



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CAMPUS GIRÓN
CARRERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**ELABORACION DE UNA BEBIDA PROBIÓTICA KOMBUCHA EMPLEANDO DOS
ENDULZANTES NO CALÓRICOS A PARTIR DE SCOPY (COLONIASIMBIÓTICA
DE BACTERIAS Y LEVADURAS)**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERA E INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORES:

DAISY BRIGITTE ALMEIDA NARVAEZ

FREDDY GUILLERMO SEVILLA REINA

TUTOR:

DANIEL ALBERTO FREIRE BALSECA

Quito-Ecuador

2023

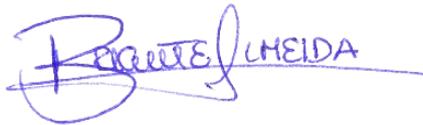
CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotros, Daisy Brigitte Almeida Narvaez con documento de identificación N° 1720844354 y Freddy Guillermo Sevilla Reina con documento de identificación N° 0803083310; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Quito, 4 de Agosto del año 2023

Atentamente,



Daisy Brigitte Almeida Narvaez
1720844354



Freddy Guillermo Sevilla Reina
0803083310

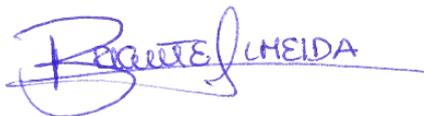
**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotros, Daisy Brigitte Almeida Narvaez con documento de identificación No. 1720844354 y Freddy Guillermo Sevilla Reina con documento de identificación No. 0803083310, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: “Elaboración de una bebida probiótica Kombucha empleando dos endulzantes no calóricos a partir de SCOBY (Colonia simbiótica de bacterias y levaduras)”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera e Ingeniero en Biotecnología, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 4 de Agosto del año 2023

Atentamente,



Daisy Brigitte Almeida Narvaez
1720844354



Freddy Guillermo Sevilla Reina
0803083310

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Daniel Alberto Freire Balseca con documento de identificación N° 1720534468, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA PROBIÓTICA KOMBUCHA EMPLEANDO DOS ENDULZANTES NO CALÓRICOS A PARTIR DE SCOPY (COLONIA SIMBIÓTICA DE BACTERIAS Y LEVADURAS), realizado por Daisy Brigitte Almeida Narvaez con documento de identificación N° 1720844354 y por Freddy Guillermo Sevilla Reina con documento de identificación N° 0803083310, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 4 de Agosto del año 2023

Atentamente,



Ing. Daniel Alberto Freire Balseca, MSc.

1720534468

Dedicatoria

Dedico el presente trabajo de investigación a mis padres, quienes son el mejor ejemplo de que la fe, el amor y el sacrificio son el pilar para llegar a la meta, con su incomparable apoyo y soporte el día de hoy puedo subir un escalón más en mi vida profesional.

A mi hija, quien, con su apoyo incondicional, comprensión y mucha paciencia ha hecho posible que alcance mi meta propuesta, aun a costa de sacrificar el tiempo que podía compartir junto a ella; siempre me dio fuerza y nunca me dejó rendir durante el este reto.

A mi abuelito Eduardo Narvaez, quien fue mi segundo papá, siendo la presencia más ausente en mi vida ahora, pero quien me enseñó a sonreírle a la vida sea cual sea la situación siempre terminara con un arcoíris.

Y, por último, pero no menos importantes mis hermanos y familiares; que creyeron en mí y no me dejaron sola en los momentos difíciles de la carrera, por lo que hoy dedico este triunfo a todos ustedes.

Daisy Brigitte Almeida Narvaez

El presente trabajo investigativo lo dedico principalmente a Dios, por ser el inspirador y darme fuerza para continuar con este proceso de obtener uno de los objetivos en mi vida.

A mis padres y mis abuelos, por su amor, trabajo y sacrificio durante todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy.

A todas las personas que me han apoyado y han hecho que el trabajo se realice con éxito, en especial a aquellos que me abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos.

Freddy Guillermo Sevilla Reina.

Agradecimiento

Agradezco principalmente al ser todo poderoso y creador del mundo mi Dios, por brindarme todas las bendiciones para llegar a esta meta propuesta, y al santo manto de la Virgen de Guadalupe que me mantuvo en su regazo en este caminar.

A mis padres, hija, hermanos y demás familia; por su amor y fuerza, han hecho posible que este logro no sea solo profesional sino personal.

Va dirigido también a mis amigos (Los cachorreros y los muchachos), que son la familia que yo elegí para que me acompañe durante este camino, quienes han sido un apoyo base en situaciones buenas y malas tanto académicas como personales. Y agradezco por ahora tenerlos como colegas a todos.

Con gran gratitud quiero expresar mis agradecimientos a todos los maestros y técnicos de laboratorio; que, con nobleza y entusiasmo, vertieron todo su conocimiento y experiencia en mí, logrando así una persona con un perfil profesional y humano intachable.

Al Ingeniero Daniel Freire tutor de tesis, por su invaluable apoyo, por sus conocimientos, orientaciones y su excelente trabajo, guiándonos satisfactoriamente durante este tiempo, gracias totales por su persistencia, paciencia y motivación a la culminación de esta meta

Daisy Brigitte Almeida Narvaez

Agradezco a Dios por sus bendiciones en la vida, por guiarme a lo largo de mi existencia, ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad.

Gracias a mis padres y abuelos, por ser los principales promotores en mis sueños, por confiar y creer en mí, por los consejos, valores y principios que me han inculcado.

Freddy Guillermo Sevilla Reina

Resumen

El presente trabajo de titulación se enfoca en la elaboración de una bebida probiótica kombucha, empleando endulzantes no calóricos con proceso fermentativo por SCOBY, estos endulzantes alternativos son la Stevia y el azúcar de coco, presentando como parte de resultados el pH, crecimiento del SCOBY el cual se utiliza para preparar la kombucha, porcentajes de ácido acético y cantidad de azúcar presente en la bebida final, además de cuantificar el consumo de sustrato mediante la técnica de fenol – ácido con el fin de comprobar el consumo de azúcares en el paso del tiempo. Para el procedimiento se procedió igualmente que al preparar la kombucha de forma tradicional, es decir, elaboración del té negro base, añadiendo el azúcar específica en cada tratamiento y posteriormente dejando reposar durante un periodo de dos semanas, al cumplirse este lapso de tiempo obtenemos la bebida probiótica kombucha y se almacenan en botellas de vidrio para su conservación y que no exista alteración en su composición, así como la gasificación generada durante el proceso de fermentación. El proceso de fermentación consiste en la preparación de té negro con el azúcar a utilizar en cada tratamiento, y una vez que la temperatura disminuya a temperatura ambiente se agrega la biomasa SCOBY en un recipiente de vidrio, posteriormente se deja reposar durante un periodo de dos semanas, tiempo en el que va a darse la fermentación del té negro por parte de las bacterias presentes en la zooglea. Esta bebida obtenida va a contar con propiedades medicinales, entre las cuales se encuentran el ser una bebida anticancerígena, ayuda a prevenir la diabetes por su bajo porcentaje de azúcares, inmunológicas por los *Lactobacillus* presentes, entre otras. Como parte de análisis microbiológico se obtiene una bebida acorde con las normas INEN de salubridad con respecto a los microorganismos que se presenten en la bebida, sin que lleguen a afectar de manera negativa a la salud de aquellos individuos que consuman este tipo de té, dando de esta manera una bebida de buena calidad. Al finalizar el proceso se obtuvo la bebida kombucha en la que se aplicaron los distintos azúcares no tradicionales en donde se puede determinar que no se presenta un crecimiento variado de manera significativa, así mismo, no se presentó diferencia en cuanto al crecimiento del SCOBY.

PALABRAS CLAVE: Fermentación, Manchurian fungus, ácido acético, azúcares, probióticos.

Abstract

The present titration work focuses on the elaboration of a probiotic kombucha beverage, using non-caloric sweeteners with fermentative process by SCOBY, these alternative sweeteners are Stevia and coconut sugar, presenting as part of the results the pH, growth of SCOBY which is used to prepare kombucha, percentages of acetic acid and amount of sugar present in the final beverage, growth of SCOBY, which is used to prepare kombucha, percentages of acetic acid and amount of sugar present in the final beverage, in addition to quantifying the consumption of substrate by means of the phenol-acid technique in order to verify the consumption of sugars over time. For the procedure we proceeded in the same way as when preparing the kombucha in the traditional way, that is to say, elaboration of the base black tea, adding the sugar specified in each treatment and then leaving it to stand for a period of two weeks, when this lapse of time is completed we obtain the probiotic kombucha beverage and it is stored in glass bottles for its conservation and that there is no alteration in its composition, as well as the gasification generated during the fermentation process. The fermentation process consists of the preparation of black tea with the sugar to be used in each treatment, and once the temperature decreases to room temperature, the SCOBY biomass is added in a glass container, then it is left to stand for a period of two weeks, during which time the fermentation of the black tea by the bacteria present in the zooglea will take place. This drink obtained will have medicinal properties, among which are being an anticarcinogenic drink, helps prevent diabetes due to its low percentage of sugars, immunological properties due to the Lactobacillus present, among others. As part of the microbiological analysis, a beverage is obtained in accordance with INEN health standards with respect to the microorganisms present in the beverage, without negatively affecting the health of those individuals who consume this type of tea, thus giving a good quality beverage. At the end of the process, the kombucha beverage was obtained in which the different non-traditional sugars were applied, where it can be determined that there is no significant variation in growth, likewise, there was no difference in the growth of SCOBY.

KEY WORDS: Fermentation, *Manchurian fungus*, acetic acid, sugars, probiotics

Índice de contenidos

1	Introducción.....	1
2	Fundamentación teórica	4
2.1	Los probióticos	4
2.1.1	Mecanismo de acción.....	4
2.2	Bebida Probiótica Kombucha.....	5
2.2.1	Definición y generalidades de la bebida probiótica Kombucha	5
2.2.2	Taxonomía del SCOBY de Kombucha	7
2.2.3	Actividad metabólica de los microorganismos de la Kombucha.....	9
2.3	Elaboración de la Kombucha.....	9
2.3.1	Fermentación.....	9
2.3.2	Sustratos.....	10
2.3.3	Endulzantes no calóricos.....	11
2.3.4	Té negro	11
2.4	Actividad probiótica de la bebida Kombucha	12
2.5	Caracterización Físico -Química y Análisis Microbiológico	12
2.5.1	Cuantificación de azúcares.....	12
2.5.2	Determinación de pH	13
2.5.3	Valoración de ácido acético	13
2.5.4	Análisis Microbiológico.....	13
3	Materiales y métodos	14
3.1	Enfoque de la investigación	14
3.2	Diseño de investigación	14
3.3	Operacionalización de Variables	15
3.3.1	Variable Independiente	15
3.3.2	Variable Dependiente.....	15
3.4	Procedimiento y Análisis	16
3.4.1	Propagación en caldo líquido de las películas Scoby de “kombucha” para la investigación. ..	16
3.4.2	Determinación de tratamientos para la fermentación en base a los factores de estudio.....	16
3.5	Procedimiento para los tratamientos.....	17
3.6	Cuantificación de azúcares – Método Fenol – Sulfúrico	17
3.7	Valoración de ácido acético	18
3.8	Análisis microbiológico	18
3.8.1	Preparación de medios de cultivo	19
3.8.2	Diluciones seriadas	19
3.8.3	Siembra	20

3.9	Diagrama de flujo para la elaboración de una bebida de Kombucha	21
3.10	Análisis Estadístico	22
3.11	ANOVA y prueba de Tukey	22
4	Resultados y Discusión	23
4.1	Determinación del tratamiento con mejor aceptación de Kombucha por parámetros organolépticos.	23
4.2	Cuantificación consumo de sustrato mediante la técnica de fenol ácido.	25
4.2.1	ANOVA Cuantificación consumo de sustrato.....	26
4.2.2	Prueba de Tukey para la cuantificación de consumo de sustrato.....	27
4.3	Caracterización físico-química	28
4.3.1	Evaluación característica pH.....	28
4.3.2	Evaluación característica espesor	28
4.3.3	Evaluación porcentaje ácido acético	29
4.4	Crecimiento de <i>Penicillium</i> sp. en la elaboración de la bebida probiótica Kombucha, en el tratamiento 4 – sin endulzante.....	32
4.5	Determinación del análisis microbiológico de la bebida probiótica “Kombucha” mediante análisis de aerobios totales, coliformes totales y mohos y levaduras al tratamiento mejor evaluado dentro de pruebas organolépticas.	33
4.6	Determinación de probióticos de la bebida “Kombucha” al tratamiento mejor evaluado dentro de pruebas organolépticas.	34
5	Conclusiones.....	36
6	Recomendaciones	37
7	Bibliografía.....	38
8	Anexos.....	42

Índice de figuras

Figura 1 Gráfica pastel parámetro Color	23
Figura 2 Gráfica pastel parámetro Olor	24
Figura 3 Gráfica pastel parámetro sabor.....	24
Figura 4 Gráfica pastel parámetro consistencia	25
Figura 5 Curva Patrón Glucosa	26
Figura 6 Análisis de medias entre tratamientos por consumo de sustratos	27
Figura 7 Porcentaje de ácido acético – T1 azúcar blanca.....	31
Figura 8 Porcentaje de ácido acético -T2 azúcar de coco.....	31
Figura 9 Porcentaje de ácido acético -T3 azúcar + Stevia.....	32
Figura 10 Materia prima	42
Figura 11 Pesaje	42
Figura 12 Infusión té negro.....	42
Figura 13 Fermentación.....	42
Figura 14 Envasado	42
Figura 15 T3 Azúcar de coco inicial	52
Figura 16 T3 Azúcar de coco final.....	52
Figura 17 T3 Azúcar Stevia inicial	52
Figura 18 T3 Azúcar Stevia final	52

Índice de tablas

Tabla 1 Taxonomía de bacterias y levaduras en la Kombucha.....	7
Tabla 2 Composición microbiana de las colonias de Kombucha	8
Tabla 3 Concentración de sustratos.....	15
Tabla 4 Características físico-químicas de la bebida	15
Tabla 5 Tratamientos y formulación	16
Tabla 6 Parámetros organolépticos	22
Tabla 7 ANOVA - Determinación de espesor SCOBY	Error! Bookmark not defined.
Tabla 8 Evaluación características físico químicas (Inicial-Final)	Error! Bookmark not defined.
Tabla 9 Valores de crecimiento SCOBY (espesor).....	Error! Bookmark not defined.
Tabla 10 Análisis de varianza de un factor.....	Error! Bookmark not defined.
Tabla 11 ANOVA - Característica espesor	Error! Bookmark not defined.
Tabla 12 Cuantificación de azúcares del tratamiento 3 aplicando Azúcar blanca - Inicial	Error!
Bookmark not defined.	
Tabla 13 Cuantificación de azúcares del tratamiento 3 aplicando Azúcar blanca -Final...	Error!
Bookmark not defined.	
Tabla 14 Cuantificación de azúcares del tratamiento 1 aplicando Azúcar de Coco - Inicial	
.....	Error! Bookmark not defined.
Tabla 15 Cuantificación de azúcares del tratamiento 1 aplicando Azúcar de Coco - Final	Error!
Bookmark not defined.	
Tabla 16 Cuantificación de azúcares del tratamiento 3 aplicando azúcar Stevia -Inicial ..	Error!
Bookmark not defined.	
Tabla 17 Cuantificación de azúcares del tratamiento 3 aplicando azúcar Stevia -Inicial ..	Error!
Bookmark not defined.	
Tabla 18 Resultados microbiológicos de los tratamientos de mejor aceptación según el panel sensorial T2 y T3.....	Error! Bookmark not defined.

Índice de anexos

Anexo 1 Elaboración Kombucha	42
Anexo 2 Encuesta análisis sensorial (Google Formulario)	43
Anexo 3 Tablas ABS (absorbancia) de los 4 tratamientos por días de fermentación	44
Anexo 4 Tabla transformación ABS – mg/mL	46
Anexo 5 Tablas área bajo la curva por triplicados de tratamientos 1 y 2.....	47
Anexo 6 Tablas área bajo la curva por triplicados de tratamientos 3 y 4.....	48
Anexo 7 Tablas obtenidas del programa estadístico Infostat y Excel – ANOVA y prueba de Tukey, para cuantificación de consumo de sustrato.....	49
Anexo 8 Tabla desviación estándar para características físico químicas de los tratamientos. ...	50
Anexo 9 ANOVA Infostat de cuantificación espesor SCOPY	51
Anexo 10 Determinación del contenido de ácido acético – Producto final.....	52
Anexo 11 Identificación <i>Penicillium</i> spp. – Morfología macroscópica y microscópica.....	53
Anexo 12 Montaje del diseño experimental (4 Tratamientos)	54
Anexo 13 Análisis Microbiológico Producto inicial y final – Tratamiento 3 Azúcar de Coco. ...	55

1 Introducción

El consumo de alimentos probióticos, inicia por el beneficio que presentan para la salud humana por parte del consumo de microorganismos vivos (probióticos), de la cual hay información desde principios del siglo XX, donde en 1908, el científico ruso y ganador del premio Nobel de Fisiología o Medicina Eliot Metchnikoff, postuló que las bacterias ácido-lácticas otorgan beneficios para la salud, mediante el estudio que llevaban a la longevidad al observar que los campesinos de Bulgaria contaban con una vida longeva y saludable, debido al consumo de yogur y otros productos lácteos fermentados (Arguelles, 2008).

