

**Galileo**  
UNIVERSIDAD

La Revolución en la Educación

**UNIVERSIDAD GALILEO**

**Facultad de Ciencias de la Salud**

**“Elaboración y evaluación de bebida fermentada  
Kombucha”**

Trabajo de investigación presentado por:

**Josué David Lemus Godoy**

Previo a optar al grado académico de:

**LICENCIATURA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**Guatemala junio 2023**

## **Dedicatoria**

El presente trabajo investigativo está dedicado principalmente a Dios, por ser el inspirador y darnos fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados.

A mis padres, Sandra Godoy y Francisco Lemus, quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía, de no temer las adversidades porque Dios está conmigo siempre.

A mis hermanos por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento gracias. A toda mi familia porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

A mi familia y amigos en general que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis y por el apoyo brindado.

## **Agradecimientos**

Agradezco a Dios por guiarme en mi camino y por permitirme concluir con mi objetivo.

A mis padres por ser mi pilar fundamental y haberme apoyado incondicionalmente, pese a las adversidades e inconvenientes que se presentaron.

A mis catedráticos, en especial al Doctor Rodolfo Solís catedrático y director de Tesis, quien estuvo guiándome académicamente con su experiencia y profesionalismo.

A mi querida Universidad Galileo y a todas las autoridades, por permitirme concluir con una etapa de mi vida, gracias por la paciencia, orientación y guiarme en el desarrollo de esta investigación.

A la empresa Embutidora Santa Lucía por permitirme poner en práctica todos los conocimientos obtenidos a lo largo de la carrera, en especial al Licenciado Alejandro Estupinián, por permitirme desarrollar parte mi investigación en sus instalaciones y por el apoyo y enseñanza brindada.

A los Docentes de la carrera de Ciencia y Tecnología de Alimentos:

Dr. Rodolfo Solís

Licenciado William Estrada

Licenciada Mayra Montesuma

Ingeniera Irene Alejandra Reyes

Ingeniero Adrián Alfonso Rodríguez

Licenciada Paola Ramírez

## Índice General

1. Resumen
2. Objetivos
3. Introducción
4. Justificación
5. Planteamiento del problema
6. Marco teórico
  - 6.1 Historia y generalidades de la Kombucha
  - 6.2 Atributos y orígenes de él té
  - 6.3 Fermentación
  - 6.4 Parámetros fisicoquímicos de la bebida Kombucha
  - 6.5 Composición química de la bebida Kombucha
  - 6.6 Atributos de la bebida Kombucha
  - 6.7 Componentes de la Kombucha comercial
    - 6.7.1 Azúcar
    - 6.7.2 Agua
    - 6.7.3 Minerales
    - 6.7.4 Té Negro
    - 6.7.5 Dióxido de carbono
    - 6.7.6 Inoculo
    - 6.7.7 Vinagre de Kombucha
    - 6.7.8 Concentrados y saborizantes
- 7 Materiales y métodos
  - 7.1 Equipos
  - 7.2 Materiales
  - 7.3 Desarrollo experimental
  - 7.4 Metodología de fermentación de Kombucha
  - 7.5 Metodología de Carbonatación
  - 7.6 Diagrama de flujo
  - 7.7 Hipótesis
  - 7.8 Evaluación sensorial

- 7.9 Análisis estadístico
- 7.10 Análisis fisicoquímico
- 7.11 Análisis proximal
- 7.12 Análisis microbiológico

8 Discusión de resultados

9 Conclusiones

10 Recomendaciones

11 Bibliografía

## Resumen

En la industria de bebidas se cuenta con muchas variedades de estas, sin embargo, la cantidad de bebidas funcionales es baja, por esta razón se estableció como objetivo formular y evaluar una bebida funcional como lo es la bebida Kombucha

La aceptabilidad de una bebida de té de Kombucha, se elaboró con el objetivo de conocer la aceptabilidad de la bebida con tres diferentes tipos de formulaciones, cada una con un tipo diferente de infusión de té. A través de las pruebas estadísticas ANOVA, y prueba de Duncan se determinó que la muestra B fue la más aceptada principalmente por sus características de sabor.

Se realizó una evaluación del proceso de la fermentación, para monitorear las variables de pH, °Brix, temperatura y comportamiento de la fermentación durante un lapso de 15 días, definiendo las condiciones favorables para que se llevara a cabo una fermentación exitosa.

En la investigación bibliográfica se pudo encontrar que la presencia de probióticos en la bebida, que a su vez producen ácidos orgánicos puede brindar muchos beneficios para la salud debido a sus propiedades desintoxicantes y desinflamatorias que producen en el cuerpo humano.

Una variabilidad en esta experimentación es el uso de la carbonatación forzada por medio de CO<sub>2</sub>, la cual la hace diferente de otras bebidas de Kombucha en la que normalmente ocurre solamente la carbonatación natural, esto se hizo con el objetivo de tener una carbonatación y un burbujeo en la bebida más fuerte que la bebida de Kombucha convencionales.

## **Objetivos:**

### **Objetivo general:**

Elaborar, formular y carbonatar una bebida natural y refrescante por medio de infusión de té fermentado “Kombucha”, con el objeto de desarrollar un producto de buena calidad que pueda mejorar la calidad de vida de consumidores de bebidas gaseosas.

### **Objetivos Específicos**

- Elaborar una bebida natural de Kombucha, fermentada y carbonatada por medio de infusión de te dulce.
- Determinar los métodos y tratamientos adecuados para la fermentación en base a las pruebas realizadas en el estudio.
- Formular 3 tipos diferentes de infusiones, variando el tipo de té a utilizar.
- Determinar por medio de un panel de evaluación sensorial, el nivel de aceptación de cada muestra de bebida de Kombucha, en base a los factores de estudio dentro de la investigación.
- Determinar la formulación adecuada para la preparación de una bebida de Kombucha con sabor de arándanos.
- Realizar pruebas fisicoquímicas de la formulación que ha sido más aceptada del resultado del panel sensorial.
- Evaluar los procesos a utilizar en la elaboración en escala industrial de bebida de Kombucha.

## Introducción

Kombucha es una bebida fermentada, ácida y ligeramente carbonatada, tradicionalmente hecha de te endulzado con azúcar. (The Noma Guide to Fermentation 2018)

Esta bebida se ha consumido durante mucho tiempo en todo el mundo por muchas de sus propiedades profilácticas y terapéuticas.

Tradicionalmente se prepara fermentando té negro o té verde endulzado a temperatura ambiente por aproximadamente 15 días. Kombucha es producida por una colonia de levaduras y microbios que en sincronía primero convierten el azúcar en alcohol, y luego el alcohol en ácidos orgánicos principalmente ácido acético. (The Noma Guide to Fermentation 2018). La Bebida que resulta de esta fermentación tiene el sabor de te ligeramente dulce y ligeramente ácido y recibe gran cantidad de nombres, como Manchurian mushroom, Fungus tea, pero el más común y más usado es “Kombucha”

Los microorganismos que fermenta la bebida de Kombucha son típicamente producidos por una colonia simbiótica llamada “SCOBY”, también llamada “Madre”, que tiene la forma de un disco ahulado que flota en la superficie del té al fermentar. La comunidad de microorganismos puede también ser transferida por vía del mismo líquido fermentado, el cual puede generar un nuevo SCOBY. El SCOBY o la Madre se asemeja mucho a un subproducto del proceso de vinagre o madre del vinagre, y está compuesto de los mismos organismos, de hecho algunos analistas han llegado a la conclusión de que son exactamente lo mismo. (The art of fermentation, 2012)

Es utilizado tradicionalmente como un remedio natural, y ha sido valorado como un fermento extraordinario por sus componentes, ya que ha sido tomado de culturas ancestrales como la cultura China, en donde siempre lo han utilizado como un gran apoyo de la medicina tradicional.

Actualmente, todos los seres humanos alrededor del mundo están subsistiendo en un ambiente contaminado y mantienen una mala alimentación, por lo que es necesario consumir productos desintoxicantes, que eliminen la toxicidad adquirida. La Kombucha, mediante investigaciones en Europa, ha sido presentada como alternativa natural de desintoxicación del organismo, además de brindar beneficios al sistema inmunológico y ayudar a sobrellevar enfermedades terminales como el cáncer.

Los metabolitos producidos por la simbiosis a lo largo de la fermentación y los ácidos orgánicos producidos durante la misma le dan el sabor característico a la bebida, y además que al ser consumidos no provocan efectos adversos y pueden ser ingeridos por cualquier persona, siempre y cuando el proceso se haya realizado de una manera correcta y un manejo adecuado de inocuidad durante la fermentación.

Históricamente, la bebida Kombucha ha sido consumida en Japón, Corea, Vietnam, China y partes del este de Rusia. Pero en los recientes años, la bebida Kombucha ha explotado en popularidad a través de Norte América y Europa. Gracias a una buena estrategia de mercadeo y la creciente fascinación del público en con todo lo que es probiótico

### **Justificación**

En esta investigación se plantea desarrollar y elaborar una bebida de té negro fermentada Kombucha y evaluar su actividad como potencial bebida funcional.

Las Industrias principales dedicadas a la producción de bebidas gaseosas y refrescantes en el país centran su actividad en producir bebidas artificiales, las que por diversos estudios se ha confirmado que son perjudiciales para la salud de los consumidores, considerando esta razón es que ha surgido el interés de investigar la elaboración de una bebida refrescante, saludable y natural a partir de Kombucha, la cual ha demostrado ser beneficiosa para el ser humano por producir, durante la fermentación ácidos orgánicos, vitaminas y enzimas.

La popularidad de la bebida Kombucha, ha venido en aumento en los últimos años a nivel mundial, principalmente en Norte América y Europa, esta ha sido aclamada y promovida como un producto muy beneficioso para la salud. Hoy en día los consumidores están experimentando un regreso a las formas de alimentación naturales y orgánicas, alejándose de los productos artificiales, dañinos para la salud. Esta es una de las razones del gran atractivo y fascinación que presenta esta bebida en el mercado, al ser Kombucha una simbiosis de levaduras y bacterias que producen ácidos orgánicos que son desinflamatorios y desintoxicantes, por lo tanto beneficiosos en la salud. Estos mismos microorganismos han sido utilizados desde épocas antiguas por varias culturas del mundo para la creación de bebidas fermentadas y ha promovido la salud de quien los consuma.

Dentro de la diversidad de bebidas que existen en el mercado, específicamente las bebidas carbonatadas e infusiones, no existe alguna con propiedades naturales, medicinales y beneficiosas para la salud, por lo tanto esta bebida podría ser una alternativa de interés para las industrias de bebidas en Guatemala, abriendo sus opciones de bebidas saludables para los consumidores de estos productos por considerarse la Kombucha una bebida funcional.



## **Planteamiento del Problema**

La demanda de bebidas y alimentos saludables va en incremento en función de la tasa de crecimiento poblacional, especialmente en las bebidas naturales. Esta demanda abre nuevas oportunidades para nuevos mercados en el procesamiento de bebidas funcionales. Ante la creciente demanda de productos naturales por la comunidad frente a la concientización en contra de lo artificial, es necesario incorporar en los mercados productos naturales de buena calidad y producidos con inocuidad y que aseguren el máximo aprovechamiento de las propiedades nutricionales y terapéuticas que ofrece la bebida Kombucha.

La planta de té conocida científicamente como *Camellia Sinensis*, es uno de los productos más comercializados a nivel mundial como sustituto de café, y Guatemala también es un país productor de te lo cual hace que su precio sea accesible y es el principal ingrediente en la elaboración de bebida Kombucha.

Actualmente en Guatemala no hay muchos estudios de la bebida de Kombucha y su comercialización se limita a la producción artesanal o en los hogares como bebida medicinal.

Al no presentar una alternativa en bebidas funcionales naturales se continuará consumiendo bebidas artificiales que no aportan un beneficio a la salud de los consumidores y además contienen químicos que pueden ser dañinos para la salud. Se puede preservar la salud de los consumidores de bebidas refrescantes al existir una alternativa a los refrescos artificiales, como lo es la bebida Kombucha, que puede ser un recurso biotecnológico potencial al que se le atribuyen propiedades, saludables para el ser humano por el contenido de vitaminas, enzimas y ácidos orgánicos que contribuyen a la desinflamación y desintoxicación del cuerpo humano.

En esta investigación se pretende resolver el problema desarrollando un líquido formulado para la propagación de la simbiosis Kombucha, creando un tipo idóneo de sustrato para la producción de la bebida. También se planea investigar la influencia de factores determinantes como son el tipo de té y su concentración adecuada para la producción de la bebida, factores que serán evaluados por medio de análisis de evaluación sensorial y estadísticamente por método de preferencia de análisis de Varianza y prueba de amplitud múltiple de Duncan

## Marco teórico

### Bebidas Funcionales

Las bebidas funcionales son aquellas que contienen componentes biológicos activos que van a producir consecuencias beneficiosas a nivel nutricional al mejorar varias funciones del organismo que se van a reflejar en el mejoramiento y optimización de la salud o de la disminución o reducción de algún riesgo de poder desarrollar alguna enfermedad. El consumo de las bebidas funcionales está dirigido a todo el público que desee mejorar y optimizar su salud, la presente investigación tiene como objetivo determinar la aceptabilidad de una bebida de té de Kombucha como alternativa de las bebidas gaseosas tradicionales.

Se entiende por bebida funcional a aquellas que se ingieren con las mismas expectativas y, más concretamente, las que podrían contribuir a la mejora de la hidratación y de otras situaciones fisiológicas. Una de las ideas principales es que en la dieta saludable los líquidos ingeridos no tienen que proporcionar exclusivamente energía ni servir para cubrir necesidades nutricionales. De hecho, la contribución de los líquidos para cubrir la ingestión recomendada en nutrientes ha sido siempre mínima, por lo que se puede afirmar que, en las bebidas, el balance entre el aporte de energía y nutrientes es un factor crítico dentro de una dieta equilibrada

Los alimentos funcionales más relevantes y en los que se encuentra la más sólida evidencia científica son aquellos formulados fundamentalmente por los derivados lácteos fermentados, estos realizan su actividad en múltiples sistemas, principalmente el gastrointestinal, cardiovascular e inmunológico. Se desempeñan como potenciadores del desarrollo y la diferenciación, moduladores del metabolismo de nutrientes, el estrés oxidativo, entre otros.

