y., & Boekhout, T. (2015). Multigene phylogeny and taxonomic revision of yeasts and related fungi in the *Ustilaginomycotina*. *Studies in Mycology*, 81(1), 55–83.  
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.10.004>
- Wang, Q.-M., Groenewald, M., Takashima, M., Theelen, B., Han, P.-J., Liu, X.-Z., Boekhout, T., & Bai, F.-Y. (2015). Phylogeny of yeasts and related filamentous fungi within *Pucciniomycotina* determined from multigene sequence analyses. *Studies in Mycology*, 81(1), 27–53.  
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.08.002>
- Waters, D. M., Arendt, E. K., & Moroni, A. (2015). Overview on the Mechanisms of Coffee Germination and Fermentation and Their Significance for Coffee and Coffee Beverage Quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.  
<https://doi.org/10.1080/10408398.2014.902804>
- Yu, Q., Guyot, R., De Kochko, A., Byers, A., Navajas-Pérez, R., Langston, B. J., Dubreuil-Tranchant, C., Paterson, A. H., Poncet, V., Nagai, C., & Ming, R. (2011). Micro-collinearity and genome evolution in the vicinity of an ethylene receptor gene of cultivated diploid and allotetraploid coffee species ( *Coffea* ). *The Plant Journal*, 67(2), 305–317. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04590.x>
- Zhao, N., Kokawa, M., Suzuki, T., Khan, A. R., Dong, W., Nguyen, M., & Kitamura, Y. (2024). Refermentation with yeast and lactic acid bacteria isolates: A strategy to

improve the flavor of green coffee beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 104(15), 9137–9150. <https://doi.org/10.1002/jsfa.13735>