Una fermentación es un proceso en el que se obtiene energía por condiciones aeróbicas, en donde se tiene a manera de producto el etanol al producirse un fermento alcohólico por participación de levaduras, mientras que al ser un fermento en medio anaerobio se obtiene ácido láctico por parte de las bacterias ácido lácticas, de esta manera se puede aplicar la fermentación para la producción de bebidas como el alcohol (Páez, 2010).

Ciertos países en vías de desarrollo han demostrado gran desempeño en el área empresarial e industrial a comparación de países desarrollados, un ejemplo de esto es en el sector de alimentos y bebidas, donde presentan relevancia económica sobre todo en el área industrial (Melgarejo & Simon, 2019).

La Kombucha es una bebida tradicional ancestral originaria de Asia Oriental, que se produce a partir de la fermentación de té endulzado, en este proceso intervienen bacterias ácido-acéticas. La Kombucha es la simbiosis de microorganismos, entre levaduras y bacterias, que conviven de manera equilibrada en un medio líquido de sustratos azucarados y té negro, esto se trata de una bebida fermentada de origen asiático, que con el avance del tiempo se ha ganado renombre y popularidad en occidente gracias a las propiedades medicinales, en las que se incluyen tratamiento antimicrobiano, antioxidante, anticancerígeno, antidiabético, afecciones al tracto digestivo y mejora inmunológica (Coelho et al., 2020).

La Kombucha suele prepararse en un fermento de té negro endulzado con azúcar a temperatura ambiente en un periodo que va desde 10 días hasta las dos semanas. Las levaduras fermentan al azúcar presente en el té convirtiéndolo en etanol, el cual es oxidado por las bacterias y se produce el ácido acético, con lo que resulta en un pH bajo acompañado de presencia de metabolitos antimicrobianos, con lo que se reduce la competencia de otras bacterias o levaduras, incluso de filamentos de hongos. Ciertos análisis del líquido revelan que este fermento presenta diversas

sustancias, como ácido acético, ácido láctico o ácido glucónico, de los cuales este último se considera como agente terapéutico principal en la kombucha, actuando como agente desintoxicante. Otros autores indican que el ácido acético es el mayor agente antimicrobiano presente, aunque otros compuestos como bacteriocinas pueden estar involucradas de igual manera (Teoh et al., 2004).

Estas propiedades probióticas aportan al tratamiento medicinal al que puede aplicarse la kombucha. Es importante tener en cuenta que, a pesar de que en su mayoría estos beneficios son estudiados únicamente en modelos experimentales, no se posee evidencia científica en modelos humanos (Jayabalan et al., 2008). El mayor inconveniente consiste en que solamente existen pruebas realizadas en animales de laboratorio, mas no en seres humanos, por lo cual, al querer obtener datos reales, es importante realizar diversos análisis para su consumo.

Los probióticos se los considera como ingredientes funcionales para darles así a los alimentos una propiedad definida, ya que le aumenta un valor saludable al alimento que lo contiene. Los alimentos que contienen probióticos forman parte de la categoría de alimentos funcionales, debido a que proporcionan beneficios para la salud del consumidor aparte de los componentes nutricionales propios del alimento (Cáceres R. Paola & Gotteland R. Martín, 2010).

En la actualidad se registran, estudios previos realizados en ratas de laboratorio del consumo de Kombucha, que han demostrado que es una bebida con altos niveles de antioxidantes, las cuales protegen a las células pancreáticas, así mismo, regula la insulina de manera constante y nivela el azúcar en la sangre, por lo que puede considerarse como suplemento alimenticio para controlar de manera eficaz las condiciones de la diabetes (Srihari et al., 2013). Por su facilidad de preparación, su sabor y principalmente sus propiedades benéficas para la salud es que esta bebida se ha vuelto atractiva, entre estos beneficios se incluyen resultados a partir de estudios *in vitro*, así como estudios realizados en animales, entre los que se incluyen control oxidativo de estrés, actividad antimicrobiana, tratamiento y prevención de diabetes y mejora en actividad del hígado. Al ser la kombucha una bebida con gran cantidad de sustancias con propiedades bioactivas, como compuestos fenólicos, estos representan un grupo principal en cuanto a antioxidantes, los cuales son responsables de los beneficios que posee la kombucha (Ferreira et al., 2021).

En la actualidad, las industrias dedicadas a la producción de bebidas fermentadas, enfocan su actividad industrial en producirlas de manera artificial (Vargas Mora, 2011), por lo que esto afecta perjudicialmente a sus consumidores, es por ello, la importancia de investigar la elaboración de una bebida fermentada, prebiótica y natural a base de SCOBY de “kombucha”, la que contiene diversos beneficios para la salud humana, por su fermentación, generando así

diversos metabolitos: vitaminas, enzimas, ácidos orgánicos y bajas concentraciones de alcohol (Ácido acético).

Al tener como antecedentes que el aumento de enfermedades crónicas se ha convertido en las causas de niveles más altos de mortalidad a nivel mundial, y también con base de investigación científicas, indican que el índice de enfermedades aumenta debido a una mala alimentación, el consumo excesivo de alimentos artificiales, entre otros factores. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) los desórdenes alimenticios que se tiene por una dieta inadecuada son las que dan origen al sobrepeso y la obesidad, que en la actualidad se la considera ya una epidemia mundial. Por lo que profesionales de área biológica, presentan opciones para la elaboración de alimentos funcionales, tanto nutritivos y saludables para sus consumidores, para lograr tratar, curar y evitar enfermedades en el ser humano (OPS, 2021).

Uno de los puntos a analizar es el consumo de sustrato o consumo de azúcares por parte del SCOBY al momento de su elaboración, así como la cantidad de ácido acético que la bebida posee al final, y un análisis microbiológico con el fin de poder tener una bebida con la composición de ser un alimento probiótico, para esto se evaluarán estos factores utilizando variantes de azúcar convencional para el desarrollo de la bebida.

La importancia de este proyecto recae en que, a pesar de que la kombucha es una bebida que ha tomado relevancia en la actualidad por sus propiedades medicinales o probióticas, carece de investigaciones que ayuden a corroborar sus beneficios, con lo cual en primer lugar, se va a evaluar el crecimiento del hongo y la producción de kombucha con diferentes tipos de azúcares para obtener una bebida de calidad y con seguridad microbiológica, para así ofrecer alternativas nutricionales que permitan mitigar la exposición constante a productos procesados industrialmente. Con el objetivo de elaborar una bebida probiótica kombucha empleando dos endulzantes no calóricos para ser empleados con proceso fermentativo por SCOBY, y obtener diferentes medios de cultivo con azúcares no calóricos, al igual que el análisis del consumo de sustrato o consumo de azúcares por parte del SCOBY al momento de su elaboración, así como el porcentaje de ácido acético que la bebida posee al final, y un análisis microbiológico para la obtención de un producto de calidad.

2 Fundamentación teórica

2.1 Los probióticos

La OMS (Organización Mundial de la Salud), define a los probióticos como microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades correctas, otorgan beneficios a la salud del huésped. Y estos pueden estar presentes en la composición de varios tipos de productos, entre los que se pueden incluir a los alimentos, medicamentos y complementos de la dieta del hombre (Rappaccioli et al., 2021).

Para determinar el término probiótico, Lilly y Stillwell en 1965 utilizaron por primera vez el término para denominar a los productos obtenidos de una fermentación gástrica. Hay que tomar en cuenta que la palabra se deriva de dos vocablos, del latín “*pro*” (por o en favor de), y del griego “*bios*” (decir vida). Pero aun así la definición fue reformada y la redefinieron como microorganismos y compuestos que participan en el balance y desarrollo microbiano intestinal. En 1989 R. Fuller; define a los Probióticos como: "Aquellos microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que son agregados como suplemento en la dieta y que afectan en forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana en el intestino"(Delgado, 2007).

De manera general se define como Probiótico a microorganismos vivos que se adicionan en alimentos y se mantienen activos en el intestino, ejerciendo importantes efectos fisiológicos. Ingeridos en cantidades con capacidad de efecto beneficioso, como por ejemplo ayudar en el equilibrio de la flora bacteriana intestinal del huésped y elevar el sistema inmunológico (Tormo, 2006).

2.1.1 Mecanismo de acción

Los probióticos cumplen la función de afectar al ecosistema intestinal en una manera positiva, activando los mecanismos inmunitarios y no inmunitarios de la mucosa, modulando su composición; por medio de la inhibición de microorganismos patógenos o a su vez favoreciendo la presencia y variedad de bacterias consideradas beneficiosas dentro del ecosistema intestinal. Al tener una gran influencia en la microbiota intestinal, en la salud digestiva y en el sistema inmunitario y, por aporte benéfico, en el estado general de salud del huésped, realizando varias funciones esenciales para un correcto desarrollo de la persona, y logrando que este ecosistema bacteriano en el organismo pueda autorregularse y mantenerse en equilibrio (Rappaccioli et al., 2021). La ingesta de probióticos tiene la capacidad, de reducir el pH del medio y generar compuestos antibacterianos, la reducción de adherencia, la replicación y la acción de la flora otorga protección frente a bacterias potencialmente patógenas para el hospedador (Garrote & Ramon Bonet, 2017).

2.2 Bebida probiótica kombucha

Miranda et al., 2022; indica que la kombucha se originó al noreste de China (Manchuria), donde toma relevancia durante la dinastía Tsin (Ling Chi), en el año 220 a.C., debido a las propiedades beneficiosas para la salud. Por la globalización, se inicia su consumo a nivel mundial. Además del continente asiático, el consumo de kombucha comienza en Rusia y Europa del Este, llegando hasta Alemania en el siglo XX, y así fue como el consumo de bebidas fermentadas fue aceptada y tomando más popularidad de su consumo en todo el mundo. Se tiene varias hipótesis del origen del nombre, donde la primera es por el físico coreano que trató al emperador de Japón “Kombu” y se deduce que de ahí pudo derivar el nombre, la segunda hipótesis y la más aprobada es que la palabra kombucha, deriva de otras dos japonesas: “*kombu*” (alga) y “*cha*” (té) (Greenwalt et al., 2000).

Debido al fácil uso, su sabor ácido-dulce y además las propiedades beneficiosas para la salud, la kombucha se ha convertido en una bebida atractiva, por los beneficios atribuidos a ella gracias a estudios e investigaciones *in vitro* y con animales, tales como: el control de estrés oxidativo, actividad antimicrobiana, tratamiento y prevención de diabetes, reducir la propagación del cáncer y mejorar la función hepática; debido a su contenido en propiedades bioactivas, compuestos fenólicos, que le proporcionan sus propiedades beneficiosas (J. F. de Miranda et al., 2022).

Por sus beneficios para la salud, fue reconocida como bebida sagrada para japoneses y coreanos. Resultado de una fermentación aerobia controlada obteniendo así un sabor avinagrado y dulce en una bebida espumosa, también la utilizaban en rituales y en áreas de oración. Convirtiéndose en una de las siete necesidades básicas de la vida, inclusive se considera impropio la venta del SCOBY de la kombucha, ya que se la consideraba sagrada, solo debía ser regalada y hasta la actualidad se mantiene vigente esta creencia (Dutta & Paul, 2019). Actualmente, el hombre busca alimentos con beneficios para su salud, es decir que contengan probióticos como en este tipo de bebidas fermentadas (Mariño et al., 2015).

2.2.1 Definición y generalidades de la bebida probiótica kombucha

Kombucha (*Manchurian fungus*), es una bebida no alcohólica tradicional, elaborada desde la antigüedad, convirtiéndose en el resultado de la fermentación de SCOBY (simbiosis de levaduras y bacterias), junto a la infusión de té negro con azúcar, de la que se obtiene una bebida ligeramente ácida avinagrada con un toque dulce. A esta simbiosis compuesta de levaduras y

bacterias, se la conoce comúnmente como: el hongo del té negro, el hongo kombucha, manchurian mushroom o fungus tea (Illana Carlos, 2007).

La kombucha está compuesta por dos partes: la biopelícula o zooglea y el medio líquido ácido. Esta inicia siendo una biopelícula gelatinosa transparente, que con la fermentación va tomando un color de beige a café por los bordes hasta que cubre toda la superficie del medio líquido, su forma dependerá del borde del recipiente donde se encuentre. Al comenzar la fermentación, se degrada el azúcar, por lo que la infusión se volverá ácida y como producto de este proceso se obtiene ácidos y enzimas que dan el sabor característico y los beneficios medicinales.

Los microorganismos que posee el SCOBY, inician el proceso de metabolización de los sustratos del té endulzado, generando fermentaciones de tipo alcohólica, láctica y acética. Estudios indican que el consumo de la fuente de carbono incrementa linealmente durante la fermentación de la kombucha y al mismo tiempo se genera celulosa, ácido acético y etanol. Al igual que las levaduras realizan la hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa mediante enzimas. Consecutivamente, ambos monosacáridos se los puede utilizar como sustratos en la glucólisis para la producción de piruvato, el cual en la fermentación alcohólica se transforma a acetaldehído y posterior a etanol por la enzima alcohol deshidrogenasa. Y del proceso se libera moléculas de CO₂ las cuales se almacenan en el medio dando lugar a una bebida carbonatada como resultado (Kallel et al., 2012).

Según Delgado, 2007, la kombucha, contiene organismos vivos activos con la capacidad de regenerar la microbiota en el organismo del ser humano, con mayor énfasis en el aparato digestivo y en la regeneración de las defensas, además de muchas otras propiedades que revelan los beneficios de su consumo regular.

Existen diversas exploraciones científicas, la cual inicia en 1950, con el Instituto Bacteriológico de Moscú. Aquí se descubrieron que no era un solo organismo el que se encontraba en la kombucha, sino una colonia simbiótica de bacterias y levaduras que poseen vías metabólicas altamente complejas y sofisticadas. El grupo de organismos indica que es capaz de generar efectos antibióticos distintos a través de la presencia de ácido úsnico la cual está presente en algunos líquenes. También existen investigaciones de que el ácido úsnico puede desactivar ciertos grupos de virus (Livia, 2019)

Como ejemplo en la historia del SCOBY, se comenta que científicos rusos realizaron estudios; para detectar la incidencia de cáncer en todos los distritos de la URSS, y en el caso en las Montañas Urales Occidentales, que difícilmente se registraban casos de cáncer. A pesar de estar expuestos directamente a metales pesados y altamente tóxicos y que resultaba uno de los lugares

más tóxicos del país, lo que se comprobó por las especies marinas que flotaban en el río Kama, al igual que los bosques se marchitaban. Al realizar las investigaciones y estudios; en el lugar se llegó a determinar que los habitantes no tenían cáncer porque consumían té de Kombucha. No obstante, en 1928, el White Flag, reportó que la Kombucha era conocido en ese entonces por los efectos benéficos en la desintoxicación del organismo, limpieza de la sangre, el alivio de erupciones cutáneas, dolores de extremidades y problemas del envejecimiento en general (Delgado, 2007).

2.2.2 Taxonomía del SCOBY de Kombucha

A pesar del uso que se le da al termino “hongo”, se ha demostrado que no posee características del crecimiento de un hongo. Sino que se trata de una colonia simbiótica de bacterias y levaduras, que pertenecen a la familia Fungí (Cujilema, 2021). En la Tabla 1, se presenta su taxonomía de bacterias y levaduras que conforman el SCOBY.

La kombucha se produce por la acción de la simbiosis microbiana flotante de bacterias aerobias y levaduras que posee. La producción de la zooglea facilita la aireación para los microorganismos aerobios, ya que con cada lote de kombucha se forma una nueva película, y esta nueva película es la colonia utilizada para hacer lotes posteriores de kombucha (Cujilema, 2021).

Tabla 1 Taxonomía de bacterias y levaduras en la kombucha

Dominio	Bacteria	Eucariota
Reino		Fungi
Filo	Proteobacteria	Ascomycota
Clase	Alphaproteobacteria	Saccharomycetes
Orden	Rhodospirillales	Saccharomycetales
Familia	Acetobacteraceae	Saccaromycetaceae
Genero	Gluconacetobacter	Zigosaccharomyces
Especie	Kombucha	Kombuchaensis

Fuente:(Cujilema, 2021)

Estudios indican que las bacterias y levaduras encargadas de la fermentación de bebidas, evolucionan efectivamente hacia especies que existen en alimentos fermentados. Como las taxonomías van evolucionando, se puede indicar que cepas de bacterias y levaduras de la Kombucha forman parte de las especies específicas de bebidas fermentadas (Cujilema, 2021).