Clasificación de las bebidas funcionales por sus declaraciones y beneficios para la salud:

- a) Salud gástrica: Se consideran aquellos productos enriquecidos con distintos tipos de fibra, enzimas y péptidos.
- b) Salud inmunológica. Productos basados en prebióticos, probióticos, vitamina C, carnitina, polifenoles y licopeno.
- c) Salud intestinal: Bebidas funcionales con presencia de fibras solubles, insolubles e o insulina. d) Salud cardiovascular: Alimentos enriquecidos con ácidos grasos, omega 3, carnitina y magnesio.
- e) Salud ósea: Principalmente los productos lácteos conteniendo calcio, fósforo, vitamina D3, cinc, entre otros.
- f) Salud visual: Complementos conteniendo ácidos grasos omega-3 y luteína.

## Historia y generalidades de la Kombucha

La palabra fermentación deriva del vocablo latino *fervere*, que significa “hervir” y fue acuñada haciendo alusión al burbujeo que se observaba en las primeras bebidas fermentadas, muy parecido en aspecto al del hervor de un líquido caliente.

En la actualidad, tal y como lo sugirió Gay-Lussac en 1810, es el término general que se emplea para referirse a la degradación anaeróbica de glucosa o de otros nutrientes orgánicos con el fin de producir energía en forma de ATP.

El conocimiento humano del fenómeno de la fermentación es tan antiguo, quizá, como lo es la agricultura, pues desde hace miles de años que el hombre promueve la conversión del jugo de uvas dulces aplastadas en vino efervescente o la conversión de masas de trigo en pan.

La bebida de Kombucha no es nada nuevo. El té ligeramente fermentado es un antiguo remedio casero muy popular. Durante generaciones, su eficacia ha sido altamente apreciada en varias naciones, especialmente las del lejano oriente. Se cree que la “Kombucha” es originaria de Manchuria (lo que es ahora noreste de china, donde es consumida desde hace más de 3000 años. De allí se extendió hasta Japón por medio de muchos esfuerzos por parte de un científico coreano llamado Kombu, de allí el nombre “Kombucha” (cha es té en chino)

En la antigua China y en Japón era una costumbre familiar darles a los novios un cultivo nuevo de “Kombucha”. La mujer reproducía este cultivo a lo largo de todo su matrimonio y luego se lo pasaba a su propia hija. Ellos decían que cuando una persona recibe su primera “Kombucha” recibe también la última.

Durante la primera guerra mundial, la utilización de la bebida Kombucha se extendió más hacia el oeste. Las fuerzas rusas y alemanas jugaron al parecer un papel importante en su propagación. A mediados de los años 20, la bebida Kombucha se encontraba ya ampliamente como remedio casero popular. El “Hongo” o “Madre” como se le suele llamar, era codiciado con gran ilusión en algunos círculos y se pasa con agrado de unos a otros. Este se vendía en farmacias bajo nombres fantasiosos tales como “Mogu” o “Fungo Japón”.

En todo el mundo, desde tiempos remotos, una gran variedad de levaduras y bacterias han sido utilizadas y aplicadas por el hombre para la creación de bebidas y alimentos que mejoren la salud y promuevan su bienestar.

Ya en la Biblia se lee (Ruth 2:14) que el terrateniente Boas invitó a Ruth, que más tarde sería su esposa, durante la siega: “Ven aquí y come pan y moja tu bocado en la bebida de vinagre.” Y se sentó junto a los segadores; y mojó el pan seco y comió y quedó saciada y sobrada. Este relato Bíblico de alrededor del año 1000 A.C. no solo nos da una indicación de sus hábitos nutritivos ejemplares, aunque modestos desde nuestro punto de vista, también vemos aquí que ya en aquellos tiempos se preparaban bebidas con microorganismos de ácido láctico y como se servía a la gente para reforzarles y

refrescarles durante el duro trabajo de la cosecha. Una antigua y relativa pura simbiosis de bacterias y levaduras como las mencionadas es el hongo de té llamado Kombucha. (Kombucha una bebida saludable, Gunter Frank W. 2005)

La exploración científica de los hongos comenzó en la década de 1950, con el Instituto Bacteriológico de Moscú (como parte de sus proyectos de investigación del estudio del cáncer en todo el país). Descubrieron que no era un solo organismo sino una colonia simbiótica de varias bacterias y levaduras con vías metabólicas altamente complejas y sofisticadas. Este grupo de organismos muestra un efecto antibiótico distinto a través de la presencia de ácido úrico que está presente en algunos líquenes. También existen evidencias de que el ácido úrico puede desactivar ciertos grupos de virus. Como dato curioso en la historia del hongo medicinal, se comenta que los científicos rusos realizaron un profundo estudio para detectar la incidencia de cáncer en todos los distritos de la URSS (Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas actualmente Rusia), y fue el caso en las Montañas Urales Occidentales, que difícilmente se registraban casos de cáncer. (STEVENS, N. 2003)

En la década de los 60 se realizaron en Suiza numerosas investigaciones científicas sobre la Kombucha llegándose a la conclusión de que sus efectos son tan saludables como el yogur. Entre otras investigaciones médicas destaca la investigación del Dr. Rudolf Sklenar que desde 1951 hasta su fallecimiento en el año de 1987 trataba a la mayoría de sus pacientes dando té de Kombucha, manifestando siempre que con la Kombucha obtenía efectos terapéuticos satisfactorios en el tratamiento de enfermedades metabólicas y también en el tratamiento de enfermedades crónicas, sin haber observado jamás efecto negativo alguno. (STEVENS, N. 2003)

### **Descripción de Kombucha**

La Kombucha es una bebida fermentada que emplea tradicionalmente té negro o verde y un cultivo de bacterias y levaduras que será el encargado de realizar la fermentación. El uso del té verde o negro como sustrato para la Kombucha se debe gracias a sus propiedades que aportan el nitrógeno necesario para que el cultivo que fermenta la bebida pueda desarrollarse.

En su forma más simple es un té fermentado hecho de la combinación de té, azúcar, bacterias y levadura. Después de que el té se empapa y se azucara, se agrega un cultivo comúnmente llamado SCOBY (Symbiotic Colony Of Bacteria and Yeast), lo que permite que comience la fermentación. Después de 7 a 10 días, el té se ha convertido en una bebida ácida, ligeramente carbonatada, aclamada por sus supuestas propiedades curativas para dolencias que van desde la presión arterial alta hasta la diabetes tipo 2. La Kombucha tiene un sabor agrio burbujeante, parecido al vinagre de manzana (sidra), obtenida por la fermentación (Blanc, 1996). . Se compone de dos

fases: una biopelícula flotante y una fase líquida ácida. El ácido acético, el ácido glucónico y el etanol son los componentes principales del líquido y de la biopelícula (Czaja et al., 2006).

La comunidad microbiana en Kombucha es diversa y varía entre fermentaciones, pero es mayormente compuesta por bacterias de ácido acético y levaduras, sin embargo, la presencia de pequeñas cantidades de lactobacilos ha sido reportada. Estos microorganismos han sido sugeridos como potenciales probióticos y consecuentemente contribuyen a los beneficios a la salud de la Kombucha.

La fermentación de la Kombucha resulta de la combinación de tres fermentaciones diferentes: alcohólica, láctica y acética. Las bacterias y levaduras presentes en el medio crean una poderosa simbiosis capaz de inhibir el crecimiento de microorganismos contaminantes (Vitas et al., 2013)

Los mayores metabolitos identificados en la Kombucha son: ácido láctico, ácido acético, ácido glucónico, ácidos glucurónicos, etanol y glicerol (Blanc, 1996). La Kombucha contiene una simbiosis de levaduras osmófilas (principalmente *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces ludwigii*, *Pichia* spp.) y bacterias del ácido acético (*Acetobacter xylinum*, *A. xylinoides*, *Bacterium gluconicum*) utilizadas para la fermentación utilizando un azúcar como sustrato. La composición microbiana específica depende de la preparación individual de la bebida. La Kombucha ha sido consumida en múltiples países por siglos y se han reportado varios efectos medicinales. Se ha mostrado que tiene efectos positivos en las actividades gástricas, intestinales y glandulares, así para superar arteriosclerosis, excreción de 38 toxinas, diabetes, nerviosismo, y problemas de envejecimiento. También puede actuar como un laxante y se conoce que alivia el reumatismo, artritis, y hemorroides. También se ha reportado su efecto antioxidante (Dufresne & Farnworth, 2000).

## **SCOBY o Celulosa Bacteriana**

También llamada “Madre” o “Hongo Kombucha”, aunque se denomine con la palabra hongo, no tiene características ni patrón de crecimiento de un verdadero hongo. En realidad, es una colonia simbiótica de bacterias y levaduras, tiene la forma de una medusa deforme. Este colectivo viviente tiene la apariencia de una masa redonda gelatinosa. La membrana consiste en una superficie gelatinosa y áspera, en forma de disco plano. El SCOBY vive en una solución nutritiva de azúcar, dentro de la cual se multiplica permanentemente a través de la germinación. El disco de celulosa al principio se expande sobre toda la superficie del té, y luego comienza a engrosarse.

La celulosa bacteriana es un polímero que tiene múltiples aplicaciones debido a su pureza, alto grado de cristalinidad, y que es no tóxica, no alergénica, y biocompatible. Pero no se ha expandido su uso debido a que actualmente el proceso de producción de celulosa bacteriana es altamente ineficiente. Por lo que en los estudios recientes sobre

la celulosa se han concentrado en encontrar las condiciones de fermentación óptimas para su producción (Carreño, Caicedo, & Martínez, 2012).

De los múltiples estudios realizados sobre la celulosa bacteriana, solo una minúscula parte se ha dedicado a estudiar la producción de celulosa por microorganismos presentes en la Kombucha. La Kombucha es una bebida producida por la fermentación de té con azúcar por una asociación simbiótica de bacterias y levaduras, donde de la gran cantidad de bacterias presentes se ha encontrado que algunas de ellas son productoras de celulosa. Especialmente se ha encontrado, que estas bacterias productoras de celulosa provenientes de la Kombucha presentan características distintas a las mismas bacterias cuando provienen de otras fuentes como frutas (Nguyen, Flanagan, Gidley, & Dykes, 2008).

Mientras “celulosa” es una palabra que fue dada en los inicios del último siglo por Anselme Payen, a la sustancia que constituye la pared celular de las plantas, la celulosa bacteriana (CB) es un producto extracelular de las bacterias del ácido acético que fue descrita por Louis Pasteur como “una forma de piel húmeda, voluminosa, gelatinosa, y resbalosa...” (Ring, 1982). Aunque la porción sólida en la masa gelatinosa es menos que uno por ciento, es casi celulosa pura que no contiene lignina. La celulosa es la molécula natural de mayor abundancia y constituye el mayor porcentaje de los biopolímeros de la tierra (Jonas & Farah, 1998).

La razón por la que los microorganismos generan celulosa ha sido cuestionada repetidamente por biólogos. Algunos consideran que las bacterias aeróbicas producen una película para mantener una posición cercana a la superficie de la solución (Hestrin & Schramm, 1954) (Valla & Kjosbakken, 1982). Otros asumen que las bacterias generan celulosa para protegerse de la luz ultravioleta (Williams & Cannon, 1989). Y otra teoría propone que las bacterias producen una capa para protegerse a sí mismas de enemigos o iones de metales pesados, mientras que los nutrientes pueden ser proveídos fácilmente por medio de difusión.

Principales bacterias productoras de celulosa:

<b>Género</b>	<b>Estructura de Celulosa</b>
<i>Acetobacter</i>	Película extracelular compuesta de cintas
<i>Achromobacter</i>	Fibrillas
<i>Aerobacter</i>	Fibrillas
<i>Agrobacterium</i>	Fibrillas cortas
<i>Alcaligenes</i>	Fibrillas
<i>Pseudomonas</i>	Fibrillas no distinguibles
<i>Rhizobium</i>	Fibrillas cortas
<i>Sarcina</i>	Celulosa amorfa
<i>Zoogloea</i>	No bien definida

Fuente: Jonas & Farah (1998)

La estructura de la celulosa bacteriana está conformado de residuos de glucosa unidos por un enlace covalente entre el carbono 1 y el 4, formando una cadena lineal. Su estructura está formada por 2000 a 14000 unidades de  $\beta$ -(1,4) glucosa en cadenas no ramificadas. Las cadenas lineales del polímero se asocian (cristalizan) por puentes de hidrogeno y fuerzas de Van der Waals. La celulosa es un biopolímero insoluble en agua que posee regiones con un alto ordenamiento (cristalinas), y otras donde el grado de ordenamiento es bajo.