Las bacterias principales en generar ácido acético y ácido glucónico; son las especies procariontas predominantes en el cultivo de kombucha. Estudios han demostrado que el *Acetobacter xylinum* es la bacteria principal y *A.xylinum* genera ácido acético, ácido glucónico y celulosa a partir de fuentes de carbono como son el etanol y la glucosa. Y también *A. xylin-um* es también el organismo primario en la producción de Nata y "Madre del vinagre" (Greenwalt et al., 2000).

The American Type Culture Collection, contiene los tipos aislados de levaduras del estudio de *Mayser et al.* sobre el contenido microbiano de varias colonias de kombucha domésticas alemanas (Greenwalt et al., 2000). (**Error! Reference source not found.**).

Tabla 2 Composición microbiana de las colonias de kombucha

Microorganismo
Bacterias
<i>Acetobacter xylinum</i>
<i>Acetobacter aceti</i>
<i>Acetobacter</i>
<i>pasteurianus</i>
<i>Gluconobacter</i>
Levaduras
<i>Brettanomyces</i>
<i>Brettanomyces</i>
<i>bruxellensis</i>
<i>Brettanomyces</i>
<i>intermedius</i>
<i>Candida</i>
<i>Candida famata</i>
<i>Mycoderma</i>
<i>Mycotorula</i>
<i>Pichia</i>
<i>Pichia</i>
<i>membranaefaciens</i>
<i>Saccharomyces</i>
<i>Saccharomyces</i>
<i>cerevisiae subsp.</i>
<i>Aceti</i>
<i>Saccharomyces</i>
<i>cerevisiae subsp.</i>
<i>cerevisiae</i>
<i>Schizosaccharomyces</i>
<i>Torula</i>
<i>Torulaspora</i>
<i>delbrueckii</i>
<i>Torulopsis</i>
<i>Zygosaccharomyces</i>
<i>Zygosaccharomyces</i>
<i>bailii</i>
<i>Zygosaccharomyces</i>
<i>rouzii</i>

Fuente: (Greenwalt et al., 2000)

Además, en la investigación de *Mayser et al.*, se logró observar un bajo índice de contaminación de microorganismos patógenos y así concluyeron que la kombucha puede elaborarse de manera casera sin riesgo para la salud siguiendo una correcta preparación (Greenwalt et al., 2000).

2.2.3 Actividad metabólica de los microorganismos de la kombucha

La conversión o transformación del carbono de sacarosa inicia por la descomposición del azúcar en glucosa y fructosa. Las levaduras utilizan la glucosa para la producción de etanol y dióxido de carbono y por otro lado al etanol lo oxidan las bacterias en acetaldehído y posteriormente en ácido acético. Como producto de la kombucha, el contenido de alcohol nunca supera los 10 g/L y las concentraciones de ácido acético alcanzan niveles de 30 g/L (3%), si la fermentación de la infusión sería hasta 30 días. Como segunda actividad bioquímica de *Acetobacter*, utiliza la glucosa y la convierte en ácido glucónico la cual está presente en cantidades de 20g/L (2%). La fructosa permanece en el caldo de fermentación y los microorganismos lo utilizan en menor grado. Como resultado, tenemos que las bacterias son productoras principales de ácido acético, ácido glucónico y celulosa (Greenwalt et al., 2000).

2.3 Elaboración de la kombucha

2.3.1 Fermentación

La fermentación es un proceso químico de catálisis, en donde se oxidan los compuestos orgánicos con la finalidad de obtener diversos componentes orgánicos y a su vez energía (Arcos, 2017). Este proceso de fermentación consiste en que tanto levaduras y bacterias convierten a los compuestos químicos como azúcares, por ejemplo, en otras como etanol o ácido butírico o láctico, estos procedimientos son utilizados por el ser humano desde hace cientos de años, con el objetivo de conservar los diversos alimentos y producir alimentos y bebidas con sabores y aromas específicos, como son: queso, yogurt, cerveza, vino, pan, etc. En siglos recientes por medio de la fermentación se ha podido desarrollar otro tipo de productos como medicinas, antibióticos, ácidos o productos industriales (Puerta, 2010).

La fermentación aerobia es un proceso que se da en presencia de oxígeno, este tipo de fermentación suele llamarse simple ya que se coloca el producto y el agente fermentador, lo importante es mantener un control continuo en el proceso haciendo énfasis en el tiempo y la temperatura durante todo el tratamiento (A. Delgado, 2021).

Por otra parte, la fermentación alcohólica se da principalmente por *Saccharomyces cerevisiae*, la cual es una levadura utilizada en la elaboración de la cerveza o el pan, esta transforma en un 90% del azúcar en cantidades similares de alcohol y CO₂. Esta fermentación se da gracias a que los microorganismos procesan los azúcares y dan como resultado etanol, CO₂ y ATP, estas

moléculas se utilizan directamente en diversos metabolismos energéticos. Este tipo de fermentaciones se da como resultado de la fermentación láctica, y sirve para el ser humano utiliza este procedimiento para elaborar bebidas como cerveza o vino, así como alimentos como el pan (Goya, 2013).

En cambio, la fermentación láctica es un proceso que se da de manera más rápida, este tratamiento necesita una homogenización continua y una revisión de pH puesto que este debe ser de 4 (Florez et al., 2020). En este caso la aceleración en cuanto a tiempos se da por parte de las bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus*, las cuales se encargan de transformar esta materia orgánica en diversas sustancias como vitaminas, aminoácidos, minerales complejos, giberelinas, etc. Al aplicarse este tipo de fermentación el resultado suele darse con sabores ácidos, generación de aromas o hasta producciones de gas. Principalmente, las bacterias ácido lácticas, encargadas de este procedimiento, se encargan de la producción de ácido láctico de azúcar y de hidratos de carbono producidos por bacterias y levaduras (Yurivilca, 2023).

Se puede definir a la fermentación acética a la transformación de etanol en agua y ácido acético, esta transformación se da en presencia de oxígeno. El ácido acético se forma por medio de una conversión en medio aerobio, en donde al tenerse al final como producto al ácido acético, también se tienen cantidades pequeñas de esteres, aldehídos y acetona, mismas sustancias que intervienen en el sabor del producto. Esta fermentación se aplica como una etapa de gran relevancia en la elaboración de vinagre. Entre las condiciones que deben presentarse para darse esta fermentación son la densidad de las bacterias, concentraciones de etanol, ácido acético, oxígeno y temperatura. Las bacterias que intervienen se clasifican como aerobias estrictas, dado el hecho que presentan un metabolismo respiratorio, en donde el oxígeno actúa como aceptor de electrones con lo que se forman colonias pálidas. La familia principal a la que pertenecen las bacterias acéticas es *Acetobacteraceae*, y a su vez los géneros de mayor interés son *Acetobacter* y *Gluconobacter* (Rojas, 2022).

2.3.2 Sustratos

Al ser la kombucha el producto de la fermentación de la azúcar utilizada para la alimentación de la levadura y el SCOBY generando dióxido de carbono y etanol ya que sirve de sustrato para las bacterias presentes en la simbiosis de bacterias y levaduras, generando así ácidos beneficiosos como el ácido ascórbico, por lo cual hay que ser cuidadoso con el manejo de los ingredientes (Castañeda G., 2017).

El término de azúcar se emplea para designar tanto a monosacáridos o disacáridos que presentan un sabor dulce, a su vez también se clasifican de esta manera a gran cantidad de hidratos de carbono. Un 70% de la azúcar utilizada a nivel mundial es producida por la caña de azúcar y

restos de remolacha, hoy en día el azúcar se consume por grandes cantidades de la población. Este monosacárido se añade a grandes variedades de alimentos elaborados, como yogurt, salsas, cereales y pasteles, o incluso bebidas como té o refrescos (Gómez et al., 2013).

A fines del siglo XVII surgió la idea de que el azúcar es responsable de gran cantidad de enfermedades, con lo que surge la idea de sustituir al azúcar por otro aditivo. En tiempos modernos el consumo de edulcorantes ha incrementado tanto en su investigación como en su consumo, y debido a la demanda creciente de alimentos que posean sabores dulces, pero a su vez niveles de calorías reducidos. Entre los mayores inconvenientes se da que el azúcar es causante de diversas enfermedades, como son la caries dental, diabetes, afecciones intestinales incremento de obesidad o incluso carcinogénesis (Alejos, 2018).

2.3.3 Endulzantes no calóricos

2.3.3.1 Azúcar de coco

El azúcar de coco es un edulcorante que se obtiene a partir de la savia proveniente de la flor del coco, su proceso de obtención se basa en evaporación del agua presente en esta savia, presenta gran interés debido a que no posee químicos o preservantes añadidos, con lo cual se considera como sustituto natural del azúcar. Este endulzante natural presenta diversos beneficios para el ser humano, ya que posee grandes cantidades de minerales esenciales y vitaminas, por ejemplo, C, B1, B2, B3 y B6, así como potasio, calcio, magnesio, zinc y hierro. El azúcar de coco tiene un nivel glucémico reducido, con lo que califica como una opción viable para las personas que padecen diabetes, así mismo es un producto antioxidante, con lo cual sirve para reducir el envejecimiento (Garrido et al., 2022).

2.3.3.2 Stevia

La Stevia se considera como el mejor sustituto del azúcar, debido a que es más dulce y no presenta calorías. La Stevia es una planta que crece en forma de arbusto en Sudamérica, esta especie posee gran valor ya que es rica en glucósido, así como bajo en calorías, de igual manera presenta niveles de endulzante mayores a los presentados por el azúcar de caña. Haciendo una comparación, reduce el nivel de glucosa presente en la sangre en un 35%, presentando gran interés a nivel global. Entre los beneficios presenta cualidades endulzantes mayores a la glucosa o sacarosa, es antioxidante, sirve como diurético, ayuda a controlar la diabetes, controla el peso y la obesidad, hipertensión y posee efecto antibacteriano (Salvador et al., 2014).

2.3.4 Té negro

Es el tipo de té más tradicional en el mundo y el más popular en los países occidentales. Ampliamente usado para la elaboración de la kombucha, pues favorece en las condiciones ideales de fermentación y pH, convirtiéndose en materia prima predominante para la fermentación. Las células de levadura del SCOBY hidrolizan la sacarosa en glucosa y fructosa mediante la enzima invertasa generando etanol. El té negro genera mayores concentraciones de ácido glucónico, el cual es un ácido orgánico que se genera por la oxidación de la glucosa durante una fermentación aeróbica con la presencia de bacterias y hongos. Las bacterias acéticas, utilizan la glucosa y el etanol para producir ácido glucónico y ácido acético, respectivamente. El tiempo de fermentación, el tipo de materia prima y el microbiota nativo de SCOBY son los factores dependientes responsables de la formación de metabolitos funcionales durante la fermentación (Dutta & Paul, 2019).

2.4 Actividad probiótica de la bebida kombucha

En la bebida probiótica kombucha, las colonias de bacterias y levaduras se encuentran en simbiosis formando el microbiota con beneficios para la salud. Este conjunto de microorganismos difiere al depender de las condiciones en las que se encuentre el cultivo y de los sustratos que se utilice en la elaboración de la kombucha y también influirá la disposición de los compuestos que sintetizaran específicamente los microorganismos (Delgado, 2007).

La kombucha al estar compuesta por *Bacillus coagulans* (GBI-30 6086) o GanedenBC30, se la considera como una bebida probiótica. Debido a que se genera de manera natural por la relación simbiótica entre bacterias, levaduras que se encuentran en el SCOBY. En diversos estudios se evidencia clínicamente el efecto probiótico en la protección del tracto gastrointestinal frente a bacterias como *Helicobacter pylori*. Hay que recalcar que el efecto de las bacterias probióticas dependerá de la cepa inicial y de la capacidad de desarrollo sobre la biomasa aplicada al igual que la resistencia durante las condiciones de proceso y el almacenamiento (Villamar M., 2021).

2.5 Caracterización Físico -Química y Análisis Microbiológico

2.5.1 Cuantificación de azúcares

La relevancia de cuantificar azúcares consiste que al ser un producto alimenticio se compromete la seguridad del mismo, por lo cual es importante realizar análisis para calcular la cantidad de azúcar que presente la bebida, esto con el fin de que no presente un problema para la salud en el momento de su consumo (Partearroyo et al., 2013).

2.5.2 Determinación de pH

El pH es una cualidad fisicoquímica la cual determina los iones de hidrógeno libre que se encuentran concentrados en una sustancia, en medios líquidos existe un rango de pH que va de 0 a 14, debido a la constante de ionización del agua (Jesús et al., 2021).

El pH es una medida que se utiliza para determinar la acidez o alcalinidad de una sustancia. En el caso de la kombucha, un pH recomendable en su elaboración debe ser de 4.0 o incluso menos, este nivel se va a dar debido a la fermentación continua por un periodo de aproximadamente dos semanas, con lo cual la bebida va a tener un nivel regular de acidez (López et al., 2022).

2.5.3 Valoración de ácido acético

Este ácido es un compuesto líquido, originario de diversas frutas, en el ámbito industrial puede obtenerse de diversas formas, es decir por síntesis o de manera biológica. Al disolver este ácido en agua se obtiene el vinagre, sustancia utilizada con fines alimenticios, esta disolución puede tener concentraciones de 5% (Santillán, 2022).

2.5.4 Análisis Microbiológico

Dentro del territorio del Ecuador, y por las normas INEN, los productos fermentados lácticos para consumo humano deben ser pasteurizados o esterilizados, así mismo como manejarse en condiciones sanitarias indicadas por el Ministerio de salud pública; su aspecto debe ser uniforme y tanto el sabor como el olor deben presentar cualidades frescas, sin presencia de material extraño y con cualidades del color de la fruta o colorante aplicado. Como requisitos específicos se indica que este tipo de productos fermentados puede añadirse azúcares y/o frutas, con un mínimo de 5%. Especificando con la parte microbiológica, este análisis debe dar como resultado la ausencia de patógenos, metabolitos derivados o sus correspondientes toxinas (INEN, 2011).

Por su parte, las disposiciones presentadas acerca de los vinagres, indican que la elaboración de este tipo de productos debe ser realizada con materiales libres de mohos, sustancias extrañas e insectos, es permitida la adición de especias o derivados de especias así como la adición de aromatizantes de origen natural, durante la acetificación es permitido el uso de nutrientes, clarificantes o filtrantes, mientras que no se permite la adición directa de ácido acético que sea originario una fermentación relacionada con productos alimenticios; entre los requisitos de un vinagre debe tener aspecto limpio, color uniforme y en caso de ser un vino el mismo color de origen, olor específico característico y sabor del producto, en caso de ser un vinagre de alcohol el color puede tornarse amarillento. Con respecto a microorganismos un vinagre debe carecer de patógenos, aerobios mesófilos, coliformes, bacterias acidúricas, mohos y/o levaduras, así como de sustancias que puedan alterar la salud (INEN, 2013).

Al ser un producto con fin alimenticio es necesario realizar una serie de análisis con el fin de determinar las cantidades microorganismos presentes en el medio.

Para la cuantificación de coliformes totales es necesario el uso del medio Chromocult, el cual es un agar o medio de cultivo que se utiliza para comprobar el crecimiento de bacterias pertenecientes a este grupo, como *E. coli*. (Byamukama et al., 2000).

El agar plata por su parte permite la cuantificación de bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*, o aerobios totales, es importante este control ya que este tipo de bacterias pueden causar infecciones severas (Molitor et al., 2020).

Por su parte, el agar PDA nos facilita la cuantificación de mohos y levaduras presentes, que de igual manera al ser ingeridas pueden presentar un problema para la salud (Xu et al., 2008).

3 Materiales y métodos

3.1 Enfoque de la investigación

Como punto principal se realizó la bebida kombucha utilizando azúcares no calóricos como fuente principal de carbono, esto se elaboró utilizando la azúcar respectiva, ya sea Stevia o de coco, en cada tratamiento distinto para lograr comprobar las diferencias en el resultado.

La investigación que se llevó a cabo fue experimental, al realizarse análisis de laboratorio para determinar respuestas experimentales durante la fermentación con diversos endulzantes: tiempo de fermentación, pH, temperatura, incremento de peso en la biomasa, cuantificación de azúcares, concentración ácido acético y análisis microbiológico; donde los resultados permiten analizar los tratamientos más efectivos y con características organolépticas para determinar a la kombucha como una bebida probiótica.

3.2 Diseño de investigación

El diseño de esta investigación es experimental. El desarrollo de esta investigación la elaboración de 4 tratamientos que nos dan como resultado la obtención de la bebida kombucha, se manejaron variaciones de sacarosa, a los cuales se les añadió concentraciones fijas de organismos probióticos, siendo este el SCOBY. Por los productos metabólicos propios de la fermentación la cual va incidiendo en el sabor del producto, se programó su evaluación sensorial a los 14 días posteriores a su elaboración. El panel sensorial fue conformado por 20 personas no entrenadas, los mismos que establecieron una selección de mejor característica organoléptica como son olor, sabor, color y consistencia. Para la calificación de las formulaciones que fueron presentados en una cantidad de 50 mL. Posteriormente se evaluó las características mediante análisis físico químicos como pH, temperatura, incremento de peso en la biomasa, contenido alcohólico o porcentaje de ácido acético y azúcares totales de la bebida junto a los análisis

microbiológicos como recuento de aerobios totales, coliformes totales, mohos y levaduras. Y el recuento de probióticos los cuales se compararon con las especificaciones señaladas en la norma NTE INEN 2395:2011, que indica los requisitos para leches fermentadas.

3.3 Operacionalización de Variables

3.3.1 Variable Independiente

Tabla 3 Concentración de sustratos

Conceptualización	Dimensiones	Indicadores	Instrumentos
Concentración de sustratos	g/L Azúcar blanca de caña	Tiempo de la fermentación de la bebida	Cuantificación de tiempo con Reloj (Días)
	g/L Azúcar de Coco		
	g/L Azúcar + Stevia		
	g/L Sin azúcar		

Elaborado por: (Los autores,2023)

3.3.2 Variable Dependiente

Tabla 4 Características físico-químicas de la bebida

Conceptualización	Dimensiones	Indicadores	Instrumentos
Características físico-químicas y análisis microbiológico de la bebida	pH	T°, pH, peso húmedo SCOBY, curva de calibración, determinación grado de acidez de la kombucha	Potenciómetro, termómetro de mercurio, Balanza semi analítica, Método Fenol – Sulfúrico, Volumetría ácido – base con fenolftaleína
	Temperatura		
	Peso húmedo [g]		
	Cuantificación de azúcares		
	Cuantificación ácido acético		
	Análisis microbiológico		
	Características sensoriales		
	Concentración de microorganismo probióticos		

Elaborado por: (Los autores,2023)

3.4 Procedimiento y Análisis

3.4.1 Propagación en caldo líquido de las películas SCOBY de “kombucha” para la investigación.

Se elaboro un caldo de cultivo líquido estándar para la propagación de las películas SCOBY de “kombucha” necesaria para 12 unidades experimentales, el que contenía: para 2 L de agua, 150g/L de azúcar blanca de caña, Té negro 10 g/L (3 bolsas de té) y películas de SCOBY de “kombucha” (inóculo) 100 g/L = 1 película/envase al igual que 5mL del cultivo indicar, siendo este la kombucha de un lote anterior (Villamar M., 2021).

En envases de vidrio de 1,5 litros de capacidad, se preparó un litro de caldo de cultivo por cada envase a modo de biorreactor, esto con la concentración de los ingredientes de la recta estándar de propagación, posteriormente se inoculó una película de kombucha de aproximadamente 100 g y 5 mL de cultivo indicador, posteriormente se fermentó la bebida a temperatura ambiente en dichos biorreactores durante 14 días hasta multiplicar la simbiosis.

3.4.2 Determinación de tratamientos para la fermentación en base a los factores de estudio

3.4.2.1 Diseño Experimental

En el trabajo de investigación se aplicó un diseño de investigación experimental. Donde se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con el uso de 4 tratamientos de bebida kombucha por triplicado, con distintas formulaciones como se presentan en la Tabla 5. Las cuales consistieron en la evaluación sensorial de parámetros organolépticos y características físico químicas. Con el enfoque de identificar al tratamiento que presente las características organolépticas de mayor aceptación y como influyen las características físico químicas analizadas.

Tabla 5 Tratamientos y formulación

FORMULACIÓN	T1 Azúcar Blanca	T2 Azúcar de Coco	T3 Azúcar + Stevia	T4 Sin Endulzante
Té negro	20%	20%	20%	40%
Endulzantes	20%	20%	20%	-
Agua Potable	40%	40%	40%	40%
Cultivo iniciador	15%	15%	15%	15%
SCOBY	5%	5%	5%	5%
TOTAL	100%	100%	100%	100%

Elaborado por: (Los autores,2023)

3.5 Procedimiento para los tratamientos

Se preparó el caldo de cultivo en una olla para 4L de agua en función del tratamiento y réplicas correspondientes. Posterior a este se fermentó la bebida se mantendrá a temperatura ambiente en envases de vidrio de 1,5 L de volumen, durante 14 días controlando que el pH este en un rango de 3,5 – 4,5.

Se inicia con la mezcla de los envases contenedores de la bebida cuidadosamente hasta una homogeneización completa. Se calibró el potenciómetro OAKTON PC700 pH Meter con las soluciones reguladoras de: buffers USA y NIST (Lobov científica, 2020). Después en un vaso de precipitación de 50 mL, se toma una porción de la muestra ya preparada y se ajustó la temperatura a 20°C, y se procedió a sumergir el electrodo OAKTON PC700 pH Meter; en la muestra de manera que lo cubra perfectamente y se lo mantiene por 3min. Para finalizar se registra la medición del pH, para después sacar el electrodo y lavarlo con agua destilada.

Para medir la temperatura, colocamos en un vaso de precipitación de 50 mL una porción de la muestra ya preparada y se introduce el termómetro de mercurio, se dejó durante 3-5 minutos, para su posterior lectura, después de registrar la temperatura, se procedió a lavar con agua destilada.

En la determinación de biomasa, se realizó la medición de espesor con ayuda de un calibrador. Se inicio con la desinfección de la cabina de flujo, ya que se debe manipular al SCOBY con todas las medidas estériles, procedemos a sacar el SCOBY del envase con unas pinzas estériles y lo colocamos en una caja Petri estéril, con el calibrador medimos tres lados de la zooglea este procedimiento para cada una de las repeticiones y se calculó la ganancia de peso en relación con la inicial, con una diferencia de 14 días de medición.

3.6 Cuantificación de azúcares – Método Fenol – Sulfúrico

Para la concentración de azúcares totales se determinó a través de una curva de calibración de la absorbancia en función de la concentración. Se prepararon soluciones de 1g/L utilizando la sacarosa como estándar. Como blanco para las lecturas en el espectrofotómetro se utilizó agua destilada aplicándole el mismo tratamiento. Para así realizar el método Dubois, (Método Fenol-Sulfúrico), se mezclaron 0,4 mL de muestra de kombucha, con 0,1 mL de fenol al 5% en tubos de ensayo. A los tubos se les añadieron 0,5 mL de H₂SO₄ al 10%, se dejaron reposar por 30 min y se analizaron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm. Los ensayos fueron realizados por triplicado para obtener valores promedios (Ávila Núñez et al., 2012).

3.7 Valoración de ácido acético

La determinación del ácido acético, se realizó mediante una volumetría ácido-base con fenolftaleína siendo este el indicador. Se inicio con una medición de 10 mL de kombucha en un matraz Erlenmeyer de 100 ml y se procedió a diluirlo con 15 ml de agua, inmediatamente se añadió 3 gotas de fenolftaleína. La fenolftaleína es incolora con un pH por debajo de 8,2, invirtiendo a un color violeta intenso por encima de pH 10,0. Luego se llena la bureta con disolución de NaOH con concentración (1,0 M). Después del montaje, se comenzó a valorar vertiendo lentamente la disolución de hidróxido de sodio sobre la kombucha, y se agita el matraz. Este paso de vertido se continuó hasta que el indicador vire a un color violeta intenso. Para finalizar se cerró la bureta y se midió el volumen de disolución vertida. Para así al conocer el volumen de disolución de base añadida, y la concentración, se calcula los moles de NaOH necesarios para neutralizar el ácido (Villar et al., n.d.).

Los datos porcentuales fueron obtenidos por la neutralización del ácido acético por parte del hidróxido de sodio:



$$ml \text{ de base utilizada} * \frac{\text{moles NaOH}}{\text{ml base añadida}} = \text{moles NaOH}$$

$$\frac{\text{moles NaOH}}{\text{ml vinagre}} * \frac{\text{ml vinagre total}}{\text{L vinagre total}} = M \text{ de NaOH}$$

$$\frac{M \text{ de NaOH}}{\text{L vinagre total}} * \frac{60,0 \text{ g CH}_3\text{COOH}}{\text{moles CH}_3\text{COOH}} = \text{concentración} \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

$$\text{concentración} \frac{\text{g}}{\text{L}} = \text{porcentaje de acidez}$$

Ecuación 1. Cuantificación de ácido acético

3.8 Análisis microbiológico

Para nuestra evaluación el objetivo es evaluar la presencia de aerobios totales, coliformes, y levaduras, para lo cual se utilizaron medios de cultivo aislado, en este caso Agar Plate, Chromocult, y PDA, correspondientemente para cada microorganismo objetivo.

3.8.1 Preparación de medios de cultivo

Para preparar el medio Agar Plate se utilizaron 22,5 gramos en un litro de agua destilada, se diluyó el medio en el agua hasta tener un líquido traslúcido, posteriormente se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos (Millipore, 2023).

Para el conteo de aerobios se utilizaron las especificaciones INEN 1529-7, donde se indica que, a modo de resultados, en alimentos se permiten presencias de microorganismos en 10^2 UFC/mL, para lo cual se colocó en incubación durante 48 horas a 37 °C (Villamar, 2021).

La preparación del medio Chromocult para evaluar presencia de coliformes fue un poco más complicado, esto debido a que primero se esterilizó el litro de agua destilada de la preparación ya que se trata de un agar termolábil, posteriormente cuando se enfrió a una temperatura de 55 °C se añadieron 26,5 gramos del medio y se disolvió, posteriormente se hirvió el líquido con el fin de reactivar este medio de cultivo. Este medio de cultivo presenta resultados con colonias de color azul para *E. coli* o colonias de color violeta para señalar presencia de coliformes, estos resultados son visibles después de 48 horas de incubación a 37 °C (Millipore, 2014).

Al preparar el medio PDA se necesitaron 39 gramos disueltos en un litro de agua destilada, después de la disolución se calienta hasta que este medio esté disuelto completamente y se procede a esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C. Este medio de cultivo permite visualizar la presencia de levaduras, y debido a que este es uno de los componentes principales en la kombucha y el SCOBY, es fundamental su cuantificación, estas colonias van a tener un color blanquecino (Millipore, 2006).

Una vez preparados los tres medios de cultivo, se dispensan en cajas Petri de plástico, colocando aproximadamente 25 mL en cada una.

3.8.2 Diluciones seriadas

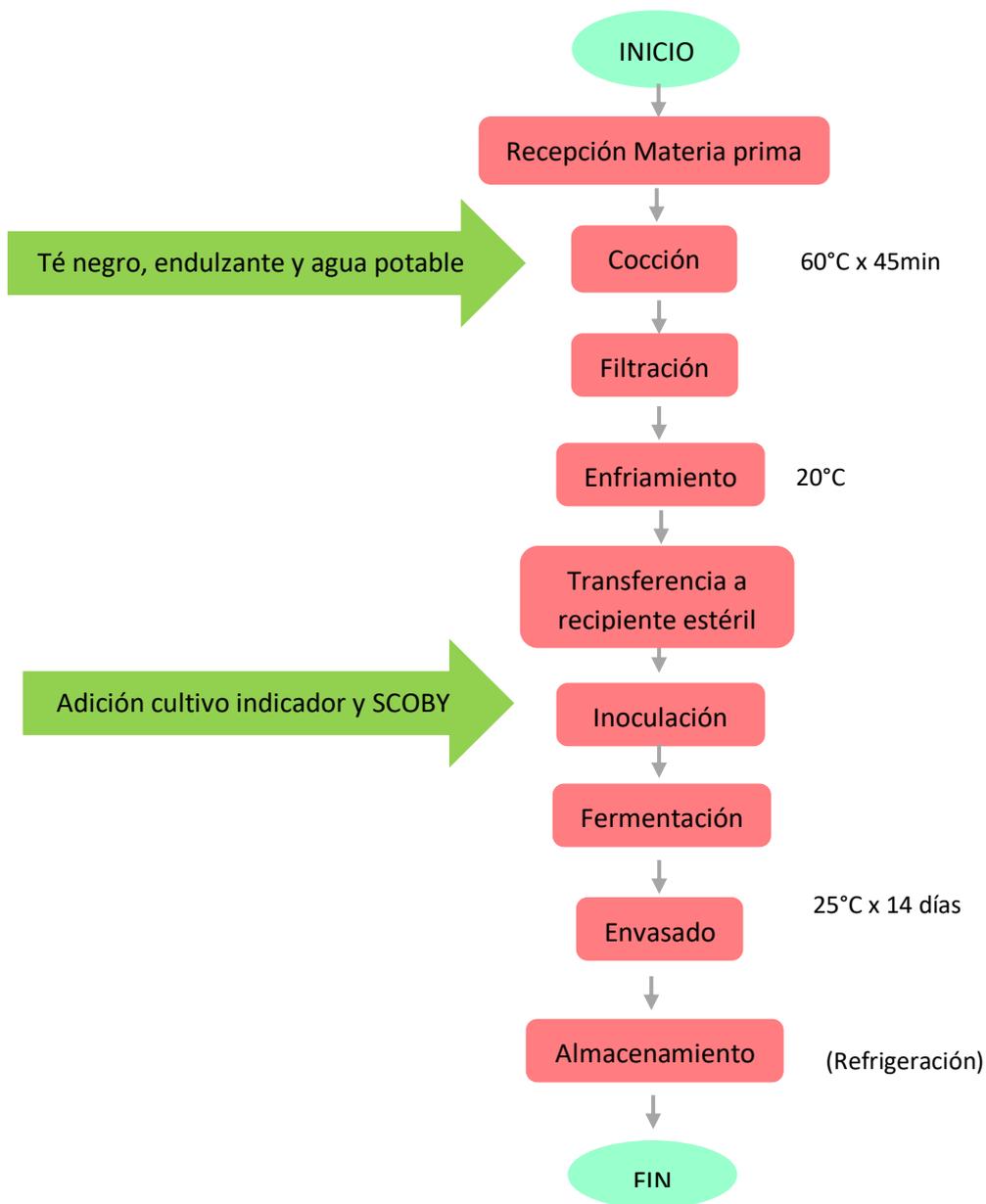
Esta técnica nos permite la preparación de diluciones con concentraciones reducidas, esto con el fin de obtener resultados de siembra cuantificables y contables que, de otra manera, no sería posible. Para estas reducciones o diluciones se usa agua de peptona tamponada. Se disolvieron 25.5 gramos de agua peptona en un litro de agua destilada, se calienta hasta disolver y cuando se haya disuelto correctamente se esteriliza durante 15 minutos a 121 °C en el autoclave (Millipore, 2019). Una vez se tenga el agua peptona estéril a temperatura ambiente, se colocan 90 mL con 10 mL del líquido de la kombucha y se mezcla, en un tubo de ensayo se colocan 9 mL de agua peptona con 1 mL de la dilución previamente preparada para tener una dilución -1, en un nuevo tubo de ensayo se colocan otros 9 mL de agua peptona con 1 mL de la dilución

preparada en el tubo de ensayo anterior teniendo una dilución -2, se repite este proceso sucesivamente hasta llegar a una dilución de -9 (Rondón et al., 2008).

3.8.3 Siembra

Por cada tipo de glucosa utilizada se realizan tres tratamientos distintos, con diferentes masas de SCOBY en cada tratamiento de cada tipo de glucosa. Para la siembra se coloca 1 mL de la dilución -9 preparada con el agua peptona en cada caja Petri utilizando una micropipeta de 1000 microlitros, después se esparce el líquido vertido sobre toda la superficie del medio de cultivo con ayuda de un asa de vidrio. Este procedimiento se aplica colocando todos los tratamientos de todos los tipos de glucosa en los tres distintos medios de cultivo.

3.9 Diagrama de flujo para la elaboración de una bebida de kombucha



Elaborado por: (Los autores,2023)

3.10 Análisis Estadístico

Se utilizó para este análisis un Diseño Completamente al Azar (DCA) de 3 tratamientos y 20 repeticiones (panelistas), ejecutando una encuesta en el programa Google sforms, para determinar el tratamiento de mayor aceptación, por medio de pruebas sensoriales (**Error! Reference source not found.**); evaluando los parámetros organolépticos: color, olor, sabor y consistencia.