La celulosa microbiana se produce extracelularmente en forma de fibrillas que se adhieren a la célula bacteriana. Cada fibrilla tiene entre 50 y 80 poros o terminales complejos con un diámetro de 3.5 nm para extruir la celulosa fuera de su membrana. Estas fibrillas se ensamblan posteriormente formando fibrillas más gruesas llamadas macrofibrillas que crean una estructura tridimensional de aproximadamente 1,000 cadenas de glucanos individuales que pueden contener hasta 200 veces más agua de su masa seca y poseen alta conformabilidad y gran elasticidad. Las bacterias producen dos formas de celulosa, celulosa I y celulosa II. La celulosa I es un polímero en forma de cinta compuesto por microfibrillas, mientras que la celulosa II es un polímero amorfo termodinámicamente más estable que la celulosa I (Podolich et al., 2016)

En el primer estado, las bacterias productoras de celulosa aumentan su población mediante el consumo de oxígeno disuelto. Durante este tiempo, el microorganismo sintetiza cierta cantidad de celulosa en el medio líquido y solo las bacterias que se encuentran en la interfaz aire/medio pueden mantener su actividad y producir celulosa, que está formada por capas superpuestas. A medida que avanza el tiempo de fermentación, el espesor de la membrana aumenta por la generación de nuevas capas en la superficie, formando una estructura suspendida en el medio de cultivo. El desarrollo de la biopelícula junto con los enlaces de hidrógeno y C-H continúan durante toda la fermentación, su síntesis llegará a su límite cuando crezca hacia abajo atrapando todas las bacterias, que luego se volverán inactivas debido al suministro insuficiente de oxígeno (Esa et al., 2014). Las bacterias que quedan en la fase líquida del medio de cultivo se encuentran en estado latente y pueden reactivarse y utilizarse como inóculo en una fermentación posterior (Ruka et al., 2012)

### **Atributos y orígenes del Té**

Las plantas de té pertenecen a la familia Theaceae y provienen de dos variedades principales: *Camellia sinensis* var. *sinensis* y *Camellia sinensis* var. *Assamica*

Las primeras hojas apicales son recogidas del arbusto de hoja perenne y pueden ser procesadas por distintos métodos. El té verde es secado inmediatamente con o sin un paso para desactivar las enzimas. El té negro, la forma más popular alrededor del mundo, es el resultado de la oxidación de los polifenoles de la hoja durante un proceso enzimático de múltiples etapas. Nuevos complejos polifenoles son formados durante el procesamiento del té negro.

Uno de los factores que diferencian la fermentación del té de las otras hierbas o extractos frutales es su elevado contenido en taninos. Los taninos llamados también polifenoles son moléculas grandes y complejas cuyos efectos sobre las membranas mucosas del cuerpo son astringentes y condensantes, además poseen cualidades bactericidas. Los taninos del té inhiben parcialmente el proceso de fermentación, por esta razón el contenido final de alcohol en la bebida es tan bajo. Los tés de hierbas suelen contener una cantidad mayor de aceites volátiles (aceites esenciales) lo cual interfiere con las bacterias del Kombucha, dando como resultado final una bebida de baja calidad. (RUBIO, A. 2012)

### **Composición química del té**

Contiene polifenoles, flavonoides (teoflavinas y teorubiginas), catequinas, cafeína, los galatos de la catequina, adenina, teobromina, teofilina, ácidos gálicos, taninos, galotatinos, pequeñas cantidades de aminofilina y un aceite amarillo volátil que es sólido a las temperaturas ordinarias y tiene un fuerte olor y sabor aromático. La actividad antioxidante depende de la estructura de los radicales libres en los compuestos, de los sustituyentes presentes en los anillos de los flavonoides y del grado de polimerización. (RUBIO, y STEVENS, N. 2000)

Los mayores componentes de las hojas de té verde pertenecen al grupo polifenol, que constituye un 25-35% del peso (Balentine, Wiseman, & Bouwens, 1997). Los polifenoles predominantes del té son los flavonoles de donde las catequinas (flavan-3-oles) son las principales. Estos compuestos contribuyen a la amargura, astringencia, y un sabor residual dulce.

En el té negro la oxidación de los polifenoles durante el procesamiento causa la formación de catequinas y complejos de ácido gálico como teaflavinas, ácidos teaflavinicos, teauribiginos o teasiensis. Las metilxantinas están presentes un 2-4% como cafeínas y una pequeña cantidad de teofilina y teobromina (Hara, Luo, Wickremaishinghe, & Yamanishi, 1995).

El té contiene muchos aminoácidos, pero la teanina, específica a la planta del té, es el más abundante, representando el 50% del total de los aminoácidos. La degradación del aminoácido está involucrada en la biogénesis del aroma del té. Otros actores en el desarrollo del aroma son la clorofila, carotenoides, lípidos, y compuestos volátiles que no son constituyentes principales del té. Los compuestos volátiles de las hojas del té han sido estudiados extensivamente y se han aislado 600 diferentes moléculas.

El té también contiene carbohidratos, vitaminas E, K, A, bajos niveles de vitaminas B y C (únicamente en el té verde). El té también provee cantidades necesarias de potasio, manganeso, e iones de flúor a la dieta (Hara, Luo, Wickremaishinghe, & Yamanishi, 1995).



## Propiedades del Té

### **Antioxidante:**

Debido a la presencia de los polifenoles. Los antioxidantes protegen al organismo contra los efectos de los radicales libres, los mismo que son un problema muy serio llegando a ser una de las principales causas de varias enfermedades como el Parkinson, problemas degenerativos del sistema cardiovascular, envejecimiento prematuro de la piel, cáncer, etc.

### **Astringente:**

Los responsables de esta propiedad son los taninos, que le confieren el sabor amargo y su consumo es ideal para combatir la diarrea o la gastritis.

### **Diurético:**

El té negro promueve la eliminación de líquidos del organismo.

Reconfortante y bajo en calorías: es muy bajo en calorías y a la vez da una sensación de saciedad, siendo ideal para reemplazar otras bebidas que aportan gran cantidad de calorías.

### **Estimulante:**

Debido a la presencia de cafeína que ayuda a mantener despierto tanto al cuerpo como a la mente, siendo ideal consumirlo en el desayuno o después de las comidas

## Fermentación

El término fermentación proviene de la palabra latina fermentum. La definición histórica describe fermentación como el proceso en donde ocurren cambios químicos en un sustrato orgánico por la acción de enzimas microbianas ya sea en presencia o ausencia de oxígeno. La fermentación se puede describir como “respiración sin aire”. La ciencia de fermentación se llama enzimología y el primer enzimólogo fue Louis Pasteur. Actualmente la fermentación es un proceso metabólico en donde carbohidratos o compuestos relacionados son parcialmente oxidados con la liberación de energía en la ausencia de receptores de electrones externos, compuestos orgánicos producidos por la descomposición de carbohidratos. Durante la fermentación, sucede la oxidación incompleta de compuestos orgánicos y por esta razón se obtiene menos energía que en comparación con la oxidación aeróbica del compuesto. La fermentación industrial se refiere ya sea a procesos aerobios o anaerobios, mientras que la fermentación en un contexto bioquímico describe solamente procesos anaeróbicos. La fermentación industrial, describe un proceso de operaciones que utilizan un cambio químico inducido por un organismo vivo o enzima, particularmente bacterias, levaduras, u hongos, que producen un producto específico. El proceso de fermentación se

compone de tres etapas principales: preparación de inóculo, selección de medio de cultivo y producción de biomasa (o metabolitos) de interés.

Como término general, los procesos de fermentación se pueden dividir mediante dos directrices:

1. El tipo de producto de la fermentación a obtener y
2. La presencia o ausencia de oxígeno (Chojnacka, 2010).

Cuando no puede darse la respiración, bien sea por la ausencia de un aceptor de electrones externo o por algún defecto en la cadena respiratoria celular, la fermentación es la ruta catabólica empleada para producir energía a partir de glucosa u otras fuentes de carbono.

En el caso de la glucosa, por ejemplo, su oxidación parcial es llevada a cabo a través de la ruta glucolítica, por medio de la cual se produce piruvato, ATP y NADH (estos productos varían de acuerdo con el sustrato energético).

En condiciones de aerobiosis, el piruvato es oxidado aún más cuando ingresa al ciclo de Krebs y los productos de este ciclo entran a la cadena transportadora de electrones. El NAD<sup>+</sup> también es regenerado durante estos procesos, lo que permite mantener la continuidad de la ruta glucolítica.

Cuando no hay oxígeno, es decir, en anaerobiosis, el piruvato derivado de las reacciones oxidativas (o los otros compuestos orgánicos resultantes) sufre una reducción. Esta reducción permite la regeneración de NAD<sup>+</sup>, un evento fundamental para el proceso de fermentación.

La reducción del piruvato (o de otro producto oxidativo) marca el inicio de la síntesis de los productos de desecho, que pueden ser alcoholes, gases o ácidos orgánicos, los cuales son excretados al medio extracelular.

Mientras que la oxidación completa de un mol de glucosa hasta dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y agua en condiciones aeróbicas genera 38 moles de ATP, la fermentación produce entre 1 y 3 moles de ATP por cada mol de glucosa consumido.

Existen diferentes tipos de fermentación, muchas veces definidos no solo por los productos finales del proceso, sino también por los sustratos energéticos que son empleados como “combustible”.

Pueden mencionarse 5 tipos de fermentación:

- Fermentación alcohólica
- Fermentación láctica o ácido-láctica
- Fermentación propiónica
- Fermentación butírica
- Fermentación de ácidos mixtos

## La fermentación de la Kombucha

La Kombucha es una bebida fermentada que se obtiene a partir de té, azúcar y una colonia de microorganismos conocida como “cultivo madre” o “SCOBY” (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast). Este proceso de fermentación es una fermentación mixta, ya que involucra tanto la fermentación alcohólica como la fermentación acética.

Se compone de dos fases: una biopelícula flotante y una fase líquida ácida. El ácido acético, el ácido glucónico y el etanol son los componentes principales del líquido y de la biopelícula (Czaja et al., 2006).

Se prepara tradicionalmente al fermentar té negro, endulzado con sacarosa, con una capa de celulosa donde existe una simbiosis de levaduras y bacterias del ácido acético, y un 10% de inóculo de Kombucha ya preparada.

La fermentación de la Kombucha resulta de la combinación de tres fermentaciones diferentes: alcohólica, láctica y acética. Las bacterias y levaduras presentes en el medio crean una poderosa simbiosis capaz de inhibir el crecimiento de microorganismos contaminantes (Vitas et al., 2013)

Durante la fermentación se produce una nueva capa de celulosa sobre la anterior. Las levaduras fermentan la sacarosa y la transforman en fructosa, glucosa y etanol (Reiss, 1994) (Sievers, Lanini, Weber, Schuler-Schmid, & Teuber, 1995). Luego las bacterias del ácido acético convierten la glucosa a ácido glucónico y la fructosa en ácido acético.

El ácido acético estimula a las levaduras a producir etanol y el etanol por su parte puede ayudar a las bacterias del ácido acético a crecer y producir ácido acético (Liu, Hsu, Lee, & Liao, 1996).

Se ha reportado que el etanol y el ácido acético tienen actividad antimicrobiana contra bacterias patogénicas y consecuentemente proveen protección contra la contaminación de la Kombucha (Teoh, Heard, & Cox, 2004). La capacidad de los microorganismos del cultivo microbiano de producir una mayor cantidad de ácidos orgánicos da lugar a un bajo pH, con lo que se impide el crecimiento de microorganismos patógenos no deseados y se garantiza la seguridad de la bebida fermentada (Chen y Liu, 2000). L

### Fuentes de carbono

La fuente de carbono es el carbohidrato o sacárido utilizado como nutriente principal en un medio. Los carbohidratos son bloques de construcción para macromoléculas. Estos se pueden dividir en monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos, y polisacáridos. Los monosacáridos y disacáridos que tiene menor peso molecular son conocidos como azúcares.

Según lo reportado por Hermann (1928) y Reiss (1994), se tiene una idea de la actividad metabólica causada por la presencia de cada fuente de carbono en la

fermentación de la Kombucha. Por acción de las levaduras presentes en la Kombucha, la sacarosa, glucosa, fructosa, y maltosa son fermentadas a etanol.

Las fermentaciones realizadas en el hogar usualmente son de 1 a 2 litros, mientras que la fermentación comercial es conducida en volúmenes de 100 L. Análisis del líquido fermentado ha revelado la presencia de ácidos acéticos, lácticos y glucónicos como componentes mayoritarios (Frank, 1995). Los mayores metabolitos que se obtienen de la fermentación de la Kombucha incluyen: monosacáridos, varios tipos de ácidos orgánicos y vitaminas (Malbasa, Loncár, Djurié, & Dosenovic, 2008).

De las bacterias involucradas en la fermentación de la Kombucha estas son las más importantes:

Cuadro 2.8. Composición microbiana de la colonia de kombucha.

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

Fuente: Greenwalt et al. (2000).

En el primer estado, las bacterias productoras de celulosa aumentan su población mediante el consumo de oxígeno disuelto. Durante este tiempo, el microorganismo sintetiza cierta cantidad de celulosa en el medio líquido y solo las bacterias que se encuentran en la interfaz aire/medio pueden mantener su actividad y producir celulosa, que está formada por capas superpuestas. A medida que avanza el tiempo de fermentación, el espesor de la membrana aumenta por la generación de nuevas capas en la superficie, formando una estructura suspendida en el medio de cultivo. El desarrollo de la biopelícula junto con los enlaces de hidrógeno y C-H continúan durante toda la fermentación, su síntesis llegará a su límite cuando crezca hacia abajo atrapando todas las bacterias, que luego se volverán inactivas debido al suministro insuficiente de oxígeno (Esa et al., 2014). Las bacterias que quedan en la fase líquida del medio de cultivo se encuentran en estado latente y pueden reactivarse y utilizarse como inóculo en una fermentación posterior (Ruka et al., 2012).