Tabla 6 Parámetros organolépticos

Característica Organoléptica (OLOR-COLOR-SABOR-CONSISTENCIA)
Azúcar blanca
Azúcar de coco
Azúcar Stevia

Elaborado por: (Los autores, 2023)

3.11 ANOVA y prueba de Tukey

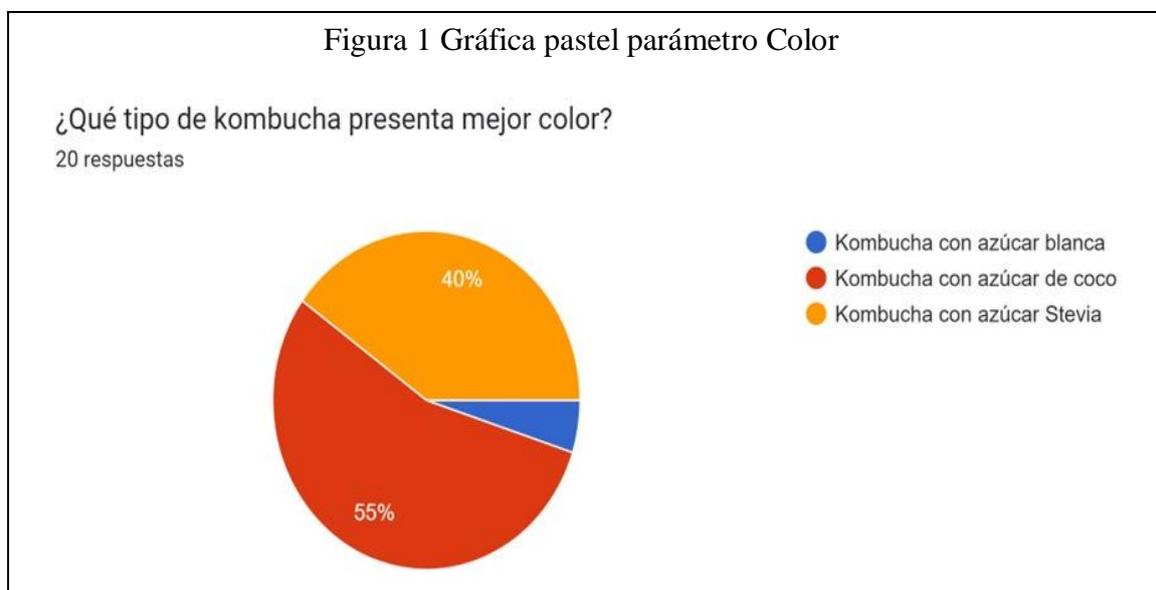
Para la comprobación del crecimiento de la biomasa se realizó mediante el espesor del consorcio SCOBY y la cuantificación del consumo de azúcar, se ejecutó un análisis de varianza (ANOVA) con la prueba de Tukey al 5% de probabilidad para determinar la diferencia significativa entre tratamientos para la propagación y consumo de la bebida kombucha.

4 Resultados y Discusión

4.1 Determinación del tratamiento con mejor aceptación de kombucha por parámetros organolépticos.

Los parámetros organolépticos como el color, sabor, olor y consistencia de los 3 tratamientos de bebidas fueron evaluados por un panel sensorial conformado por 20 panelistas no especializados. Los datos obtenidos fueron interpretados por la de gráfica pastel.

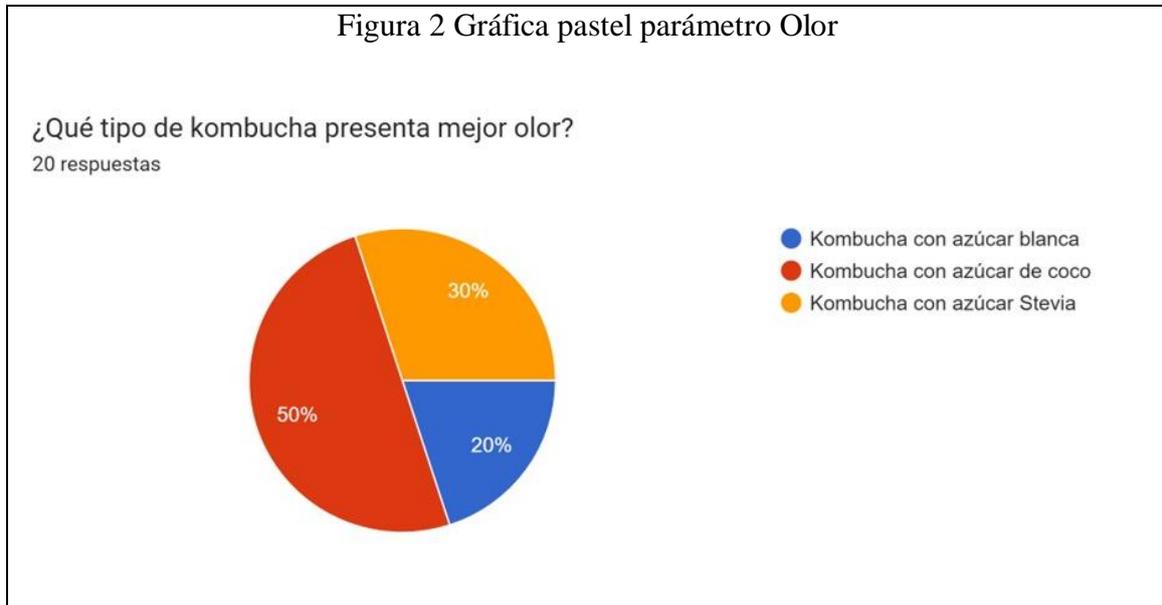
En la Figura 1, se observa el tratamiento con azúcar de coco es el de mayor aceptación para el parámetro de color con un 55%, seguido del tratamiento de azúcar Stevia con un 40%, y por último el tratamiento de azúcar blanca con 5% de aceptación.



Elaborado por: (Los autores,2023)

En la Figura 2, se logra determinar que el tratamiento con azúcar de coco presenta mayor aceptación para el parámetro olor con un 50%, en segundo lugar, se encuentra el tratamiento con azúcar Stevia con 30% y por último el tratamiento con azúcar blanca con 20% de aceptación.

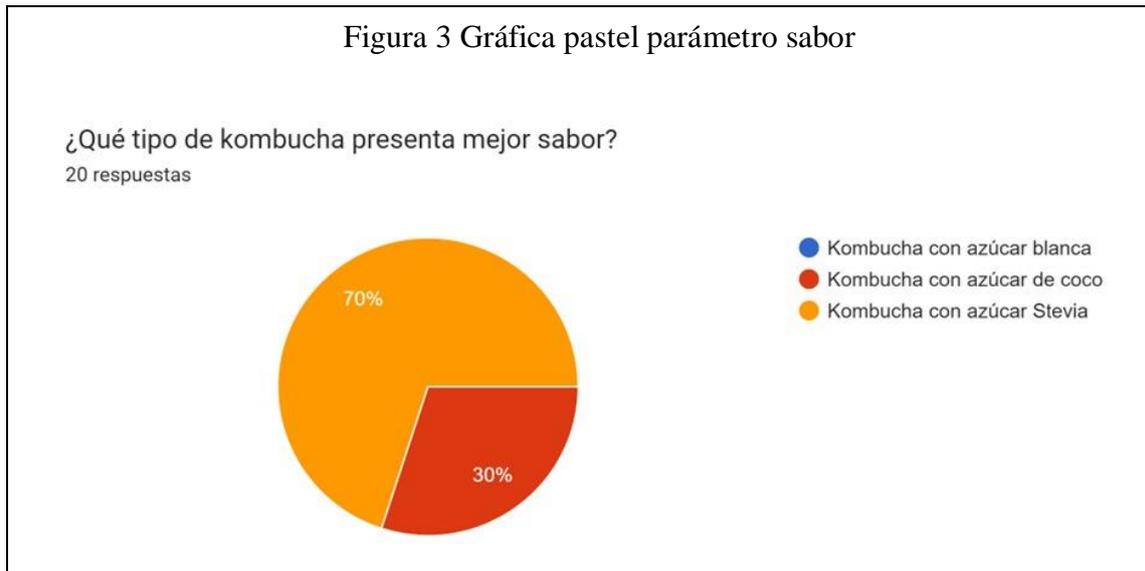
Figura 2 Gráfica pastel parámetro Olor



Elaborado por: (Los autores,2023)

En la Figura 3, se logra determinar que el tratamiento con azúcar Stevia presenta mayor aceptación para el parámetro de sabor con un 70%, en segundo lugar, el tratamiento con azúcar de como con 30% y por último el tratamiento con azúcar blanca con un 0% de aceptación.

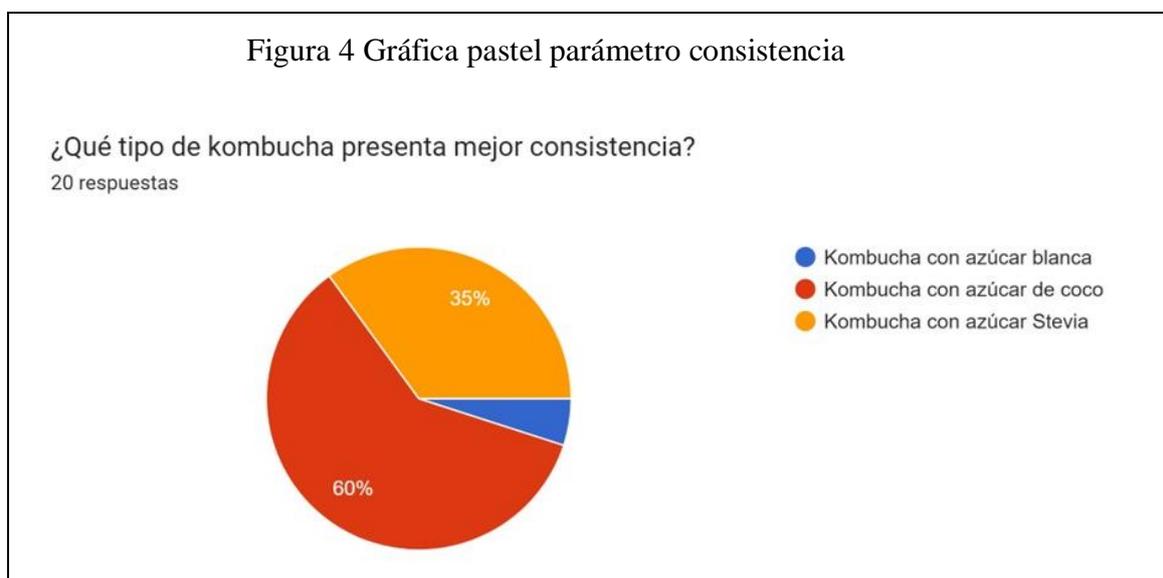
Figura 3 Gráfica pastel parámetro sabor



Elaborado por: (Los autores,2023)

A partir de la Figura 4, se logra determinar que el tratamiento con azúcar de coco presenta mayor aceptación para el parámetro consistencia con un 60%, en segundo lugar, el tratamiento con azúcar Stevia con 35% y por último el tratamiento con azúcar blanca con 5% de aceptación.

Figura 4 Gráfica pastel parámetro consistencia



Elaborado por: (Los autores,2023)

Teniendo estos valores podemos determinar que el tratamiento con mayor aceptación de manera general es el realizado con azúcar de coco, presentando mayor relevancia en tres de los cuatro parámetros organolépticos evaluados, teniendo en segundo lugar al azúcar Stevia con mayor relevancia solamente en el parámetro de sabor, de esta forma podemos interpretar, en manera general, que el tratamiento con azúcar de coco posee mayor aceptación entre los panelistas.

4.2 Cuantificación consumo de sustrato mediante la técnica de fenol ácido.

Para la cuantificación de consumo de sustrato o cuantificación de azúcares, se trabajó con los datos de ABS (absorbancia); de los días 1, 7 y 14 de la fermentación de los triplicados de cada tratamiento para determinar la diferencia de consumo entre tratamientos (Anexo 3).

Para la obtención de datos se inicia con la transformación de los datos de ABS a mg/mL (Anexo 4), con la base de la ecuación;

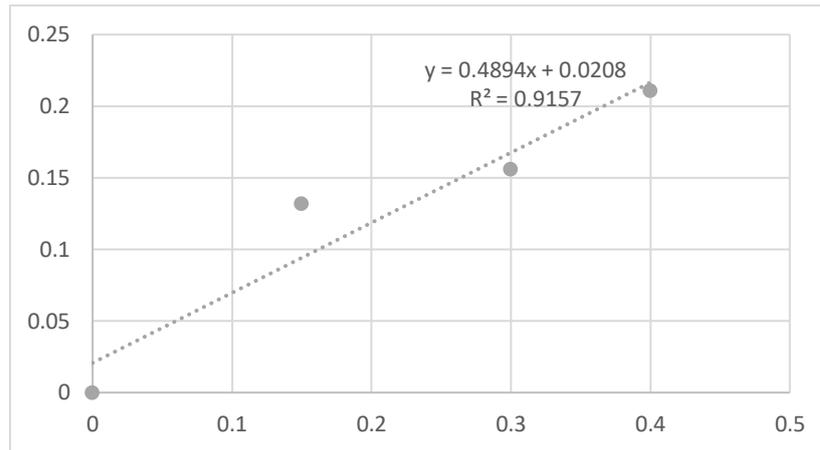
$$Y = 0,4894 x - 0,0208$$

Que se obtiene en la curva patrón de glucosa, (Figura 5); donde se determina:

Y= concentración (mg/mL)

X= absorbancia.

Figura 5 Curva Patrón Glucosa



Elaborado por: (Los autores,2023)

Al obtener los datos en mg/mL de cada tratamiento, se realiza el cálculo del área bajo la curva de cada triplicado por día de fermentación inicial, media y final. Posterior a esto se suma los datos obtenidos del área bajo la curva (Tabla 7) y realizamos un ANOVA y prueba de Tukey al 5%; en el programa estadístico Infostat y Excel, para determinar la diferencia significativa entre tratamiento en relación al consumo de sustrato.

Tabla 7 Áreas bajo la curva (sumatoria) - Consumo de sustrato

Áreas Bajo la Curva			
T1 Azúcar Blanca	T2 Azúcar de coco	T3 Azúcar + Stevia	T4 Sin endulzante
1,42	4,46	1,50	0,89
1,34	5,18	1,90	0,98
1,78	4,90	1,98	1,26
\bar{x} 1,51	\bar{x} 4,84	\bar{x} 1,79	\bar{x} 1,04

Elaborado por: (Los autores,2023)

Nota: T1- tratamiento 1, T2 – tratamiento 2, T3 – tratamiento 3, T4 – tratamiento 4 y \bar{x} - promedio.

4.2.1 ANOVA Cuantificación consumo de sustrato

Tabla 8 Análisis de varianza - Consumo de sustrato

Origen de las variaciones	SM	Grados de libertad	CM	F	p-valor	Valor crítico para F
Tratamientos	26,80	3	8,93	121,51	<0,0001	4,06

Elaborado por: (Los autores,2023)

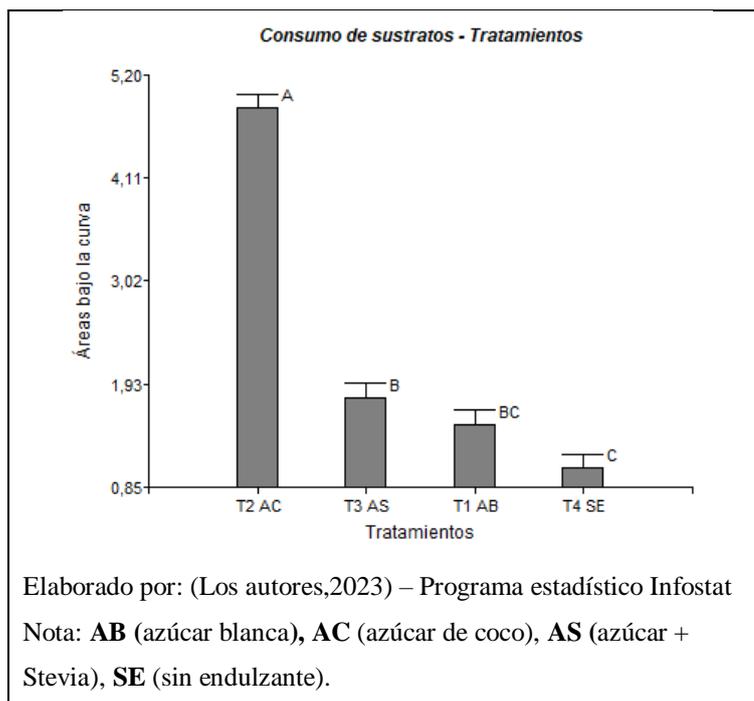
En la Tabla 8, se tiene el resultado del análisis de varianza (ANOVA), donde se observa que el **p- valor** es de <0,0001 y **valor crítico para F** (4,06) es menor que **F** (121,51). Lo que indica que

existe una diferencia significativa entre tratamientos con referencia al consumo de sustratos como son endulzante común y endulzantes no calóricos.

4.2.2 Prueba de Tukey para la cuantificación de consumo de sustrato

Para lograr determinar que tratamiento es el que presenta un mayor consumo de sustrato en base a la cuantificación de azúcares, se realizó la prueba de Tukey al 5%, la nos indicara la diferencia de las medias entre tratamientos.

Figura 6 Análisis de medias entre tratamientos por consumo de sustratos



Al observar la Figura 6, se observa distintas letras **A**, **B**, **C** lo que nos indica que hay diferencia entre las medias del área bajo la curva en relación a los tratamientos. Por lo que se interpreta que el mayor consumo de sustrato se da en “**A**” el T2 AC, el segundo en un menor consumo de sustrato es “**B**” T3 AS, y en “**C**” tenemos a T4 SE donde el consumo de sustrato es muy mínimo. Para el T1 AB, se encuentra en “**B** y **C**”, los que se indica que las medias están entre menor y mínimo consumo de sustrato.