Los análisis de la composición química de Kombucha, demuestran la presencia de varios ácidos orgánicos, como el acético y el glucónico, además de azúcares, etanol, compuestos fenólicos, entre otros. Las bacterias del ácido acético convierten la glucosa en ácido glucónico y la fructosa en ácido acético. El ácido acético estimula a las

levaduras a producir etanol, y la presencia de etanol facilita el crecimiento de las bacterias del ácido acético y, por consecuencia, la producción de ácido acético (Jayabalan et al., 2014). Se ha informado que tanto el etanol como el ácido acético tienen actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas (Liu et al., 1996)

### Parámetros fisicoquímicos de la bebida Kombucha

Los análisis de la composición química de Kombucha, demuestran la presencia de varios ácidos orgánicos, como el acético y el glucónico, además de azúcares, etanol, compuestos fenólicos, entre otros. Las bacterias del ácido acético convierten la glucosa en ácido glucónico y la fructosa en ácido acético. El ácido acético estimula a las levaduras a producir etanol, y la presencia de etanol facilita el crecimiento de las bacterias del ácido acético y, por consecuencia, la producción de ácido acético (Jayabalan et al., 2014). Se ha informado que tanto el etanol como el ácido acético tienen actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas (Liu et al., 1996)

Cuadro 2.9. Parámetros fisicoquímicos de kombucha.

Parámetro fisicoquímico	
Acidez total (% de ácido acético)	1.06 ± 0.02
pH	3.98 ± 0.03
Etanol (g/L)	0.43 ± 0.08
Azúcares reductores totales (g/L)	3.17 ± 0.28

Fuente: Santos et al., 2017.

El conocimiento de la composición y las propiedades fisicoquímicas de la Kombucha es crucial para comprender mejor su cinética. Sin embargo, la composición y la concentración de metabolitos producidos durante la fermentación de Kombucha dependen de la fuente del inóculo (Nguyen et al., 2015), de la concentración de azúcar y de té (Fu et al., 2014; Watawana et al., 2017), del tiempo de fermentación (Chen y Liu, 2000) y de la temperatura (Jayabalan et al., 2008), y cualquier cambio de estas condiciones puede afectar al producto final.

## Composición química de la bebida Kombucha

Kombucha se compone de una serie de ácidos orgánicos, azúcares, vitaminas, aminoácidos, aminas biógenas, purinas, pigmentos, lípidos, proteínas, algunas enzimas hidrolíticas, etanol, cafeína, dióxido de carbono, polifenoles, aniones, minerales, ácido D-sacárico-1, 4-lactona (DSL), metabolitos bacterianos. En la composición química las hojas de té utilizadas para producir Kombucha ha sido bien estudiado y tendrá un impacto en la concentración de los compuestos dentro de la Kombucha. La presencia y las cantidades de ciertos compuestos químicos dependen de los microorganismos que se encuentran con el SCOBY, parámetros de fermentación (tiempo y temperatura), concentración de sacarosa, tipo de té utilizado.

Si se utiliza sacarosa como fuente primaria de carbono para la fermentación, el ácido acético será el metabolito predominante. Otros ácidos orgánicos también se producen durante el proceso de fermentación, si se permite que el proceso de fermentación continúe durante demasiado tiempo el Ph caerá muy bajo y se convertirá en un líquido que no se puede beber.

### Vitaminas

Los científicos han confirmado a través de la investigación que la Kombucha se compone de una amplia variedad de componentes químicos que provienen del té verde y negro. Algunos de estos se saben que los componentes afectan positivamente el sistema inmunológico humano y procesos metabólicos en el cuerpo. La Kombucha fermentada con té verde o negro contiene altos niveles de vitamina C o ácido ascórbico, y trazas de algunas vitaminas B. Las vitaminas son componentes necesarios para numerosos procesos bioquímicos y fisiológicos que toman importancia en el cuerpo. Las vitaminas no pueden ser sintetizadas dentro del cuerpo; por lo tanto, deben ser suplementado en la dieta para obtener niveles saludables.

La vitamina C soluble en agua y Vitamina B (tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantoténico, B6, biotina, B9 y cobalamina) han sido reportados en Kombucha. Las vitaminas solubles en agua tienen menos probabilidades de almacenarse dentro del cuerpo como las liposolubles, (vitaminas A, D, E o K) porque se transportan rápidamente a través del flujo sanguíneo después de su consumo. La vitamina C apoya la salud humana mediante el uso de antioxidantes, la formación de colágeno para ayudar en el tejido conectivo. En el apogeo de una infección, los niveles de vitamina C se agotan rápidamente. El mecanismo detrás de esta acción puede explicarse por el hecho de que la vitamina C no requiere una coenzima, aunque actúa como cofactor para una enzima llamada "prolyl hidrolasa", que ayuda en la formación de colágeno.

## Minerales

Kombucha es una bebida compleja con cierto número de componentes, algunos de los cuales son minerales, que naturalmente provienen del té. Los minerales son sustancias inorgánicas que juegan un rol muy importante en el cuerpo humano. Tan solo pequeñas cantidades son requeridas por el cuerpo para un funcionamiento normal, crecimiento y mantenimiento. Los minerales esenciales como el potasio, cobalto, manganeso, hierro, cobre, y magnesio pueden ser encontrados en Kombucha hecha de té verde o té negro. Bauer Petrovska y Petrushevska Tozi (2000) cuantificaron el contenido de manganeso, hierro, níquel, cobre, zinc, plomo, cobalto, cromo y cadmio en Kombucha. La concentración puede variar de 0.004 µg/ml para cobalto y 0.462 µg/ml para magnesio. Los autores también analizaron metales conocidos como tóxicos. Plomo (0.005 µg/ml) y cromo (0.001 µg/ml) fueron detectados en Kombucha, Mientras que el Cadmio no fue detectado.

## Polifenoles

Los polifenoles son sustancias bioactivas que contienen más de una estructura fenol por molécula. Los polifenoles representan el grupo más grande de fitoquímicos y son los más abundantes antioxidantes en la dieta. Se estima que las personas ingieren más de 1 g / día de polifenoles. Los té verdes, negros y muchos otros son ricos en polifenoles solubles en agua; estos componentes componen el aroma y el sabor del té. Estos compuestos pueden expresar hasta el 30% del peso seco de las hojas de té, según la literatura. Los polifenoles primarios que se encuentran en las hojas de té frescas son flavonoides, galato de flavonol y glucósidos de flavonol. Los flavonoides son un grupo de compuestos bioactivos producidos durante metabolismo vegetal. Los flavonoides se pueden encontrar en frutas y verduras, como las frambuesas, arándanos y espinacas, junto con bebidas, como vino y té. Las catequinas, a menudo denominadas flavonoles, son un tipo de compuesto bioactivo que es una subclase de flavonoides. Estos compuestos son también los metabolitos secundarios y primarios encontrados en el té]. Las catequinas principales son:  $\alpha$ - epigalocatequina-3-galato (EGCG),  $\alpha$ -epigalocatequina (EGC),  $\alpha$ -epicatequina-3-galato (ECG),  $\alpha$ -epicatequina (CE),  $\alpha$ -epicatequina-3-galato (ECG),  $\alpha$ -galocatequina, y  $\beta$ - catequina. Cabe señalar que la concentración de catequinas puede variar según el tipo y estilo del té. Los niveles de catequinas en el té verde son relativamente estables, a diferencia del té negro, porque en contraste con el té negro, el té verde no se somete a algún tipo de proceso oxidativo durante la fabricación. Debido a la mayor concentración de catequinas, esta es la razón principal por la que el perfil de sabor característico del té verde menudo se describe como amargo y astringente. Las catequinas en el té negro se oxidan para formar teaflavinas y tearubiginas, lo que hace que los niveles de catequinas disminuyan en un 85% en comparación con el té verde. Esta es la razón por la que el té negro es más oscuro y menos amargo. Las propiedades antioxidantes de los polifenoles son responsables de los beneficios para la salud asociados con té y

Kombucha, como la prevención del cáncer, aumento de la inmunidad, reducción de inflamación y artritis.

El número total de polifenoles y concentraciones individuales específicas en Kombucha puede variar basado en el tipo de hojas de té usadas. Cardoso et al. (2020) Estudios de análisis de Kombucha infusionada con té verde y té negro encontraron que un total de concentración de polifenoles varía de 0,70 mg GAE/ml (Té verde) a 1,09 mg de GAE/mL (Té negro).

### **Etanol**

El etanol, es un subproducto de la fermentación de las levaduras, y también puede ser encontrado en Kombucha. La concentración de etanol puede continuar incrementándose durante la fermentación progresiva. Chen y Liu (2000) realizó un estudio y encontraron que la concentración de etanol alcanzó su valor máximo de 5,5 g/L en el día 20 de la fermentación, seguido de una disminución lenta. Todo el perfil químico (azúcares, dióxido de carbono, ácidos orgánicos, etc.) jugados de la Kombucha juegan un papel en el perfil final de sabor y aroma de la bebida terminada, por lo que es importante controlar los parámetros de fermentación para obtener las características deseadas del producto final. La Kombucha tradicional contiene etanol. La administración de la FDA ha investigado que el rango de Kombucha está entre 0.7- 1.3% de alcohol por volumen (ABV). Sin embargo, las cervecerías artesanales están empezando a hacer lo que se conoce como "Hard". Kombucha que es Kombucha con mayores cantidades de alcohol. Se sabe que la "Hard" Kombucha tiene un contenido de alcohol de alrededor de 3.5-5.5% ABV o más alto.

### **Ácidos Orgánicos**

Kombucha se compone de una serie de ácidos orgánicos, tales como acético, glucónico, glucurónico, cítrico, L-láctico, málico, tartárico, masónico, oxálico, succínico, pirúvico y úrico. La composición y la concentración de metabolitos dentro de la Kombucha pueden variar mucho debido al cultivo iniciador utilizado, concentración de azúcar y té, tiempo de fermentación y la temperatura de fermentación. La levadura y las bacterias hidrolizan la sacarosa en glucosa y fructosa utilizando la enzima invertasa. La levadura dentro de la matriz produce etanol a través de la glucólisis, utilizando fructosa como el sustrato primario. La bacteria del ácido acético utiliza la glucosa para producir ácido glucónico y también utiliza el etanol producido por la levadura y lo convierte en ácido acético. El ácido acético es el compuesto orgánico responsable del sabor y aroma del vinagre comúnmente asociado con Kombucha. La concentración de este ácido puede variar; sin embargo, tiende a alcanzar su punto máximo a 11 g / L en el día 30 del proceso de fermentación y bajará a 8 g / L para el día 60. La razón de la reducción en ácido acético se debe a los microorganismos dentro de la Kombucha que utilizan ácido acético como fuente de carbono después de haber agotado todo el azúcar y el etanol dentro de la matriz de fermentación.



El etanol y el ácido acético que se encuentran en la Kombucha se ha informado que proporcionan propiedades antisépticas, inhibiendo el crecimiento de patógenos.

El ácido láctico se encuentra principalmente en la Kombucha hecha de té verde, en lugar de otros té, por ejemplo, negros. Los microorganismos producen ácido glucurónico a partir de la oxidación de glucosa durante el proceso de fermentación. El ácido glucurónico es el desintoxicante más importante el cuerpo debido a su capacidad para unirse con compuestos tóxicos en el hígado. Una vez que esos compuestos tóxicos se enlazan, el cuerpo los puede excretar a través de los riñones. El ácido glucurónico (GlcUA) juega un papel importante en la desintoxicación del hígado debido a su capacidad para combinar moléculas tóxicas, que son eliminadas por los organismos. Este ácido está involucrado con la eliminación de endobióticos (xenobióticos). La bilirrubina es un endobiótico bien conocido, que se elimina por GlcUA (glucuronidación) para evitar que los pigmentos tóxicos dañen el organismo. La mayor parte de la bilirrubina se excreta a través de la bilis, mientras que una porción más pequeña se excreta en la orina, por lo que las altas concentraciones de bilirrubina se encuentran en la orina son una indicación de daños en algún lugar del proceso. El ácido glucurónico también juega un papel importante en el aumento de la biodisponibilidad de los polifenoles. Los fenoles se conjugarán con GlcUA, mejorando su capacidad de transporte, junto con ella su biodisponibilidad. El ácido glucurónico también es un precursor para la biosíntesis de vitamina C.

### **Cafeína**

La cafeína es un alcaloide xantina natural que se encuentra en varias plantas, como el café, té y cacao. Cafeína, y en menor medida teobromina y teofilina, son componentes bien conocidos del té. La cafeína dentro de la planta se utiliza como pesticida para proteger la planta de los insectos. Los seres humanos tienden a consumir productos con cafeína solo por el efecto estimulante sobre el sistema nervioso que proporcionan, junto con un aumento de la energía. Sin embargo, algunas personas son sensibles a la cafeína y vigilan su consumo diario de cafeína. La cafeína constituye aproximadamente del 3% al 6% de las hojas de té. La concentración de cafeína dentro de las hojas de té varía según las condiciones de cultivo y el procesamiento posterior de las hojas de té. Cuando se trata de Kombucha, la cafeína juega un papel importante durante el proceso de fermentación, al proporcionar a la levadura y las bacterias el nitrógeno necesario para los procesos metabólicos y la construcción de nuevas células, así como proporcionar energía para la levadura y las bacterias para que puedan someterse al proceso.

### **Aminoácidos**

Los aminoácidos que se encuentran en los alimentos y bebidas son esenciales para el cuerpo humano. Hay una serie de aminoácidos que se han identificado en el té, como el ácido aspártico, onina, ácido glutámico, glicina, a-alanina, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, lisina, histidina, arginina, glutamina,

asparagina, triptófano y teanina. La teanina es el aminoácido más abundante que se encuentra en el té, representando el 50% de los aminoácidos totales y el 1% del peso seco del té. Si bien los aminoácidos juegan un papel importante en el cuerpo humano, se pueden transformar en aminas biógenas (BAs). Los BA son el resultado de la descarboxilación microbiana durante el proceso de fermentación. Algunos BA son esenciales para el metabolismo celular, mientras que otros pueden ser dañinos si se consume en altas concentraciones, como la histamina, tiramina, putrescina, cadaverina,  $\beta$ -feniletilamina, agmatina, triptamina, serotonina (SRT), espermidina, y espermina. Por lo general, el consumo de bajas cantidades de bacteria acéticas tiende a no tener un impacto en el cuerpo humano; sin embargo, se pueden encontrar niveles elevados tóxicos de BA en alimentos fermentados. Varios factores pueden influir en la formación de BA, como las condiciones de cultivo, procesamiento y almacenamiento.

Las Bacterias acéticas (*Acetobacter*) son un grupo importante de compuestos para controlar y monitorear debido a las posibles implicaciones toxicológicas y sanitarias en el cuerpo humano, pero también se utilizan como indicadores de calidad, seguridad y frescura del producto para diversos tipos de alimentos (carne y pescado) y bebidas (vino). El número de artículos y reseñas que discuten la concentración de *Acetobacter* en Kombucha es limitada. Los investigadores se han centrado en analizarlos aminoácidos individuales y los *Acetobacter* en el propio SCOBY (capa de celulosa); sin embargo, ningún investigador ha discutido la concentración de la Kombucha en sí, que es típicamente consumido. Los investigadores han encontrado que el SCOBY contenía concentraciones más altas de lisina, isoleucina y leucina y niveles más bajos de fenilalanina, valina, metionina, treonina, triptófano, ácido glutámico, alanina, ácido aspártico y prolina. De los aminoácidos identificados en el SCOBY sólo tres (lisina, fenilalanina y triptófano) son precursores de *Acetobacter* potencialmente dañinos. La etilamina, la colina y la adenina son las únicas *Acetobacter* identificables encontrados en Kombucha que se han discutido en la literatura, ninguno de los cuales son perjudiciales. Bromley (2021) examinó la concentración de *Acetobacter* en Kombucha y encontró que no había aminas biógenas en la muestra.

### **Atributos y propiedades de la bebida Kombucha**

Se ha acumulado una cantidad considerable de experiencias referentes al té de Kombucha, éste se ha venido utilizando durante centenares de años como remedio natural, con buenos resultados. Aparte de su uso como bebida refrescante, casi todos los artículos mencionan también su valor medicinal. Se citan innumerables enfermedades para las cuales se usa y se ensalza la Kombucha, desde ligeras indisposiciones hasta grandes enfermedades.

Muchos de los efectos beneficiosos atribuidos a la Kombucha requieren más investigación. Otros efectos activos, sin embargo, han sido ampliamente verificados

científicamente o mediante experiencias prácticas, por ejemplo, la regulación de la flora intestinal, el reforzamiento de las células, la desintoxicación y purificación, el equilibrio del metabolismo, los efectos antibióticos, los efectos beneficiosos sobre el equilibrio ácido/alcalino, el refuerzo de la resistencia a la enfermedad.

La bebida Kombucha ha sido adoptada entre la categoría de superalimento funcional, debido a su alta demanda en el mercado occidental. Los beneficios terapéuticos asociados con la Kombucha se han relacionado con los componentes para la salud que se encuentran en el té y los compuestos producidos durante el proceso de fermentación. Se ha demostrado que la bebida Kombucha proporciona propiedades profilácticas cuando se consume regularmente. Los estudios han demostrado que el la Kombucha tiene propiedades antioxidantes, antibacterianas y antidiabéticas junto con su capacidad para reducir el colesterol, apoyar el sistema inmunológico y estimular la desintoxicación del hígado. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que, si bien algunas de estas propiedades se han demostrado que son ciertas a través de estudios científicos y experimentales, la evidencia científica limitada se basa en modelos humanos. Todavía se requiere investigar más profundamente.

### **Efectos Antioxidantes**

El estrés oxidativo es un importante contribuyente a una serie de condiciones patológicas, tales como el envejecimiento. Compuestos bioactivos que han demostrado tener propiedades antioxidantes han ido ganando interés como potencial herramienta terapéutica para combatir el estrés oxidativo relacionado enfermedades. La definición más popular de un antioxidante es la de cualquier sustancia, cuando está presente en bajas concentraciones de un sustrato oxidativo retrasará significativamente o inhibir la oxidación del sustrato. La bioactividad de los antioxidantes es amplia y están clasificados en forma de:

- propiedades de eliminación
- metales pro oxidantes de unión
- la inhibición de enzimas pro oxidantes.

Los polifenoles que se encuentran en la Kombucha son el resultado del tipo de hojas de té utilizadas. La Kombucha hecha de té verde o negro contiene tres tipos de polifenoles:

- flavonoides flavonoles
- galato de flavonol
- glucósidos de flavonol

La Catequina es un flavonol, que pertenece al subgrupo de polifenoles llamados flavonoides. Los polifenoles juegan un papel vital en la dieta humana y se han relacionado con el bienestar porque de sus propiedades promotoras de la salud, como ciertos efectos antioxidantes. Los Polifenoles se considera que tienen el más alto nivel de propiedades antioxidantes debido a su capacidad para eliminar los radicales libres y

las especies reactivas de oxígeno. Son capaces de reducir las reacciones radicales libres en cadena mediante la obtención de aniones peróxido, radicales lipídicos, radicales hidroxilos, y especies reactivas de oxígeno. Varios parámetros pueden influir en la concentración de antioxidantes encontrada en Kombucha, como el tipo de hojas de té utilizadas, la duración de la fermentación, fuente de carbono, pH, temperatura, tamaño del inóculo y cultivo iniciador. Los antioxidantes se encuentran predominantemente en fuentes vegetales naturales, como las hojas de té, que se pueden encontrar en Kombucha. Los polifenoles derivados de las plantas tienen un impacto beneficioso en disminuir el proceso de envejecimiento y reducir el riesgo de algunas condiciones neurodegenerativas como el Alzheimer, Parkinson, etc.

En la mayoría de los casos, la concentración de antioxidantes en la Kombucha es mayor que la original del té. Se supone que algunos de los compuestos fenólicos de menor peso molecular son modificados estructuralmente por enzimas durante el proceso de fermentación. También se ha demostrado que esa actividad antioxidante aumenta con el tiempo de fermentación. Cabe señalar que el aumento de la actividad antioxidante se basa en el tipo de té utilizado, el microbiota del SCOBY, y el tiempo de fermentación, todos los cuales determinan los metabolitos formados durante y después del proceso de fermentación. Por lo tanto, debe tenerse en cuenta que la Kombucha podría ser una fuente potencial de antioxidantes.

### **Efectos antimicrobianos**

Se ha demostrado que la Kombucha, además de las características probióticas, tiene cualidades antimicrobianas. También se ha demostrado que la Kombucha inhibe el crecimiento de varios microbios que se sabe que representan un riesgo para la salud de los seres humanos, como *Shigella Sonnei*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium*. El ácido acético y las catequinas son conocidas por su capacidad para inhibir una amplia gama de bacterias Gram positivas y Gram-negativas. También se ha demostrado que el líquido de Kombucha en sí contiene algunas propiedades similares a las de los antibióticos junto con sus propiedades antibacterianas y anti fúngicas. La actividad antimicrobiana es predominante debido al bajo pH de la Kombucha y la presencia de ácido acético, así como otros ácidos orgánicos y catequinas.

### **Efectos Probióticos**

Los probióticos se definen como microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades, pueden conferir beneficios para la salud al huésped. Los cambios en la dieta de un individuo pueden dar lugar a modificaciones en el microbiota intestinal de una persona. *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* son dos de las cepas más comunes de bacterias asociadas con los probióticos. Estos microorganismos tienden a pertenecer a las mismas bacterias ya presentes dentro del huésped y tienen la capacidad de tolerar ambientes acidificados. De los beneficios asociados con el consumo de probióticos es la inhibición de microbios patógenos; bajar el colesterol; reducción de la incidencia de

estreñimiento, diarrea y cáncer de colon; mejoramiento de la intolerancia a la lactosa, absorción de calcio, síntesis de vitaminas; y la estimulación del sistema inmune.

Kombucha es una bebida compleja, ya que los microbios utilizados para producir este producto contienen una serie de microbios de múltiples taxones y pueden fluctuar, lo que podría afectar el sabor y aroma del producto final. La variabilidad asociada con los microbios dentro del SCOBY pueden tener un gran impacto en el producto final.

Cervecerías comerciales no puede depender de cargas microbianas no probadas o inconsistentes para producir una alta calidad de producto sobre una base consistente, razón por la cual la industria ha tenido que estandarizar el proceso utilizando un conjunto de microbios específicos. Los investigadores han estado caracterizando microbios esenciales para que puedan encontrar la mejor mezcla de microbios para mejora sobre el rendimiento de Kombucha. Wang et al. (2020) desarrollaron una comunidad sintética de microbios que podría ser utilizada para producir Kombucha. Los tres microorganismos utilizados fueron: *Acetobacter pasteurianus*, *Komagataeibacter xylinus* (anteriormente nombrado *GluconacetobacterXilinus*), y *Zygosaccharomyces bailii*. Los autores determinaron que podían obtener resultados satisfactorios. Al manipular el microbio utilizado en la producción de Kombucha, y las propiedades funcionales de la bebida también podrían mejorarse.

Varias fábricas de Kombucha no pasteurizan su producto para garantizar que los microbios que se encuentran dentro de él tienen la capacidad de continuar siendo potencialmente clasificados como bebida probiótica o prebiótica. Si bien hay otras fábricas de Kombucha que pasteurizan su producto y agregan cepas probióticas reconocidas de nuevo, esta adición de probióticos puede ser útil dependiendo del país de venta.

### **Efectos Terapéuticos**

Kombucha tiene un buen número de otras propiedades terapéuticas como ser anticancerígeno, antiinflamatorio, antimicrobiano, hepatoprotector, antidiabético y antiestrés, solo por nombrar algunos. Un buen número de beneficios para la salud están relacionados a la actividad antioxidante. Investigadores han propuesto muchos mecanismos asociados a efectos anticancerígenos con polifenoles del té, incluyendo la inhibición de mutaciones genéticas, inhibición de la proliferación de células cancerosas, la inducción de muerte celular en células cancerosas y el fin de la metástasis.

Actividad antiinflamatoria Villarreal-Soto et al. (2019) realizaron un estudio donde evaluaron la actividad antiinflamatoria del té negro no fermentado y del té negro fermentado con el cultivo 27 microbiano de Kombucha contra la enzima 5-lipooxigenasa (5-LOX), implicada en la inflamación gástrica, en el cual se obtuvo una mejora en esta actividad después de la fermentación. El té sin fermentar obtuvo un 66 % de inhibición y el té fermentado obtuvo valores entre 87-91 % después de 21 días de fermentación. Se obtuvo un valor de la concentración inhibitoria media máxima (IC50) de  $9.0 \pm 0.0 \mu\text{g/mL}$ , el cual está cerca del valor de la IC50 del ácido nordihidroguaiarético ( $7.0 \pm 0.2$

µg/mL), el inhibidor natural de la enzima. Estos resultados indican que el extracto de Kombucha puede ser potencialmente eficaz como inhibidor de la enzima 5-LOX, y, por ende, presentar actividad antiinflamatoria.

Investigaciones detalladas revelaron que la bebida Kombucha, aparte de otras sustancias difíciles de definir, posee un efecto antibiótico, en particular produce ácido glucurónico, vitaminas B1, B2 B3,B6,B12 así como ácido fólico y dextrogyral, es decir Acido L-láctico.

El de mayor interés es el Ácido Glucurónico y Acido L-Láctico(+). Un hígado sano produce cantidades suficientes de ácido glucurónico, el cual difícilmente se puede obtener de forma sintética. Rodea lo que ha entrado en el cuerpo y luego lo transporta a través de la vesícula biliar hacia los intestinos o a través de los riñones, hacia la orina. Las toxinas atrapadas por el ácido glucurónico no pueden ser reabsorbidas por los intestinos o el sistema urinario. Por consiguiente, el ácido glucurónico tiene una función desintoxicante extraordinariamente importante. Un cuerpo sano puede producirlo el mismo en el hígado en cantidades suficientes, bajo circunstancias normales, asegurándole una adecuada desintoxicación general del sistema. Cuando el medio ambiente contiene una excesiva cantidad de sustancias tóxicas circulando libremente o cuando una cantidad excesiva de toxinas metabólicas endógenas se acumulan en el cuerpo, la producción se hace crítica. (Gunter Frank W.2005)

### **Efectos anticancerígenos**

Cardoso et al. (2020) analizaron el efecto citotóxico/citoprotector in vitro de los extractos de Kombucha de té negro y de té verde en relación con líneas celulares de adenocarcinoma epitelial de pulmón (A549), adenocarcinoma colorrectal ileocecal (HCT8), adenocarcinoma colorrectal epitelial (CACO-2) y célula pulmonar normal (IMR90), donde demostraron que los extractos de Kombucha utilizados inhiben el crecimiento en un 50 % (IC50, IG50 y LC50), lo que indica que las células fueron inhibidas, sin embargo, las células pulmonares no cancerosas exhibieron valores de IG50 más altos para ambos extractos (>200 µg/mL) en comparación con todas las células cancerosas. Estos resultados sugieren que los extractos tienen mejor actividad citotóxica en las líneas de células cancerosas en comparación con la línea de células no cancerosas, lo que significa que los extractos poseen acción anti proliferativa y efectos anticancerígenos.

El Ácido L-Láctico (+) (dextrogiral) casi nunca está presente en el tejido conectivo de los pacientes con cáncer. Mientras que este se encuentre predominantemente presente en los tejidos, el cáncer no se puede desarrollar. Es interesante apuntar aquí que en los enfermos de cáncer el pH supera el 7.56. Los organismos que están libres de cáncer (y también libres de predisposición al cáncer) muestran un pH por debajo de 7.5. Un déficit de Ácido L-Láctico (+) en la dieta provoca fallos en la respiración de las células, la fermentación durante una bajada de azúcar y la producción de ácido DL-Láctico en los tejidos. Las mezclas de ambos ácidos lácticos (levogiral (-) y dextrogiral (+), es decir

ácido láctico D y L) en cantidades iguales, cuyas direcciones se anula mutuamente la una a la otra, se llaman racemates. Esos racemates favorecen el desarrollo del cáncer y son incluso los primeros causantes de la enfermedad.