Según el análisis realizado por (Kluz et al., 2022), se puede observar una similitud entre resultados, donde se indica que en los experimentos realizados se tiene mayor índice de consumo de sustrato en los tratamientos en los que se aplicaron azúcar de coco, teniendo una diferencia significativa de disminución de azúcares al paso de dos semanas de fermentación, comparándose con los tratamientos en los que se aplicó azúcar blanca, teniendo en ese caso un consumo de

sustrato menor. El incremento en la cantidad de azúcar consumida se debe al proceso de hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa por parte de las levaduras presentes en el SCOBY.

4.3 Caracterización físico-química

En la Tabla 9, se presenta los valores obtenidos de las características físico químicas de pH, espesor y porcentaje de acidez de los tres diferentes tratamientos empleados con distintos endulzantes.

Tabla 9 Evaluación características físico químicas de la bebida probiótica kombucha

Inicio			
Fuente de carbono	pH	Espesor (mm)	Porcentaje de ácido acético
Azúcar blanca	5,22 ± 0,20	1,43 ± 0,86	0,012% ± 4,58E-05
Azúcar de coco	5,51 ± 0,20	2,52 ± 0,86	0,006% ± 4,58E-05
Azúcar Stevia	5,23 ± 0,20	3,13 ± 0,86	0,003% ± 4,58E-05
Final			
Azúcar blanca	3,86 ± 0,58	1,84 ± 0,84	0,0510% ± 0,000128
Azúcar de coco	4,76 ± 0,58	3,11 ± 0,84	0,03% ± 0,000128
Azúcar Stevia	3,65 ± 0,58	3,44 ± 0,84	0,0276% ± 0,000128

Elaborado por: (Los autores,2023)

4.3.1 Evaluación característica pH

Al evaluar el pH tenemos, en los tres tratamientos que empieza con un promedio de 5,22, este valor al paso de las dos semanas disminuye, teniendo como el valor más elevado al azúcar de coco con valor de 4,76, luego al azúcar blanca con valor de 3,86 y por último con menor valor el azúcar Stevia con 3,65. Se puede determinar que, a pesar que el valor obtenido de azúcar de coco termina siendo el más elevado, entra en las normativas al igual que los otros tratamientos, siendo un resultado válido para la obtención de kombucha de buena calidad.

El valor obtenido del tratamiento de azúcar de coco, en pH fue de 4,76, indicado en la Tabla 9. Estos valores se encuentran dentro de los parámetros establecidos por la normativa, y da como indicación el hecho de que es un producto viable para su correspondiente consumo. Así mismo, este valor de pH es similar al obtenido por López et al., 2022, la única diferencia se establece en que en el procedimiento fue utilizado el limón con el objetivo de reducir con mayor facilidad y rapidez el pH, así como su acidez.

4.3.2 Evaluación característica espesor

Para la característica de espesor, en el cual se puede observar un crecimiento relativamente similar, en el cual hay crecimiento por parte de la zooglea en los cuatro diferentes tratamientos, en donde el mayor índice de aumento de espesor se da en la azúcar + Stevia. En este caso el espesor sirve para medir cuál de los tratamientos podrían llegar a ser más significativos para una producción en masa, ya que partir de un tratamiento en el que se dé más crecimiento podemos obtener mayor cantidad de producción a largo plazo.

Para la obtención de estos resultados, se utilizó de los triplicados de cada tratamiento al que presenta mayor crecimiento de las medidas realizadas por el calibrador.

Tabla 10 Valores de crecimiento biomasa final SCOBY (espesor)

T1 Azúcar blanca	T2 Azúcar de coco	T3 Azúcar + Stevia	T4 Sin azúcar
2,77mm	2,82mm	4,62mm	1,42mm
4,7mm	4,5mm	3,93mm	1,31mm
1,32mm	2,18mm	3,55mm	1,97mm
\bar{x} 2,93	\bar{x} 3,17	\bar{x} 4,03	\bar{x} 1,57

Elaborado por: (Los autores,2023)

Nota: **T1**- tratamiento 1, **T2** – tratamiento 2, **T3** – tratamiento 3, **T4** – tratamiento 4 y \bar{x} - promedio.

4.3.2.1 ANOVA para la característica de espesor

Tabla 11 Análisis de varianza (Espesor)

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>SM</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>p-valor</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Tratamientos	9,39	3	3,13	2,64	0,120	4,06

Elaborada por: (Los autores, 2023)

A partir del análisis de varianza (ANOVA) de la Tabla 11, realizada en el programa estadístico Infostat (Anexo #), se puede determinar que no existe diferencia significativa entre tratamientos con respecto a la característica de espesor, debido a que el **p- valor** obtenido es $>0,05$, siendo este de 0,12; al igual que el **valor crítico para F** (4,06) es mayor que **F** (2,64). Este resultado nos indica que el uso de endulzantes no calóricos, mantiene de manera estable a la zooglea SCOBY, mas no la beneficia en el crecimiento de biomasa del SCOBY significativamente.

4.3.3 Evaluación porcentaje ácido acético

Como tercer parámetro tenemos al ácido acético, el cual igualmente en los tres parámetros no se presenta diferencia significativa, dando como resultado en este caso el mayor índice de

crecimiento, o mayor incremento de porcentaje de ácido acético en el azúcar de coco. Este factor nos ayuda a tener en cuenta la acidez presente en la bebida, este es un factor que puede llegar a tener relación con el parámetro de sabor ya que afecta directamente a esta característica, interviniendo con la aceptación por parte del público. De igual manera que los resultados de López et al., 2022, los porcentajes de acidez, o de ácido acético, son inferiores incluso al 1%, siendo de esta manera una bebida probiótica, benéfica para la salud, con propiedades medicinales, y con un índice muy reducido de ácidos, con lo cual puede llegar a ser un producto de gran interés para nuevas generaciones.

En estos tres parámetros, a pesar de que otorgan resultados relativamente similares, el único valor que debe mantenerse en consideración es la acidez, ya que a partir de aquí se pueden realizar tratamientos para incrementar o disminuir este valor con el fin de tener un sabor más aceptable por parte de los consumidores.

El cambio de color del indicador nos indica el punto final de la valoración. Como resultado de que el ácido ha sido neutralizado por la base. En ese momento, y se agrega una gota de base en exceso y el pH alcanza valores mayores de diez generando así el cambio de color del indicador llegue a una tonalidad vino-violeta (Anexo #) (Ignacio, n.d.).

Con respecto al porcentaje de ácido acético tenemos la normativa NTE INEN 2296:2013 con respecto a vinagres, en este caso también se puede corroborar que la bebida cumple con los límites máximos de 6%, teniendo valores incluso menores al 1%, con lo cual al consumir la bebida kombucha no presenta problemas por consumo excesivo de ácido acético, demostrando que se trata de una bebida que no llegaría a causar problemas para la salud (INEN, 2013).

A continuación, se presenta las gráficas donde se demuestra el incremento de porcentaje de ácido acético, al transcurrir los 14 días de fermentación de los tratamientos.

Figura 7 Porcentaje de ácido acético – T1 azúcar blanca

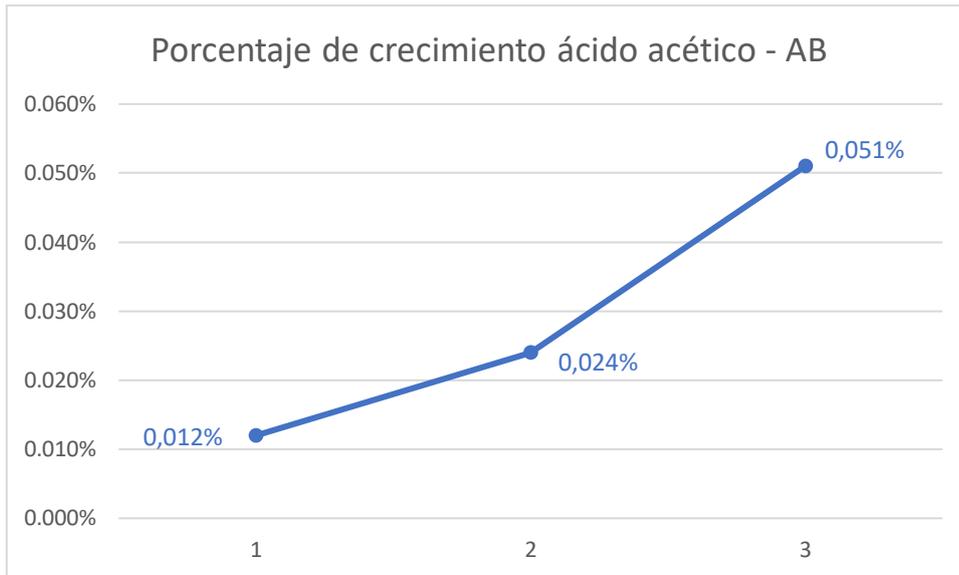


Figura 8 Porcentaje de ácido acético -T2 azúcar de coco

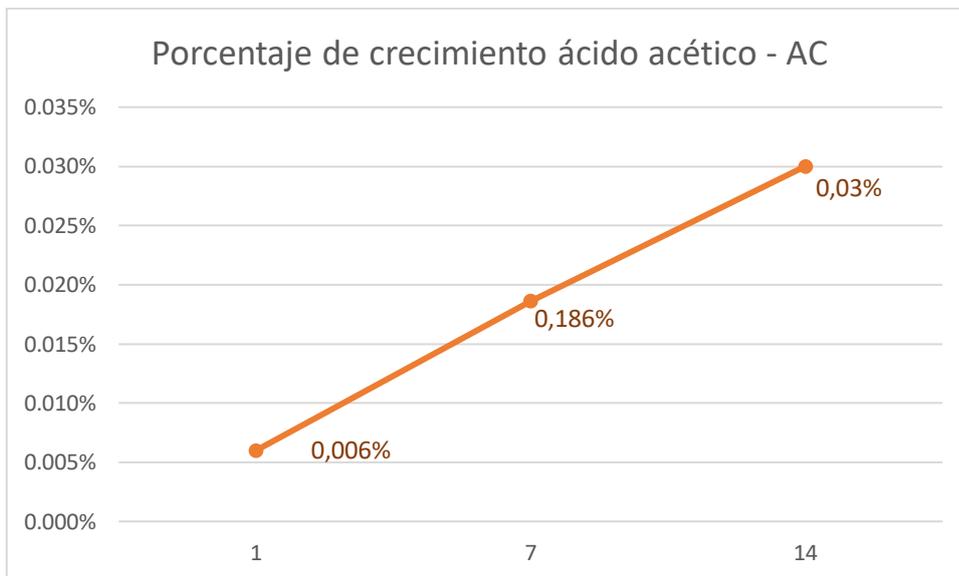
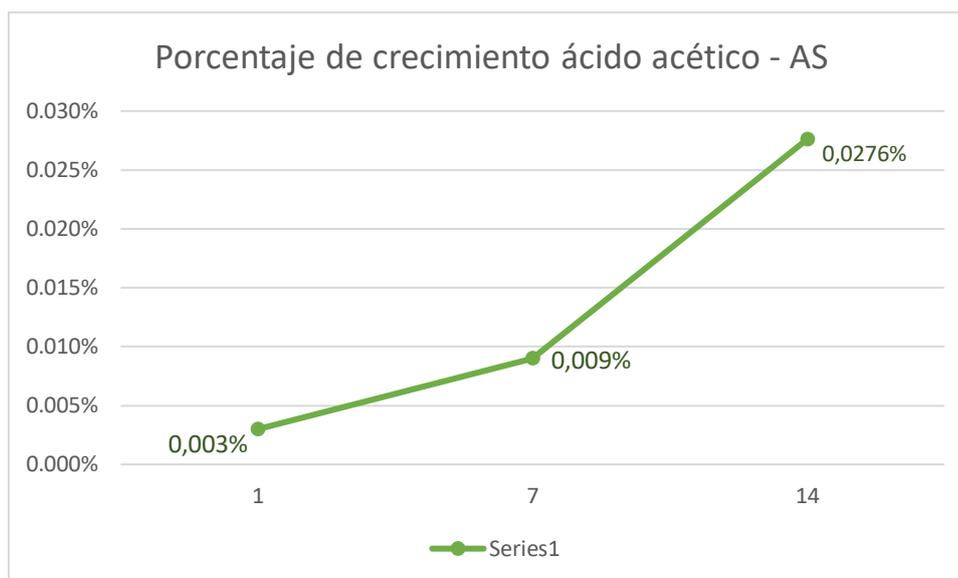


Figura 9 Porcentaje de ácido acético -T3 azúcar + Stevia



Elaborado por: (Los autores,2023)

En las Figuras 5,6 y 7 presentadas; se puede observar que, al pasar el periodo de dos semanas (14 días) que dura la producción de la bebida, existe un incremento en el porcentaje de ácido acético presente en la bebida. A pesar de que estos valores son minúsculos, de igual manera es necesario indicar que si existe un aumento en la cantidad inicial existente de esta característica.

4.4 Crecimiento de *Penicillium* sp. en la elaboración de la bebida probiótica kombucha, en el tratamiento 4 – sin endulzante.

Durante el control de tratamientos se constató una contaminación en parte superior del té, generando una zooglea, con indicios de contaminación ambiental. ya que presentaba una morfología distinta al SCOBY, como se puede observar en el (Anexo 11). Esta contaminación del tratamiento inicia pasado las 72 horas de fermentación; esta zooglea tiene características macroscópicas; con colonias verdosas, grisáceas y microscópicas de conidióforos, métulas, filiales y conidios característicos que coinciden con el género *Penicillium spp.* Después del análisis microbiológico con azul de lactofenol, se obtuvo como resultado que existió la presencia de *Penicillium spp.* Ya que se confirmó su morfología microscópica (Anexo 11) coincide con la del género *Penicillium spp.*

Siendo, *Penicillium* un hongo filamentoso, que se lo considera ubicuo por encontrarse distribuido en diversos hábitats como son suelos, vegetaciones, ambientes húmedos, aire y ciertos alimentos. Este hongo está distribuido mundialmente, por tal motivo es que las especies del género *Penicillium* crecen en ambientes extremos como bajas y altas temperaturas, bajos niveles de oxígeno y acidez, altas concentraciones de azúcar y sales (Srinivasan et al., 2020). También, a

Penicillium spp. se los considera saprofíticos ambientales, ya que se caracterizan por alimentarse de materia en descomposición (Basantes Ruiz, 2022).

Se confirmo, que la contaminación y descarte de la investigación al Tratamiento 4-Sin azúcar; fue causada por la presencia de *Penicillium spp.*, debido a que sus características macroscópicas y microscópicas son iguales a las analizadas. Macroscópicamente las colonias de *Penicillium* expresan un color blanco al iniciar el crecimiento, y el color va variando de verdoso, azul verdoso, grisáceo o mantenerse en blanco al madurar el hongo, el crecimiento de estas colonias es rápido. Microscópicamente, la estructura es de conidióforos, metulas, filiaes y conidios; donde los conidióforos se forman densamente y su ramificación es la que se encarga de determinar las especies de *Penicillium*, ya que estas varían de tipo monoverticilada, biverticilada, terverticilada y cuaterverticilada, los conidios se disponen en sucesión basípeta (el conidio más maduro en la punta y el más joven en la base) y la filiaada esta ramificada o no y es la que le da la forma de cepillo (Srinivasan et al., 2020).

4.5 Determinación del análisis microbiológico de la bebida probiótica “kombucha” mediante análisis de aerobios totales, coliformes totales y mohos y levaduras al tratamiento mejor evaluado dentro de pruebas organolépticas.

En la Tabla 12 , se publican los resultados microbiológicos de las bebidas que presentaron la más alta calificación en la aceptación por parte de un panel sensorial, la cual correspondió al tratamiento T2 y T3.

Se realizo el análisis de 3 parámetros principales, basándonos en la norma de referencia para bebidas de kombucha (Uganda Standard, 2018) y las normativas INEN, con el propósito de obtener una bebida de buena calidad microbiológica como producto final. Se obtuvieron como resultados, todos los parámetros bajo análisis al cumplir con los requisitos establecidos por dichas normas. Esto nos permite corroborar que el producto obtenido posee las características de inocuidad apropiadas para su consumo.

Tabla 12 Resultados microbiológicos de los tratamientos de mejor aceptación según el panel sensorial T2 y T3

	Parámetro	Unidad	Resultado	Requisito
T2	Aerobios Mesófilos	UFC/mL	$1,6 \times 10^1$	Máx. 100
Azúcar + Stevia	Coliformes Totales	UFC/mL	No detectado	No detectado
	Mohos Y Levaduras	UP/mL	$1,6 \times 10^1$	Máx. 10
T3	Aerobios Mesófilos	UFC/mL	$1,3 \times 10^2$	Máx. 100
Azúcar de Coco	Coliformes Totales	UFC/mL	No detectado	No detectado
	Mohos Y Levaduras	UP/mL	$1,2 \times 10^1$	Máx. 10

Elaborado por: (Los autores, 2023)

Los resultados cumplen con los requisitos exigidos por la norma de referencia, Norma DUS 2037:2018 Draft Uganda Standard kombucha – Specification, donde indica un contenido máximo de 1×10^2 UFC/ml para microorganismos aerobios mesófilos; un valor inferior a 3 NMP/ml para *E. coli*; presencia inferior a 1×100 UFC/ml para *S. aureus*, recalcan en que no debe existir presencia de *Salmonella* y un valor máximo de 1×10^2 UP/ml para mohos y levaduras (Uganda Standard, 2018). Ya que se cumplen los parámetros dispuestos en la respectiva norma, se asegura la inocuidad del producto elaborado y teniendo un buen nivel de calidad.