La comida con un alto contenido de dextrogiral, es decir ácido L'Lactico, el trabajo manual, el entrenamiento muscular, la sauna etc., además de eliminar toxinas, permiten al cuerpo controlar este ácido láctico y de este modo regular el valor del pH en la sangre y ayudar a rebajarlo. Las pruebas en la sangre han demostrado que la bebida Kombucha cambiaba valores notables de pH hacia el lado ácido. Esto puede darles una idea global de nuestro interés capital en la Kombucha. Pruebas detalladas de orina demostraron que después de beber Kombucha, la orina del paciente que no había bebido nunca Kombucha antes, contenía restos considerables de toxinas (como plomo, mercurio, benzol, caesium, etc.) de este modo, quedo confirmado que la bebida estaba completamente libre de estas sustancias. (Gunter Frank W.2005)

### **Efectos anti hiperglucémicos**

Bhattacharya et al. (2013) estudiaron el efecto protector de Kombucha en diferentes órganos incluyendo páncreas, hígado, riñón y corazón de modelos de ratas diabéticas y los resultados obtenidos mostraron un potencial antidiabético significativo que permitió la restauración de los cambios fisiopatológicos inducidos. La actividad antihiperglucémica de la Kombucha se lleva a cabo mediante la liberación de insulina del páncreas, es decir, ejerce un efecto insulínico directo. Los polifenoles complejos de la Kombucha, conocidos como teaflavinas y tearubiginas, podrían prevenir el daño y la muerte de las células  $\beta$  del páncreas y/o estimular la regeneración de este tipo de células en las ratas diabéticas (Srihari et al. 2013)

### **Efectos antivirales**

El uso de bebidas como la Kombucha o sus compuestos bioactivos como agentes antivirulentos es un método alternativo para superar la creciente aparición mundial de resistencia antimicrobiana en los patógenos entéricos. Bhattacharya et al. (2020) estudiaron la actividad antivirulenta in vitro e in vivo de una fracción polifenólica aislada (compuesta principalmente por catequina e isoramnetina) de Kombucha contra el *Vibrio cholerae*, el agente causal del cólera, una grave enfermedad diarreica transmitida por el agua que afecta aproximadamente de 1.3 a 4 millones de personas y mata entre 21,000 y 143,000 personas anualmente en todo el mundo (OMS, 2018).

En dicho estudio se centraron en investigar los efectos antivirulentos de la fracción polifenólica de Kombucha al atacar la motilidad y la actividad proteolítica de la cepa, ya que estos factores son cruciales para colonizar las células durante la etapa inicial de infección del microorganismo. Los resultados reportados indicaron que la fracción polifenólica inhibió significativamente la motilidad del enjambre bacteriano y la expresión de los genes reguladores flagelares *motY* y *flaC*, incluso en concentraciones

subinhibitorias. De la misma forma, los compuestos polifenólicos también disminuyeron la secreción de proteasa bacteriana y la penetración de las células bacterianas a través de la capa de la mucina (Bhattacharya et al., 2020)

El estudio in vivo reveló que la fracción polifenólica inhibió significativamente la acumulación de fluidos inducida por *V. cholerae* en un modelo de bucle ileal de conejo y la colonización intestinal en un modelo de ratones lactantes. Por lo tanto, la actividad antivirulencia de la fracción polifenólica de Kombucha produce la inhibición de la motilidad y la secreción de proteasas de *V. cholerae*, con lo que se impide la acumulación de líquido y la colonización bacteriana en las células epiteliales intestinales (Bhattacharya et al., 2020).

## **Componentes de la Kombucha comercial**

### **Azúcar**

El Azúcar es el alimento básico que necesitan las levaduras para alimentarse. Estas la sintetizan y la convierten en alcohol y dióxido de carbono. La levadura desdobla los azúcares complejos en monosacáridos que así son fácilmente utilizables por las bacterias las cuales producen los ácidos beneficiosos y la formación homogénea de la membrana de Kombucha. Para este cultivo se suele recomendar persistentemente la utilización exclusiva de sacarosa, el azúcar blanco refinado, sea de caña o blanquilla de remolacha azucarera. Sin embargo, según nuestra experiencia y por los años que llevamos cultivándolo recomendamos mejor el uso de la azúcar denominada morena.

En principio la Kombucha para obtener energía y nutrientes solo necesita de té y sacarosa, por lo que la utilización de azúcar refinada quedaría asumida como la mejor para el cultivo. Cualquier otra cosa según dicen algunos autores podría entorpecerlo y contaminar la madre con residuos, microorganismos y sustancias inapropiadas.

La fuente de carbono es el carbohidrato o sacárido utilizado como nutriente principal en un medio. Los carbohidratos son bloques de construcción para macromoléculas. Estos se pueden dividir en monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos, y polisacáridos. Los monosacáridos y disacáridos que tiene menor peso molecular son conocidos como azúcares.

Se denomina azúcar, en el uso más extendido de la palabra, a la sacarosa, cuya fórmula química es  $C_{12}H_{22}O_{11}$ , también llamada “azúcar común” o “azúcar de mesa”.

La sacarosa es un disacárido formado por una molécula de glucosa y una de fructosa, que se obtiene principalmente de la caña de azúcar o de la remolacha. El 27% de la producción total mundial se realiza a partir de la remolacha y el 73% a partir de la caña de azúcar.



La sacarosa es un disacárido compuesto de dos monosacáridos, glucosa y fructosa. La glucosa y la fructosa están enlazadas por medio de un enlace entre C1 de la glucosa y C2 de la fructosa. Este es un enlace glucosúrico. Una hidrólisis puede romper el enlace glicosídico, separando la glucosa y fructosa (Lunn, 2008). Por acción de las levaduras presentes en la Kombucha, la sacarosa es hidrolizada en glucosa y fructosa.

el azúcar en la Kombucha es utilizado por los microorganismos como alimento y no como endulzante; pues a medida que avanza la fermentación lo irán descomponiendo en diversas sustancias llegando a ser mínima la concentración de azúcar cuando la fermentación haya concluido, es decir cuanto más ácido sea el té menor será su contenido de azúcares. (RUBIO, A. 2012)

Gran parte de la sacarosa añadida al té es convertida en alcohol (etanol), que al quinto o sexto día comienza a ser transformado en ácido acético. El té fermentado contiene entre 0,4% y 0,5% de etanol, dependiendo del tiempo y de las condiciones de fermentación. Según la ley, toda bebida con un contenido de alcohol inferior a 0,5% puede denominarse bebida "sin alcohol". (STEVENS, N. 2003)

El azúcar juega un rol importante en la actividad metabólica del cultivo de Kombucha. El cultivo se alimenta del azúcar y obtiene energía, también de los minerales y del nitrógeno que ha sido transferido al líquido de las hojas de té. Consumidores que sufren de diabetes usualmente dejan la Kombucha fermentar por un tiempo más largo para que el contenido de azúcar sea bajo y el azúcar residual sea en su mayoría fructuosa. (Shenoy, Lobo, & Dias, 2019)

La dulzura de un alimento es expresada en grados Brix (°Bx), una escala que muestra la cantidad de sacarosa disuelta como porcentaje de la solución total. Se sugiere un aproximado de 12 °Bx como el ideal para obtener una bebida equilibrada que no sea muy dulce ni muy ácida. (Redzepi & Zilber, 2018)

## **Agua**

El agua es de vital importancia en los procesos industriales de todos los sectores. El agua es un recurso que funciona para el tratamiento, procesamiento y refinamiento de productos, así como también para la limpieza de equipos y materiales empleados en el proceso.

Es el ingrediente principal usado en las bebidas carbonatadas, el cual debe ser de alta pureza. Para poder formar parte de la bebida, previamente debe ser tratada para remover cuatro tipos de contaminantes (material inorgánico, compuestos orgánicos, contaminación microbiológica y partículas) que pueden afectar el sabor, olor o apariencia de la bebida final (Morrow & Quinn, 2007)

Según el RTCA el agua apta para consumo humano agua potable es aquella que por sus características organolépticas, físicas, químicas y bacteriológicas, no representa un riesgo para la salud del consumidor y cumple con lo establecido en la presente norma.

**Cuadro 2. Características químicas que debe tener el agua para consumo humano**

Características	LMA (mg/L)	LMP (mg/L)
Cloro residual libre <sup>(a)</sup>	0,5	1,0
Cloruro (Cl <sup>-</sup> )	100,0	250,0
Dureza Total (CaCO <sub>3</sub> )	100,0	500,0
Sulfato (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	100,0	250,0
Aluminio (Al)	0,050	0,100
Calcio (Ca)	75,0	150,0
Cinc (Zn)	3,0	70,0
Cobre (Cu)	0,050	1,500
Magnesio (Mg)	50,0	100,0
Manganeso total (Mn)	0,1	0,4
Hierro total (Fe) <sup>(b)</sup>	0,3	-----

a) El Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social será el ente encargado de indicar los límites mínimos y máximos de cloro residual libre según sea necesario o en caso de emergencia.  
b) No se incluye el LMP porque la OMS establece que no es un riesgo para la salud del consumidor a las concentraciones normales en el agua para consumo humano, sin embargo el gusto y apariencia del agua pueden verse afectados a concentraciones superiores al LMA.

### 5.1 Características físicas y organolépticas

**Cuadro 1. Características físicas y organolépticas que debe tener el agua para consumo humano**

Características	LMA	LMP
Color	5,0 u	35,0 u <sup>(a)</sup>
Olor	No rechazable	No rechazable
Turbiedad	5,0 UNT	15,0 UNT <sup>(b)</sup>
Conductividad eléctrica	750 μS/cm	1500 μS/cm <sup>(d)</sup>
Potencial de hidrógeno	7,0-7,5	6,5-8,5 <sup>(c)(d)</sup>
Sólidos totales disueltos	500,0 mg/L	1000,0 mg/L

(a) Unidades de color en la escala de platino-cobalto  
(b) Unidades nefelométricas de turbiedad (UNT).  
(c) En unidades de pH  
(d) Límites establecidos a una temperatura de 25°C.

## Normas Sanitarias que establecen los procesos y métodos de Purificación de Agua para Consumo Humano

**Procesos de purificación.** Se establecen como procesos para la purificación de agua para consumo humano, aplicables en sistemas de abastecimiento, los siguientes:

- a) Remoción de sólidos;
- b) Intercambio de gases; y,

c) Desinfección.

Artículo 7. Proceso de remoción de sólidos. El proceso de remoción de sólidos consiste en la extracción de todas aquellas sustancias sólidas, disueltas o no, que interfieren con otros procesos y métodos de purificación o que alteran la calidad sanitaria y estética del agua.

Artículo 8. Métodos para la remoción de sólidos. Se establecen como métodos aplicables para el proceso de remoción de sólidos, los siguientes:

a) Remoción de sólidos gruesos

b) Desarenado

c) Flotación

d) Coagulación y floculación

e) Sedimentación

f) Filtración

Los varios orígenes del agua se pueden clasificar como agua de lluvia, agua superficial de ríos, lagunas, lagos, depósitos y represas, aguas subterráneas de manantiales y pozos profundos. El agua que se obtiene de los pozos puede ser de tipo suave o duro, dependiendo de las características minerales de las áreas adyacentes. El agua que se filtra naturalmente a través de la arena usualmente es de turbiedad relativamente baja y con poca materia orgánica. El agua de los pozos poco profundos es por lo general más suave que la de pozos profundos. Esta última contiene generalmente una concentración alta de minerales disueltos, esta agua es clara o algunas veces sin color alguno, dependiendo del tipo de roca y suelo con los cuales tienen contacto. Las impurezas encontradas en el agua pueden ser divididos en dos clases: sólidos suspendidos y sólidos disueltos.

Los primeros son aquellos que no se disuelven en el agua y que pueden ser removidos por filtración. Los sólidos disueltos son los que están presentes en el agua y no pueden ser removidos por filtración. La presencia de la dureza en el suministro de agua es un ejemplo típico de sólidos disueltos. Los gases también se pueden disolver en el agua y combinarse químicamente con otras impurezas.

Para lograr tener agua potable, los métodos más comunes son: desinfección, filtración con medios granulares, suavización, osmosis inversa, ozono y esterilización con luz ultravioleta.

La desinfección es la aplicación de algún agente químico (usualmente cloro) para la reducción o eliminación de microorganismos. La filtración con medios granulares es el uso de filtros para retener sólidos suspendidos, normalmente se usan medios como arena sílica, antracita, zeolita o lecho multimedia (mezcla entre los medios). Otro paso importante para la potabilización es el paso por carbón activado, para la retención de subproductos de la desinfección y materia orgánica, así como colores u olores.

Proceso de purificación de agua para preparación de Kombucha

- Se recibe el agua en una cisterna como materia prima (2 a3 ppm cloro libre)
- El agua se pasa por filtro de retención de sólidos de medios granulares
- Posteriormente se pasa por un filtro de carbón activado para la retención de materia orgánica
- Luego se pasa por un sistema de osmosis inversa para eliminar químicos, cloro residual, sabores y colores del agua.
- Luego se pasa por un sistema de suavización por medio de resinas de intercambio iónico que eliminan las partículas de Calcio, Magnesio, etc.
- Luego se pasa por un ozonizador a través de un sistema de saturación hasta alcanzar una saturación de 0.1 de ozono
- Luego pasa a un tanque de almacenamiento para ser utilizada como materia prima en la elaboración de las bebidas

## **Minerales**

Los minerales intervienen en diferentes funciones en el cuerpo humano, lo que los hace necesarios para tener un estado de salud adecuado, por lo tanto, requerimos consumir diariamente diferentes tipos de minerales para evitar alguna deficiencia, derivando en problemas de salud y algunos desórdenes.

El agua varía de un lugar a otro. El agua del grifo, el agua de manantial, el agua filtrada y el agua embotellada contienen cantidades variables de minerales, productos químicos e incluso algunos conservantes. Esto hace que el agua o las bebidas tengan un sabor inconsistente y, lo que es más importante, puede causar la acumulación de calcio en su maquinaria.

Comenzar con un contenido mineral base de 0 es la clave para asegurarse de que la infusión del te sea consistente. A pesar de que el agua filtrada de grifo o botellas de agua de manantial, o agua de pozo pueden parecer "lo suficientemente buenas", pero todavía puede contener una mezcla de minerales que se desconoce.

Los TDS (Total dissolved solids) son la suma de los minerales, sales, metales, cationes o aniones disueltos en el agua. Esto incluye cualquier elemento presente en el agua que no sea (H<sub>2</sub>O) molécula de agua pura y sólidos en suspensión. (Sólidos en suspensión son partículas / sustancias que ni se disuelven ni se asientan en el agua, tales como pulpa de madera). En general, la concentración de sólidos disueltos totales es la suma de los cationes (carga positiva) y aniones (cargado negativamente) iones en el agua.

Los sólidos disueltos totales se diferencian de los sólidos suspendidos totales (SST), en que este último no puede pasar a través de un tamiz de dos micrómetros y aún están suspendidos indefinidamente en solución. El término “sólidos sedimentables” se refiere a materiales de cualquier tamaño no se mantiene suspendido o disuelto en un tanque no está sujeto a retención de movimiento, y excluye tanto TDS y SST. Sólidos sedimentables pueden incluir grandes partículas o moléculas insolubles (Carbotecnia, 2014)

## **Té Negro**

Llamamos té negro a la variedad de tés que tienen un grado de oxidación del 100%. Esto se debe a que durante el proceso de elaboración se rompen las células de las hojas, provocando una reacción química con el oxígeno del aire, dando como resultado un color negruzco o amarronado en las hebras. Dado esto, podemos identificar en una primera impresión al té negro, por el aspecto de sus hebras secas. Al beber té negro, nos encontramos con una infusión de carácter más intenso que un té blanco o un té verde. En algunas variedades podemos percibir notas ahumadas, a madera, tabaco y cacao; en otras, abundan las notas orales, de frutas rojas y de frutas pasas.

Numerosas investigaciones han demostrado que el té negro posee una amplia variedad de propiedades beneficiosas para la salud. Estas son similares entre las diferentes variedades de té ya que todas provienen de la misma planta, la *Camellia sinensis*, aunque según su origen, algunos compuestos podrían encontrarse en mayor concentración, como la cafeína. Una de las propiedades más destacadas del té negro es que contribuye a disminuir el nivel de colesterol en sangre, con lo cual lo podemos encontrar como ingrediente de numerosos compuestos en la farmacia.

## **Tipos de té negro**

Muchos países alrededor del mundo producen té negro, China, India, Sri Lanka, Kenia, Nepal, Argentina, son sólo algunos. Cuando compramos té de origen de gran calidad, muchas veces nos encontramos con que el nombre del té es el mismo que el de la región en donde se produce.

Entre los más reconocidos podemos destacar:

**Té negro Ceilán:** Este té proviene de Sri Lanka, una isla que fue colonizada por ingleses hasta el año 1948, período en el que se llamó Ceylon. De aquí el nombre de este té tan famoso.

**Té negro Yunnan:** Yunnan es una de las regiones más importante en la producción de té chino. EL Yunnan Black Gold o El Yunnan Gold Tips son algunos de los más reconocidos dentro de la categoría de té negro.

**Té negro Keemun:** El té negro Keemun es uno de los más preciados por sus notas especiadas, algo ahumadas, a frutas pasas dulces y un final algo picante. Es producido tradicionalmente en China en la región de Anhui.

Té negro Assam: Assam es una región del país indio que produce mayormente té negro y muchos son de altísima calidad.

Té negro Darjeeling: Otra de las regiones productoras de té negro por excelencia en la India es Darjeeling. Este té es conocido como “el Champagne del té negro” por su exquisita expresión aromática.

Té Lapsang Souchong: Una de las curiosidades de China es el Lapsang Souchong, un té negro ahumado, producido en la provincia de Fujian. Es un té muy particular que se consume mucho en Rusia.

## **Dióxido de Carbono**

Es el componente característico de una bebida carbonatada. Es un compuesto gaseoso a temperatura y presión estándar, inerte, incoloro, sinsabor, no es tóxico y está disponible a costos accesibles. Su molécula está formada por dos átomos de oxígeno y uno de carbono. Entre las propiedades más comunes del dióxido de carbono se puede mencionar:

- Peso molecular: 44,01
- Densidad (a TPE) 1,98 kg/m<sup>3</sup>
- Solubilidad en agua (a TPE) 1,45 g/L
- Incombustible

El dióxido de carbono, también denominado óxido de carbono, gas carbónico y anhídrido carbónico, es un gas cuyas moléculas están compuestas por dos átomos de oxígeno y uno de carbono. Su fórmula molecular es CO<sub>2</sub>. Es una molécula lineal y no polar, a pesar de tener enlaces polares. Esto se debe a que, dada la hibridación del carbono, la molécula posee una geometría lineal y simétrica. Su representación por estructura de Lewis es: O=C=O.

En la industria alimentaria, se utiliza en bebidas carbonatadas para darles efervescencia.

Como parte del ciclo del carbono, plantas, algas y cianobacterias usan la energía lumínica del Sol para foto sintetizar carbohidratos a partir del dióxido de carbono y el agua, expulsando oxígeno como desecho de la reacción. Sin embargo, las plantas no pueden hacer la fotosíntesis por la noche o en oscuridad, desprendiendo una cantidad menor de dióxido de carbono debido a la respiración celular.<sup>2 3</sup>o solo las plantas, la mayoría de los organismos en la tierra que respiran expulsan dióxido de carbono como desecho del metabolismo, incluyendo al ser humano. El dióxido de carbono es

producido también por la combustión de carbón y los hidrocarburos, y es emitido por volcanes, géiseres y fuentes volcánicas.

El dióxido de carbono se forma a partir de diversos procesos, se destacan entre ellos:

Combustión: De materiales fósiles y no fósiles, como petróleo, carbón, gas.

Fermentación: La fermentación de azúcares que realizan bacterias y levaduras por lo general conduce a la liberación de ácidos y/o alcoholes y de CO<sub>2</sub>.

Respiración: Tanto los animales superiores como las plantas respiran; en ese proceso hay toma de oxígeno y liberación de dióxido de carbono.

Reacción: La reacción de carbonatos en medio ácido.

### **Carbonatación en bebidas**

La carbonatación es una reacción química que no es más que la disolución de un gas en este caso el CO<sub>2</sub> en un líquido en este caso la Kombucha.

### **Tipos de carbonatación**

En la industria de bebidas, existen dos métodos de carbonatación principalmente tenemos a la carbonatación natural, que se da en la fase de fermentación, posterior tenemos la carbonatación forzada o artificial que consiste en inyectar de manera forzada CO<sub>2</sub>, en algunas industrias se utiliza una re-fermentación final que consiste en la extracción de CO<sub>2</sub> en la etapa de fermentación, posterior para ese CO<sub>2</sub> a una purificación y finalmente una reinyección en el proceso final.

- Carbonatación Natural
- Carbonatación forzada

### **Carbonatación natural**

La carbonatación natural de la Kombucha se consigue simplemente añadiendo azúcares fermentables en el momento del envasado y manteniendo la Kombucha a una temperatura adecuada para que las levaduras puedan emprender una nueva fermentación. Es el procedimiento típico para botellas y barriles de 5 litros, pero también es posible hacerlo con barriles grandes, como los cornelius.

### **Carbonatación forzada.**

El CO<sub>2</sub> que se ha generado durante la fermentación principal y se ha recuperado, purificado y licuado, se reincorpora a la Kombucha durante la última etapa de la fabricación. En la práctica, lo que se hace es dar una completa carbonatación con el fin de ajustar a la concentración deseada en la Kombucha final estandarizando de este

modo el producto, recalcando que en el proyecto que realizamos no estamos considerando presupuesto para elaborar una purificación del CO<sub>2</sub>, puesto que nos resulta más fácil y sobre todo económico la contratación de una empresa suministradora de CO<sub>2</sub>.

El gas que llevan las bebidas refrescantes es dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), que se incorpora disuelto en agua cuando se diluye el producto base concentrado. En el caso de la Kombucha, es una bebida carbonatada de forma natural. Existe sin embargo una forma de dotarla de contenido en CO<sub>2</sub> que tiene grandes ventajas y que los más cerveceros utilizan habitualmente. La carbonatación forzada tiene algunas ventajas comparadas con la carbonatación natural que se consigue mediante el añadido de azúcar o dextrosa en el momento de envasar en botella o en barril. Esta forma de carbonatar se realiza inyectando gas carbónico (CO<sub>2</sub>) en la Kombucha en unas condiciones de presión y de temperatura determinadas. El gas en estas condiciones de alta se disuelve en la Kombucha y es al servir la Kombucha desde barril y por lo tanto reducir bruscamente la presión, que el CO<sub>2</sub> atrapado en el líquido se vuelve a expandir creando burbujas. Es importante entender que el CO<sub>2</sub> a alta presión tiene que disolverse o mezclarse con el líquido porque una vez hayamos inyectado el gas en el barril, tendremos que moverlo o agitarlo para que el gas se mezcle completamente. La cantidad de CO<sub>2</sub> final se mide como porcentaje del volumen total.

## **Inoculación**

El cultivo de las colonias de Kombucha se lo realiza en una infusión de Té dulce, que es el sustrato nutritivo donde proliferarán estas colonias compuestas por microorganismos beneficiosos que prosperarán con nuestros cuidados y formarán lo que se conoce como zooglea o membrana de Kombucha. Una colonia simbiótica de bacterias y levaduras que vive y crece gracias al agua y los azúcares produciendo a cambio el té fermentado de Kombucha. Es muy importante esta anotación ya que lo primordial para hacer un buen fermento es la calidad y estado de la materia prima.

Tanto del Té dulce como del cultivo madre de Kombucha. Esta última prácticamente se la puede tratar como a un organismo vivo, realmente muchos asociados en simbiosis, que necesitan de nuestro cuidado para desarrollarse. Esto es, darle de comer y beber en un ambiente tranquilo limpio y oxigenado. Con un adecuado cuidado recibiremos las bondades del Té de Kombucha que no son pocas. Posteriormente se detallan y comentan los ingredientes necesarios que formarán el medio nutriente para cultivar Kombucha.

La fermentación inicia al agregar una alícuota de una solución de inoculación al medio de cultivo. Durante el cultivo el medio se vuelve turbio y se forma una película blanca en la superficie y su grosor incrementa progresivamente con el tiempo (Iguchi, Yamanaka, & Budhiono, 2000). Las bacterias aeróbicas solo producen celulosa en la proximidad a la superficie, así que la productividad depende principalmente en el área



superficial, no en el volumen del recipiente. Media vez no se agite el sistema, el gel circular esta adherido a la pared interior del recipiente y se desliza lentamente al fondo cuando su grosor aumenta (Masaoka, Ohe, & Sakota, 1993).

Tanto en el cultivo madre de Kombucha como en la bebida resultante se encuentran las colonias de microbiota benéfica. Tenemos por un lado bacterias (pertenecientes al reino animal) como por ejemplo: *Acetobacter xylinum*, *A. Xylinoides*, *gluconicum*, *Acetobacter ketogenum*, *A. pasteurianum*, *Gluconobacter gluconicum* y por otro, levaduras (pertenecientes al reino vegetal) como por ejemplo: *Pichiafermantans*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces ludwigii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *S ludwigii*, entre muchas otras.

La formulación de microorganismos puede variar dependiendo de las condiciones locales de cultivo y de los materiales empleados en la elaboración del té Kombucha y en consecuencia en la disposición de ciertos compuestos que son sintetizados específicamente por algunas de ellas.

### **Probióticos**

Probiótico, es un término que se utiliza actualmente para designar aquellos microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud del huésped. Se atribuye a Eli Metchnikoff, premio Nobel de comienzos del siglo pasado, la observación original sobre la función positiva desempeñada por algunas bacterias. En 1907, Metchnikoff afirmó que "la dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles".

Los microorganismos probióticos más estudiados y ampliamente utilizados en el desarrollo de alimentos pertenecen al género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y son componentes normales del microbiota intestinal.

Proporcionan un mejor estado de salud y bienestar y/o reducen el riesgo de enfermedad. Hay que mencionar que, para ser considerada como Probiótica, una bacteria tiene que sobrevivir el medio fuertemente ácido del estómago y colonizar el intestino delgado y grueso. De acuerdo a la Organización Mundial para la Salud (OMS) la definición de Probiótico es: "Son microorganismos vivos que cuando son suministrados en cantidades adecuadas promueven beneficios en la salud del organismo huésped".

Los efectos de los Probióticos son varios incluyendo la modificación de la flora evitando la colonización patógena, la prevención del desequilibrio de la flora intestinal, la reducción de la incidencia y duración de diarreas, el mantenimiento de la integridad de las mucosas, la modulación de la inmunidad al evitar la translocación bacteriana, la producción de vitaminas como la B2, B6 y biotina, la asimilación de oligoelementos y la actividad antitumoral.

Según literatura para garantizar la efectividad de un probiótico se considera necesario que diariamente entre  $10^9$  y  $10^{10}$  organismos viables alcancen el intestino delgado. Por esta razón se sugiere que los probióticos mantengan valores de viables entre  $10^6$ –  $10^7$  UFC/mL

### **Composición microbiológica**

Varios estudios han demostrado que el espectro microbiano del consorcio Kombucha, también llamado SCOBY u hongo del té, puede variar entre fermentaciones (Chakravorty et al., 2016; Coton et al., 2017; Reva et al., 2015). Sin embargo, hay una serie de especies que permanecen en la mayoría de las fermentaciones de Kombucha, que se describen a continuación.