4.6 Determinación de probióticos de la bebida “kombucha” al tratamiento mejor evaluado dentro de pruebas organolépticas.

La bebida probiótica “kombucha” con mayor aceptación fue el tratamiento con el endulzante no calórico azúcar de coco, el cual al cumplir con todos los parámetros microbiológicos establecidos por (Uganda Standard, 2018). Se la logra determinar cómo una bebida probiótica, ya que posee las cantidades de microorganismos activos, al ser el resultado de la investigación, se establece la presencia de *Lactobacillus*, esto debido a que se da una fermentación láctica por parte de las bacterias presentes en el SCOBY. Así mismo esta presencia se demuestra gracias a la producción de gas al transformarse el azúcar por el proceso de la fermentación, así mismo, la acidificación de la bebida, así como la disminución del pH, es otra señal positiva de la presencia de bacterias del género *Lactobacillus*. Los estudios realizados por Pei et al., 2019, establecen que, a partir del aislamiento de una cepa originaria de kombucha, se encontraron distintos géneros de *Lactobacillus*, como *L. bulgaricus* o *L. plantarum*, en donde se señala que estas variedades son las que se presentan con mayor frecuencia en kombucha elaborada de forma

industrial o de forma tradicional, por lo que en nuestro producto basándonos en la normativa INEN de fermentación láctica, cumple con los requisitos.

La bebida probiótica kombucha, al contar con beneficios prebióticos y probióticos, al momento de tratar la relación que existe en la microbiota y polifenoles. Un efecto prebiótico principal de los polifenoles es la estimulación en el crecimiento microbiológico y transformación de consorcios microbiológicos al impedir el crecimiento de algunos patógenos.(Makarewicz et al., 2021). Por lo que, en el trabajo de investigación, tenemos presente el beneficio prebiótico al momento de trabajar con la infusión de té negro, siendo este quien da la producción de polifenoles al entrar en contacto con el SCOBY.

Al presentarse una fermentación láctica es necesario corroborar el cumplimiento de la normativa ya que al presentarse fermentación en la bebida cabe la posibilidad de crecimiento de bacterias no deseadas. De acuerdo con la norma NTE INEN 2395:2011, en cuanto a bebidas fermentadas lácticas, esta bebida cumple con las condiciones establecidas, dado que posee valores menores al 1,5% que se indica en cuanto a ácido acético, lo cual es un buen indicativo como norma de salubridad. De igual manera las condiciones de bacterias y levaduras califican dentro de las indicaciones con lo cual demuestra no tener problemas presentables por presencia excesiva de microorganismos (INEN, 2011).

5 Conclusiones

En base a los resultados obtenidos en la investigación se presentan las siguientes conclusiones.

El proceso de elaboración de la bebida “kombucha”, se llevó a cabo en etapas; iniciando con la recepción de la materia prima, pesaje, infusión y adición de la sacarosa a la disolución, inoculación, fermentación aeróbica y finalmente, envasado en botellas de vidrio con tapa hermética.

De los 3 tratamientos finales de kombucha como producto final, se empleó un análisis sensorial con el objetivo de la identificación de la formulación con mayor aceptación por el panelista. Para esto se evaluaron los parámetros organolépticos: olor, color, sabor y consistencia, concluyendo que la bebida probiótica kombucha con endulzante no calórico Azúcar de coco Tratamiento 2, obtuvo la más alta aceptación por parte de los panelistas. Para determinar este tratamiento con mayor aceptación se evaluaron características fisicoquímicas como pH, temperatura, espesor, porcentaje de ácido acético y cuantificación de azúcares totales por el método Fenol- Acido; obteniendo como resultados pH de 4,76, T ° de 19,4°C, 3,22mm de espesor, cuantificación de azúcar de 0,1835 mg/mL y un porcentaje de Ácido acético de 0,03 % (V/V). Los valores obtenidos están dentro de la conformidad con los requisitos exigidos por la Norma DUS 2037:2018 Draft Uganda Standard Kombucha - Specification, que fue tomada como referencia en esta investigación.

Al igual que en el análisis microbiológico para la formulación de kombucha T2 (Azúcar de coco), fue realizada en base al recuento de microorganismos aerobios mesófilos, coliformes totales y mohos y levaduras. Los resultados fueron $1,3 \times 10^2$ UFC/mL; ausencia/25 mL y $1,2 \times 10^2$ UFC/mL, respectivamente. Nuevamente los resultados obtenidos concuerdan con los parámetros en estudio como requisitos exigidos por la Norma DUS 2037:2018.

Este producto no ingresa en el grupo de leches fermentadas o lácteos, para que sea posible una comparación más acorde según normativa INEN, es la referencia empleada al no contar con normativa que establezca requisitos específicos para este parámetro en la kombucha en el Ecuador.

Al poseer un elevado nivel de acidez, es decir un bajo pH tradicional de la kombucha, lo convierte en un medio efectivo para la estabilidad de microorganismos probióticos viables generados por la fermentación, siendo este un criterio sustentado por resultados de otras investigaciones, por lo que este se vuelve un alimento de calidad y para ser consumido en una

dieta saludable debido a los beneficios que presenta al contener probióticos a comparación de otras bebidas comerciales sin beneficios asociados.

6 Recomendaciones

Como punto inicial, se recomienda que, al momento de preparación de la kombucha de manera artesanal o casera, se realice en un ambiente libre de impurezas o posibles agentes contaminantes, ya que al tratarse de un proceso en el que interviene una masa compuesta por bacterias es un factor clave mantener la inocuidad durante el proceso de la elaboración de la bebida.

Es importante trabajar con material estéril, con el fin de prevenir alguna posible contaminación durante la preparación, en caso de no ser posible realizar la esterilización es importante lavar los materiales y envases con los que se vaya a trabajar con vinagre, con el mismo fin de prevenir contaminantes.

Como se demostró en la sección de resultados y discusión, el uso de diversas fuentes de azúcar varía de forma positiva al producto final, con respecto a propiedades degustativas, en este caso se recomienda probar con diversos tipos de azúcar para obtener un producto de gusto personal adecuado.

Es un punto crucial el mantener el control de bacterias presentes en la bebida, para esto es necesario que la fermentación se realice en recipientes de vidrio transparentes para lograr observar con facilidad la presencia de posibles bacterias contaminantes.

Presenta alta relevancia el lugar donde se vaya a almacenar la bebida durante las dos semanas que dura el procedimiento, para esto es necesario esterilizar la incubadora o el espacio donde se deje reposar la bebida para evitar cualquier tipo de contaminación.

En el caso de presentarse contaminación externa, el mejor procedimiento para salvar el SCOBY es descartar el té negro en el que se encuentre y lavar la zooglea con vinagre, con el fin de eliminar cualquier posible microorganismo que ponga en riesgo el proceso de fabricación.

Para tener un conocimiento acerca de los beneficios de la bebida, es recomendable realizar análisis a profundidad acerca de los componentes químicos que puedan presentarse en la bebida provenientes de la infusión del té negro.

7 Bibliografía

- Alejos, A. (2018). Edulcorantes o azúcar: Efectos sobre la salud. In *Universidad Complutense*.
- Arcos, C. (2017). Monografía: Efecto de la fermentación aerobia del grano de café orgánico, en el desarrollo de características sensoriales de la bebida en el Municipio de Pitalito. In *Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD*.
- Arguelles, J. (2008). Los microbios y el premio Nobel de medicina en 1908 (Ehrlich y Mechnikov). *Anales de Biología*, 30, 65–71.
- Ávila Núñez, R., Rivas Pérez, B., Motzezak, R. H., & Chirinos, M. (2012). Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en Agave cocui Trelease Content of total, Reducing and Non-Reducing Sugars in Agave cocui Trelease. *Multiciencias*, 12, 129–135.
- Basantes Ruiz, M. A. (2022). Evaluación del efecto inhibitorio de kombucha de té negro y verde en *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. *Tesis -Trabajo de Titulación*.
- Byamukama, D., Kansiime, F., Mach, R., & Farnleitner, A. (2000). Determination of *Escherichia coli* contamination with chromocult coliform agar showed a high level of discrimination efficiency for differing fecal pollution levels in tropical waters of Kampala, Uganda. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 864–868. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.864-868.2000>
- Cáceres R. Paola, & Gotteland R. Martín. (2010). *Artículos de actualización alimentos probióticos en Chile: ¿Qué cepas y qué propiedades saludables? Probiotics in Chile: Which are the strains and what are their effects on human health?*
- Castañeda G., C. (2017). Probiótico *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745: de la investigación a la práctica clínica. *Review Article*.
- Coelho, R., Almeida, A., Amaral, R., Mota, R., & Sousa, P. (2020). Kombucha: Review. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 22, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100272>
- Cujilema Grace. (2021). “*Bebidas funcionales desarrolladas a partir de una comunidad simbiótica de levaduras y bacterias(SCOBY)*.”
- Jesús, R., Yanez, D., Garma, P., Guillen, M., Novelo, M., & Robaldino, D. (2021). Valoración potenciométrica a microescala de ácido acético como método de enseñanza en el laboratorio de química analítica. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 8, 149–153.
- Mariño, A., Núñez, M., & Bbarreto, J. (2015). Microbiota, probióticos, prebióticos y simbióticos. *Pediatría Integral*, 17(1), 337–354.
- Miranda, J. F., Ruiz, L. F., Silva, C. B., Uekane, T. M., Silva, K. A., Gonzalez, A. G. M., Fernandes, F. F., & Lima, A. R. (2022). Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. In *Journal of Food Science* (Vol. 87, Issue 2, pp. 503–527). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16029>

- Delgado, A. (2021). *Efecto de la fermentación aeróbica y anaeróbica sobre la calidad organoléptica del café (Coffea arabica.) de las variedades Catimor y Marsellesa.*
- Delgado, A. R. (2007). *Te de kombucha y sus beneficios para el sistema digestivo El contenido del presente trabajo es de exclusiva responsabilidad del autor.*
- Dutta, H., & Paul, S. K. (2019). Kombucha Drink: Production, Quality, and Safety Aspects. In *Production and Management of Beverages* (pp. 259–288). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815260-7.00008-0>
- Ferreira, J., Fernandes, L., Borges, C., Matsue, T., Alencar, K., Gonçalves, A., Freitas, F., & Ribeiro, A. (2021). Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. *Journal of Food Science*, 87(2), 503–527. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16029>
- Florez, M., Roldán, D., & Juscamaita, J. (2020). Evaluación de fitotoxicidad y caracterización de un fertilizante líquido elaborado mediante fermentación láctica utilizando subproductos del procesamiento de Trucha (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecología Aplicada*, 19(2), 1–11. <https://doi.org/10.21704/rea.v19i2.1563>
- Garrido, J., Durán, R., Martínez, F., & Báez, J. (2022). Azúcar de coco una alternativa como sustituto de azúcares procesados. *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 7, 285–290.
- Garrote, A., & Ramon Bonet, Y. (2017). Farmacia Abierta. In *13 Farmacia Profesional* (Vol. 31, Issue 2).
- Gómez, L., Beltrán, L., & García, J. (2013). Azúcar y enfermedades cardiovasculares. *Nutricion Hospitalaria*, 28(4), 88–94.
- Goya, M. (2013). *Obtención de una bebida alcohólica a partir de mucílago de cacao, mediante fermentación anaerobia en diferentes tiempos de inoculación.*
- Greenwalt, C. J., Steinkraus, K. H., & Ledford, R. A. (2000). Kombucha, the Fermented Tea: Microbiology, Composition, and Claimed Health Effects. In *Journal of Food Protection* (Vol. 63, Issue 7).
- Ignacio, L. (n.d.). *Determinación del contenido de ácido acético de un vinagre comercia.*
- Illana Carlos. (2007). 1.ElhongoKombucha. *ResearchGate*.
- INEN. (2011). *Leches fermentadas. Requisitos.*
- INEN. (2013). Vinagre. Requisitos. In *INEN: Vol. Primera ed.*
- Jayabalan, R., Subathradevi, P., Marimuthu, S., Sathishkumar, M., & Swaminathan, K. (2008). Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food Chemistry*, 109(1), 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.037>
- Kallel, L., Desseaux, V., Hamdi, M., Stocker, P., & Ajandouz, E. H. (2012). Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. *Food Research International*, 49(1), 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.018>
- Kluz, M., Pietrzyk, K., Pastuszczak, M., Kacaniova, M., Kita, A., Kapusta, I., Zaguła, G., Zagrobelna, E., Struś, K., Marciniak-Lukasiak, K., Stanek-Tarkowska, J., Timar, A., & Puchalski, C. (2022). Microbiological and physicochemical composition of various types of homemade kombucha beverages using alternative kinds of sugars. *Foods*, 11(10), 1–15. <https://doi.org/10.3390/FOODS11101523>

- Livia, M. (2019). *Efecto de tres concentraciones de kombucha en las características morfoestructurales del micelio del <Oidium farinosum> Cooke.*
- Lobov científica. (2020). *Medidor multiparamétrico Oakton, modelo PC700.*
- López, A., Gutiérrez, P., & Zazueta, A. (2022a). Estandarización química de una bebida fermentada de kombucha a base de té verde, té de limón y e infusión hojas de guayaba. *Revista Unison*, 38.
- López, A., Gutiérrez, P., & Zazueta, C. (2022b). Estandarización química de una bebida fermentada de kombucha a base de té verde, té de limón y e infusión hojas de guayaba. *Revista de Investigación Académica Sin Frontera*, 15(38), 1–9.
- Makarewicz, M., Drożdż, I., Tarko, T., & Duda-Chodak, A. (2021). The interactions between polyphenols and microorganisms, especially gut microbiota. *Antioxidants*, 10(2), 1–70. <https://doi.org/10.3390/antiox10020188>
- Melgarejo, Z., & Simon, K. (2019). Desempeño empresarial y ciclo económico en la industria de alimentos y bebidas colombiana: una aproximación no paramétrica. *Estudios Gerenciales*, 35(151), 1–17. <https://doi.org/10.18046/j.estger.2019.151.3162>
- Millipore. (2006). Potato Dextrose Agar. *Merck Microbiology Manual*, 12, 1–2.
- Millipore. (2019). *Technical Data sheet Buffered Peptone Water*. 1–5.
- Millipore. (2023). *Plate Count Agar*. 1–7.
- Millipore, M. (2014). Chromocult® Agar para coliformes. Detección simultánea de bacterias coliformes y E.coli en el agua. *Darmstadt*, 1–4.
- Molitor, R., Bollinger, A., Kkubicki, S., Loeschcke, A., Jaeger, K., & Thies, S. (2020). Agar plate-based screening methods for the identification of polyester hydrolysis by Pseudomonas species. *Microbial Biotechnology*, 13(1), 274–284. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13418>
- OPS. (2021). *Consumo de productos alimentarios ultraprocesados y procesados con exceso de nutrientes asociados a las enfermedades crónicas no transmisibles y a la alimentación insalubre en las Américas.*
- Páez, V. (2010). BEBIDAS FERMENTADAS. *ReCiTeIA*, 10(1), 1–41.
- Pei, J., Jin, W., Abd El-Aty, A., Baranenko, D., Gou, X., Zhang, H., Geng, J., Jiang, L., Chen, D., & Yue, T. (2019). Isolation, purification, and structural identification of a new bacteriocin made by Lactobacillus plantarum found in conventional kombucha. *Food Control*, 110, 1–42. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106923>
- Puerta, G. (2010). Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café. *Centro Nacional de Investigaciones de Café*, 402, 1–12.
- Rappaccioli, R., Zaror, V., & Herrera, S. (2021). Probióticos: desafíos, revisión y alcance. *Revista Medica Sinergia*, 6(6). <https://doi.org/10.31434/rms.v6i6.686>
- Rojas, T. (2022). Métodos de fermentación acética en la calidad de vinagre de vino blanco. In *Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga*.
- Rondón, A., Samaniego, L., Bocourt, R., Rodríguez, S., Milián, G., Ranilla, M., Laurencio, M., & Pérez, M. (2008). Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus* sp. procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba isolation,

- identification and partial characterization of the probiotic p. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6(1), 56–63. <https://doi.org/10.1080/11358120809487628>
- Salvador, R., Sotelo, M., & Paucar, L. (2014). Estudio de la Stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*) como edulcorante natural y su uso en beneficio de la salud. *Scientia Agropecuaria*, 5, 157–163. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2014.03.06>
- Santillán, Y. (2022). Determinación de dosis óptimas de ácido acético para el control de malezas en plátano, en época lluviosa. In *Universidad de las Fuerzas Armadas*.
- Srihari, T., Karthikesan, K., Ashokkumar, N., & Satyanarayana, U. (2013). Antihyperglycaemic efficacy of kombucha in streptozotocin-induced rats. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1794–1802. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.08.008>
- Srinivasan, R., Prabhu, G., Prasad, M., Mishra, M., Chaudhary, M., & Srivastava, R. (2020). Penicillium. In *Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi* (pp. 651–667). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00032-0>
- Teoh, A., Heard, G., & Cox, J. (2004). Yeast ecology of Kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 95, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.020>
- Tormo, R. (2006). Probióticos. Concepto y mecanismos de acción. *Anales de Pediatría Monografías*, 4(1), 30–41.
- Uganda Standard. (2018). *Kombucha-Specification*. www.unbs.go.ug
- Vargas Mora, F. J. (2011). “Elaboración de una bebida refrescante fermentando la simbiosis kombucha con el objeto de mejorar la calidad de vida de los consumidores de bebidas no alcohólicas.”
- Villamar, M. (2021). Evaluación de la capacidad antioxidante y conteo de probióticos de una bebida kombucha (*Manchurian fungus* elaborada con Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*). In *Universidad Agraria del Ecuador*.
- Villar, M., Aranda, N., Villar, P., Ballesté, S. I., Lora, M., López, N., & Pérez, C. (n.d.). *Determinación del grado de acidez de vinagres comerciales de distinta materia prima*. <https://es.wikipedia.org/wiki/PH>.
- Xu, Y., Hall, C., Wolf, C., & Manthey, F. (2008). Fungistatic activity of flaxseed in potato dextrose agar and a fresh noodle system. *International Journal of Food Microbiology*, 121(3), 262–267. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.005>
- Yurivilca, E. (2023). *Elaboración de biofertilizante a partir del efluente de Tarwi (Lupinus mutabilis) proveniente del proceso de desamargado mediante fermentación láctica*.

8 Anexos

Anexo 1 Elaboración Kombucha



Figura 10 Materia prima



Figura 11 Pesaje



Figura 12 Infusión té negro



Figura 13 Fermentación



Figura 14 Envasado

Anexo 2 Encuesta análisis sensorial (Google Formulario)

Encuesta kombucha

La presente encuesta se realiza para determinar el tratamiento de Kombucha con mayor aceptación por sus características: color, sabor, olor y consistencia.

st.bublewum@gmail.com [Cambiar de cuenta](#)

 No compartido 

¿Qué tipo de kombucha presenta mejor color?

- Kombucha con azúcar blanca
- Kombucha con azúcar de coco
- Kombucha con azúcar Stevia

¿Qué tipo de kombucha presenta mejor sabor?

- Kombucha con azúcar blanca
- Kombucha con azúcar de coco
- Kombucha con azúcar Stevia

¿Qué tipo de kombucha presenta mejor olor?

- Kombucha con azúcar blanca
- Kombucha con azúcar de coco
- Kombucha con azúcar Stevia

¿Qué tipo de kombucha presenta mejor consistencia?

- Kombucha con azúcar blanca
- Kombucha con azúcar de coco
- Kombucha con azúcar Stevia

[Enviar](#) [Borrar formulario](#)

Este contenido no ha sido creado ni aprobado por Google. [Notificar uso inadecuado](#) - [Términos del Servicio](#) - [Política de Privacidad](#)

Google Formularios

Anexo 3 Tablas ABS (absorbancia) de los 4 tratamientos por días de fermentación

Día 1 (ABS)			
T1	T2	T3	T4
0,26	0,95	0,20	0,56
0,32	1,13	0,34	0,61
0,34	1,09	0,35	0,78

Día 7 (ABS)			
T1	T2	T3	T4
0,25	0,72	0,37	0,56
0,21	0,74	0,30	0,61
0,30	0,73	0,36	0,78

Día 14 (ABS)			
T1	T2	T3	T4
0,27	0,48	0,16	0,56
0,23	0,68	0,37	0,61
0,32	0,59	0,31	0,78

Anexo 4 Tabla transformación ABS – mg/mL

Día 1 (mg/mL)				
	T1	T2	T3	T4
	0,11	0,44	0,08	0,25
	0,14	0,53	0,15	0,28
	0,14	0,51	0,15	0,36
Promedios	0,13	0,50	0,12	0,30
Desviación	0,016	0,037	0,035	0,045

Día 7 (mg/mL)				
	T1	T2	T3	T4
	0,10	0,33	0,16	0,00
	0,08	0,34	0,13	0,00
	0,12	0,34	0,15	0,00
Promedios	0,10	0,34	0,15	0,00
Desviación	0,017	0,005	0,014	0,000

Día 14 (mg/mL)				
	T1	T2	T3	T4
	0,11	0,21	0,06	0,00
	0,09	0,31	0,16	0,00
	0,14	0,27	0,13	0,00
Promedios	0,11	0,26	0,12	0,00
Desviación	0,017	0,040	0,042	0,000

Anexo 5 Tablas área bajo la curva por triplicados de tratamientos 1 y 2

Área bajo de la curva T1 R1					Área bajo de la curva T2 R1						
Tiempo (Día)	C	(C1+C2)/2	T2-T1	Área	Tiempo (Día)	C	(C1+C2)/2	T2-T1	Área		
1	0,11	0,054	1	0,05	1	0,44	0,222	1	0,22		
7	0,10	0,104	6	0,62	7	0,33	0,388	6	2,33		
14	0,11	0,106	7	0,74	14	0,21	0,273	7	1,91		
				SUMA	1,42					SUMA	4,46
Área bajo de la curva T1 R2					Área bajo de la curva T2 R2						
Tiempo (Día)	C	(C1+C2)/2	T2-T1	Área	Tiempo (Día)	C	(C1+C2)/2	T2-T1	Área		
1	0,14	0,068	1	0,07	1	0,53	0,266	1	0,27		
7	0,08	0,109	6	0,65	7	0,34	0,437	6	2,62		
14	0,09	0,088	7	0,61	14	0,31	0,327	7	2,29		
				SUMA	1,34					SUMA	5,18
Área bajo de la curva T1 R3					Área bajo de la curva T2 R3						
Tiempo (Día)	C	(C1+C2)/2	T2-T1	Área	Tiempo (Día)	C	(C1+C2)/2	T2-T1	Área		
1	0,14	0,072	1	0,07	1	0,51	0,255	1	0,26		
7	0,12	0,134	6	0,80	7	0,34	0,423	6	2,54		
14	0,14	0,130	7	0,91	14	0,27	0,301	7	2,11		
				SUMA	1,78					SUMA	4,90

Anexo 6 Tablas área bajo la curva por triplicados de tratamientos 3 y 4.

Área bajo de la curva T3 R1					Área bajo de la curva T4 R1						
Tiempo (Día)	C	(C1+C2)/2	T2-T1	Área	Tiempo (Día)	C	(C1+C2)/2	T2-T1	Área		
1	0,08	0,038	1	0,04	1	0,25	0,127	1	0,13		
7	0,16	0,117	6	0,70	7	0,00	0,127	6	0,76		
14	0,06	0,108	7	0,76	14	0,00	0,000	7	0,00		
				SUMA	1,50					SUMA	0,89
Área bajo de la curva T3 R2					Área bajo de la curva T4 R2						
Tiempo (Día)	C	(C1+C2)/2	T2-T1	Área	Tiempo (Día)	C	(C1+C2)/2	T2-T1	Área		
1	0,15	0,074	1	0,07	1	0,28	0,140	1	0,14		
7	0,13	0,137	6	0,82	7	0,00	0,140	6	0,84		
14	0,16	0,144	7	1,01	14	0,00	0,000	7	0,00		
				SUMA	1,90					SUMA	0,98
Área bajo de la curva T3 R3					Área bajo de la curva T4 R3						
Tiempo (Día)	C	(C1+C2)/2	T2-T1	Área	Tiempo (Día)	C	(C1+C2)/2	T2-T1	Área		
1	0,15	0,075	1	0,08	1	0,36	0,180	1	0,18		
7	0,15	0,152	6	0,91	7	0,00	0,180	6	1,08		
14	0,13	0,141	7	0,99	14	0,00	0,000	7	0,00		
				SUMA	1,98					SUMA	1,26

Anexo 7 Tablas obtenidas del programa estadístico Infostat y Excel – ANOVA y prueba de Tukey, para cuantificación de consumo de sustrato.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Áreas bajo la curva	12	0,98	0,97	11,71

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	26,82	3	8,94	123,30	<0,0001
Tratamientos	26,82	3	8,94	123,30	<0,0001
Error	0,58	8	0,07		
Total	27,40	11			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,70407

Error: 0,0725 gl: 8

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
T2 AC	4,85	3	0,16	A
T3 AS	1,79	3	0,16	B
T1 AB	1,51	3	0,16	B C
T4 SE	1,04	3	0,16	C

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

Elaborada por: (Los autores,2023)Obtenida del programa estadístico Infostat

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	3	4,538553	1,512851	0,05700179
Columna 2	3	14,53315321	4,8443844	0,13286009
Columna 3	3	5,3766505	1,79221683	0,06699935
Columna 4	3	3,1234679	1,04115597	0,03728952

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	26,8080166	3	8,93600553	121,515998	5,18762E-07	4,066180551
Dentro de los grupos	0,5883015	8	0,07353769			
Total	27,3963181	11				

Elaborada por: (Los autores,2023)

Anexo 8 Tabla desviación estándar para características físico químicas de los tratamientos.

	pH	Espesor	Porcentaje ácido acético
INICO			
T1	5,22	1,43	0,012%
T2	5,51	2,52	0,006%
T3	5,23	3,13	0,003%
PROMEDIO	5,37	2,83	0,000045
DESV.ESTANDAR	0,1979899	0,86122006	4,58E-05
	pH	Espesor	Porcentaje ácido acético
FINAL			
T1	3,86	1,84	0,05%
T2	4,76	3,11	0,03%
T3	3,65	3,44	0,03%
PROMEDIO	4,205	3,28	0,000288
DESV.ESTANDAR	0,58966092	0,84476821	0,0001287

Anexo 9 ANOVA Infostat de cuantificación espesor SCOPY

Resultados

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Espesor	12	0,50	0,31	37,19

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	9,40	3	3,13	2,65	0,1204
Tratamiento	9,40	3	3,13	2,65	0,1204
Error	9,46	8	1,18		
Total	18,86	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=8,67201

Error: 11,0000 gl: 8

Tratamiento	Medias	n	E.E.
T3	4,03	3	0,63 A
T2	3,17	3	0,63 A
T1	2,93	3	0,63 A
T4	1,57	3	0,63 A

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

ANAVA

Anexo 10 Determinación del contenido de ácido acético – Producto final

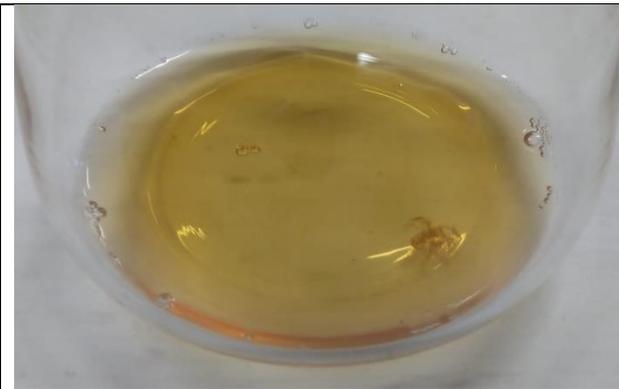


Figura 15 T3 Azúcar de coco inicial

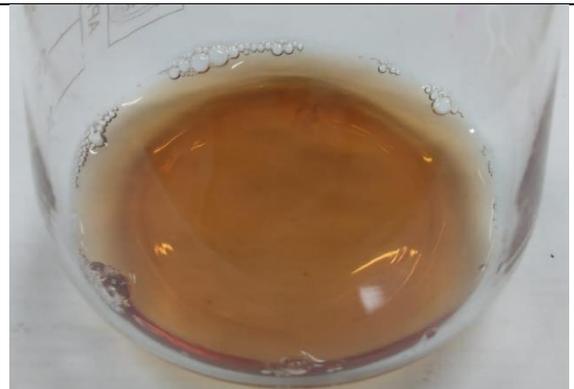


Figura 16 T3 Azúcar de coco final

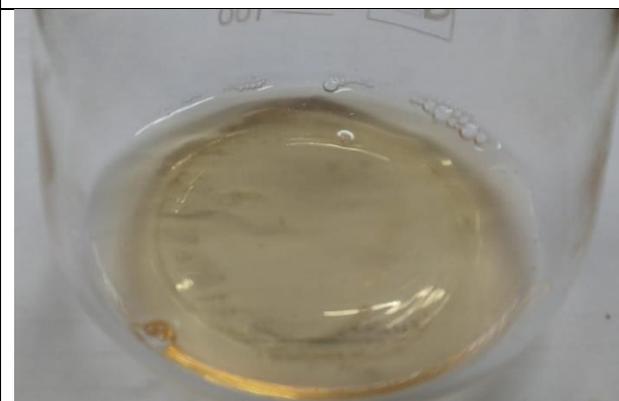


Figura 17 T3 Azúcar Stevia inicial



Figura 18 T3 Azúcar Stevia final

Elaborado por: (Los autores, 2023)

Anexo 11 Identificación *Penicillium* spp. – Morfología macroscópica y microscópica

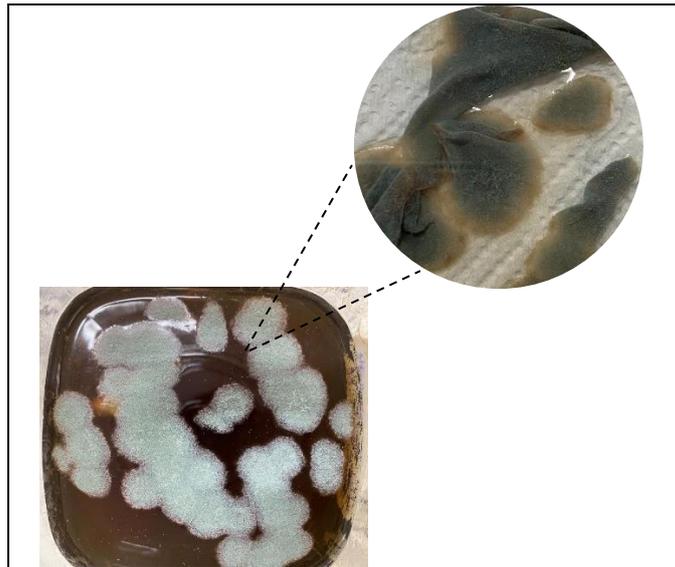


Figura 10. *Penicillium* spp. Macroscópico

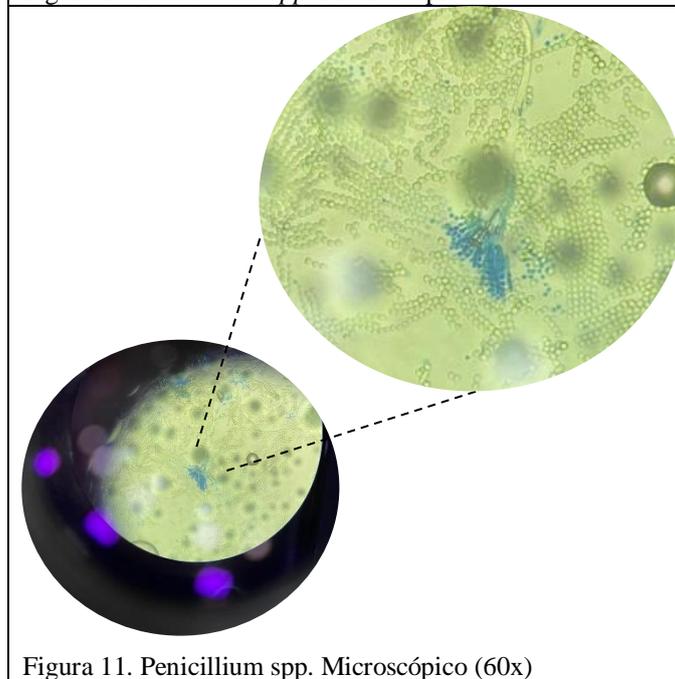


Figura 11. *Penicillium* spp. Microscópico (60x)

Elaborado por: (Los autores,2023)

Anexo 12 Montaje del diseño experimental (4 Tratamientos)



Triplicado T1 Azúcar Blanca



Triplicado T2 Azúcar + Stevia



Triplicado T3 Azúcar de Coco



Triplicado T4 Sin Azúcar



12 tratamientos de Kombucha

Elaborado por: (Los autores,2023)

Anexo 13 Análisis Microbiológico Producto inicial y final – Tratamiento 3 Azúcar de Coco

 <p>Medio Plate T3 AC (Aerobios)</p>	 <p>Medio ChromoCult T3 AC (Coliformes totales)</p>	 <p>Medio PDA T3 AC (Mohos y Levaduras)</p>
 <p>Medio Plate T3 AC (Aerobios)</p>	 <p>Medio Chromocult T3 AC (Coliformes totales)</p>	 <p>Medio PDA T3 AC (Mohos y Levaduras)</p>

Elaborado por: (Los autores, 2023)