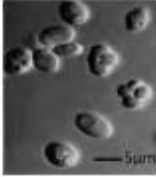

### **Levaduras**

La mayoría de las especies de levaduras pueden fermentar azúcar a etanol, sin embargo, muchos procesos modernos de fermentación alcohólica son iniciados por un solo cultivo, siendo comúnmente *Saccharomyces cerevisiae* debido a su alta eficiencia. Sin embargo, las levaduras no *Saccharomyces* se utilizan cada vez más en la industria en fermentaciones mixtas (vino, tequila, etc.) para enriquecer el perfil aromático y mejorar la complejidad y la cinética del producto final (López, Beaufort, Brandam y Taillandier). , 2014; Nehme, Mathieu y Taillandier, 2008). Las interacciones microbianas entre levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* parecen ser una opción ventajosa en el procesamiento de fermentación mixta, teniendo varios beneficios como evitar los riesgos de paradas de fermentación, la adición de aromas y sabores, permite la modificación de parámetros no deseados, entre otros (Sun, Gong , Jiang y Zhao, 2014). Y en este sentido, la interacción de las levaduras de Kombucha ha demostrado ser un consorcio que genera características finales deseables.

Hay muchos géneros y especies de levaduras en el cultivo de Kombucha, se ha informado un amplio espectro que incluye especies de *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Kloeckera/Hanseniaspora*, *Torulaspora*, *Pichia*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Saccharomyces*, *Lachancea*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces* y *Kluyveromyces* (Chakravorty et al..., 2016; Coton et al., 2017; Marsh et al., 2014). A pesar de su variabilidad, algunas de las especies predominantes se presentan en la Tabla 2.

## Algunas levaduras presentes en el cultivo de Kombucha

**Table 2—Some yeasts species present in Kombucha culture.**

Species	Morphology	Characteristics
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• High fermentative power</li> <li>• Ability to convert malic acid to ethanol</li> <li>• Release of high quantities of polysaccharides (Domizio, Liu, Bisson L, &amp; Barile, 2017)</li> </ul>
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• High resistance to osmotic and ethanol stress</li> <li>• Higher efficiency to utilize the available N sources than <i>Saccharomyces cerevisiae</i></li> <li>• Tendency to ferment sugars to ethanol, and produce high concentrations of acetic acid in aerobic conditions (Steensels et al., 2015)</li> </ul>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• High ethanol tolerance</li> <li>• Rapid fermentation rates</li> <li>• Insensitivity to temperature and substrate concentration (Choonut, Saejong, &amp; Sangkharak, 2014)</li> </ul>
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Highly osmo- and halo-tolerant</li> <li>• Counteract better sugar and salt stress than <i>S. cerevisiae</i> (Dakal et al., 2014)</li> </ul>

Only images from Pitt and Hocking (2009) with modifications.

## **Bacterias**

Las bacterias dominantes del cultivo del té de Kombucha son las bacterias que producen ácido acético, que son bacterias aeróbicas capaces de utilizar el alcohol como sustrato para formar ácido acético. Estas bacterias, a diferencia de la levadura, requieren grandes cantidades de oxígeno para su crecimiento y actividad. El proceso metabólico se basa en la conversión de acetaldehído en etanol y el hidrato de acetaldehído en ácido acético por la enzima acetaldehído deshidrogenasa (Jayabalan et al., 2007). Varias bacterias acetobacter están presentes en la celulosa del té, incluidos: *Acetobacter xylinoides*, *Bacterium gluconicum*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* y *Gluconobacter oxydans* (Jayabalan, Malbařsa, Lonćar, Vitas y Sathishkumar, 2014). Marsh et al. (2014) Trabajó con análisis de secuencias de ARNr y encontró entre un 86 % y un 99 % de abundancia relativa de gluconacetobacter a lo largo de toda la fermentación, tanto en el medio líquido como en la biopelícula.

## **Producción de celulosa**

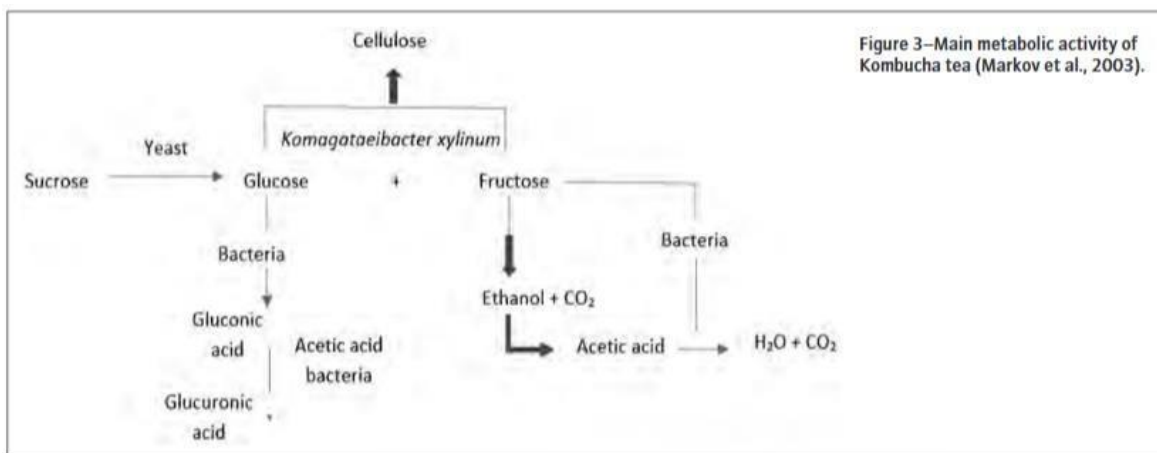
Existen varios tipos de bacterias que pueden producir celulosa microbiana, tales como: *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Salmonella* y *Gluconacetobacter* (Mohite & Patil, 2014). Dentro del género *Acetobacter*, la especie dominante es *Acetobacter xylinum*, la cual fue reclasificada como *Gluconacetobacter xylinus* y más recientemente a *Komagataeibacter xylinus* (Yamada et al., 2012). Una actividad bioquímica específica de esta bacteria es la oxidación de la glucosa a ácido glucónico, que se encuentra en la fase líquida, luego otro metabolismo específico conduce a la síntesis de celulosa microbiana formando el biofilm que descansa en la superficie.

En el primer estado, las bacterias productoras de celulosa aumentan su población a través del consumo del oxígeno disuelto. Durante este tiempo, el microorganismo sintetiza cierta cantidad de celulosa en el medio líquido y solo las bacterias que se encuentran en la interfase aire/medio pueden mantener su actividad y producir celulosa, que está formada por capas superpuestas. A medida que avanza el tiempo de fermentación, el espesor de la membrana se incrementa por la generación de nuevas capas en la superficie, formando una estructura suspendida en el medio de cultivo. El desarrollo de la biopelícula junto con el hidrógeno y los enlaces C-H continuará durante toda la fermentación, su síntesis alcanzará su límite cuando crezca hacia abajo atrapando a todas las bacterias, que luego se volverán inactivas debido al suministro insuficiente de oxígeno (Esa, Tasirin, & Rahman, 2014). Las bacterias que quedan en la fase líquida del medio de cultivo se encuentran en estado latente y pueden ser reactivadas y utilizadas como inóculo en una fermentación posterior (Ruka, Simon, & Dean, 2012). Esta biopelícula posee alta cristalinidad, alta resistencia a la tracción, extrema insolubilidad en la mayoría de los solventes, maleabilidad, alto grado de polimerización, es 100 veces más delgada que la de las fibrillas de celulosa obtenidas de las plantas y su capacidad de retención de agua es más de 100 veces mayor (Chawla, Bajaj, Survase y Singhal, 2009)

## Interacciones entre microorganismos

La complejidad de comprender la cinética de fermentación de Kombucha se debe principalmente al importante número de microorganismos presentes y las interacciones entre ellos (Markov, Jerinic, Cvetković, Loncar, & Malbasa, 2003), que se considera que tienen efectos inhibitorios sobre la producción de etanol. Sin embargo, la muerte y autólisis de las células de levadura libera también vitaminas y otros nutrientes que estimulan el crecimiento de bacterias importantes. La mayoría de las especies microbianas excretan productos metabólicos que pueden estimular o inhibir la tasa de crecimiento específica de las otras especies, estableciendo interacciones comensalísticas o amensalísticas que deben ser ampliamente analizadas para lograr la comprensión de este fenómeno de coexistencia. Algunos grupos de bacterias como LAB y AAB, así como especies de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, tienen funciones bien establecidas en la fermentación. Sin embargo, hasta el día de hoy, existen muchas otras especies cuyas funciones no han sido ampliamente caracterizadas, ni las interacciones entre ellas.

En el caso de la Kombucha, las diferentes especies de levaduras y bacterias actúan en paralelo produciendo dos productos finales diferentes: el té fermentado y el biofilm. Al inicio de la fermentación, las levaduras hidrolizan la sacarosa en glucosa y fructosa, antes se produce el etanol y finalmente AAB transforma el etanol en ácido acético, no obstante, también es destacable la producción de ácidos glucónico y glucurónico (Figura 3).



## Tiempo

La fermentación del té de Kombucha normalmente oscila entre 7 y 60 días y las actividades biológicas pueden aumentar durante este proceso; sin embargo, los mejores resultados se han obtenido en un promedio de 15 días (Chu & Chen, 2006).

Aunque la mayor parte de las actividades antioxidantes que se han obtenido han aumentado con el tiempo de incubación, no se recomienda una fermentación prolongada debido a la acumulación de ácidos orgánicos, que podrían alcanzar niveles nocivos para el consumo directo. Además, el CO<sub>2</sub> generado puede comenzar a acumularse en la interfase entre la biopelícula y el caldo y puede bloquear la transferencia de nutrientes creando un ambiente hambriento (Chu & Chen, 2006). La selección de la duración del período de fermentación también depende de los atributos sensoriales esperados. Reiss (1994) informó que dentro de los 6 a 10 días de fermentación se obtuvo una bebida refrescante similar a la fruta, contrario al sabor a vinagre que se obtiene con un período prolongado. De acuerdo con el Código alimentario modelo de la Administración de Alimentos y Medicamentos para la elaboración de Kombucha (Nummer, 2013), no se recomiendan más de 10 días de fermentación si se produce para el consumo humano.

### **Temperatura**

Mantener la temperatura óptima a lo largo de la fermentación da como resultado un mejor crecimiento microbiano y actividad enzimática, por lo tanto, se mejoran los beneficios de la fermentación. Además, la actividad antioxidante de los alimentos de origen vegetal puede verse influenciada por las variaciones de temperatura, por ejemplo, la producción de compuestos fenólicos (Hur et al., 2014). Generalmente, los valores de temperatura de fermentación de Kombucha oscilan entre 22°C y 30°C.

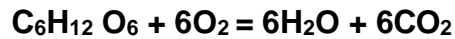
### **PH**

El pH es uno de los parámetros ambientales más importantes que afectan la fermentación de Kombucha, debido a que algunos de los ácidos formados como el acético y el glucónico, podrían ser responsables de las actividades biológicas de las bebidas resultantes. También está estrechamente relacionado con el crecimiento microbiano y los cambios estructurales de los compuestos fitoquímicos que pueden influir en la actividad antioxidante (Hur et al., 2014). Sin embargo, el valor de pH más bajo aceptable no debe descender por debajo de 3, que es el del tracto digestivo (Lončar et al., 2006). Asimismo, de acuerdo con Saponjac y Vulić (2014), para obtener una bebida ácida agradable, se debe terminar la fermentación cuando la acidez total alcanza el valor óptimo de 4 a 5 g/L. Sin embargo, el período de tiempo para obtener este valor puede diferir según el origen del medio de cultivo y las condiciones de fermentación.

### **Oxígeno**

El oxígeno es otro de los ingredientes necesarios para la correcta elaboración del té de Kombucha y obtener un cultivo sano y vigoroso. El oxígeno para la respiración de las colonias de Kombucha es tomado del aire circundante y del medio líquido de intercambio por lo que un té bien oxigenado es una buena manera de empezar la fermentación. Para obtener un aporte suplementario de oxígeno en la infusión esta se agita fuertemente con unas varillas de bambú, un par de palillos chinos u otro utensilio higiénico de madera o en su defecto de plástico adecuado para alimentación. Dado que el cultivo tomará superficialmente el oxígeno del aire circundante se hace necesario que el lugar donde reposa el recipiente de cultivo este suficientemente aireado y libre de contaminantes

La mayoría de los procesos de fermentación son aeróbicos y, por lo tanto, requieren la provisión de oxígeno. Si se considera la estequiometría de la respiración, entonces la oxidación de la glucosa puede representarse como:



donde se requieren 192 g de oxígeno para la oxidación completa de 180 g de glucosa. Sin embargo, ambos componentes deben estar en solución antes de estar disponibles para un microorganismo y el oxígeno es aproximadamente 6000 veces menos soluble en agua que la glucosa, por lo que no es posible proporcionar a un cultivo microbiano la cantidad de oxígeno necesaria para completar la oxidación. De la glucosa o cualquier otra fuente de carbono, en una sola adición. Al comienzo del proceso, las levaduras Kombucha proporcionan cantidades significativas de etanol y monosacáridos necesarios para Bacterias Acetobacter. La oxidación de etanol en ácido acético requiere un mol de oxígeno (32 g) para oxidar completamente 1 mol de etanol (46 g), por lo tanto, la actividad de los Acetobacter como organismos aerobios estrictos depende de la transferencia de oxígeno del aire a la fermentación (Caldo). Por esa razón, un cultivo microbiano debe recibir oxígeno durante el crecimiento a una velocidad suficiente para satisfacer la demanda de los organismos (Stanbury et al., 2013). Por ser una bebida de estudio y evolución inconstante, la Kombucha ha sido estudiada principalmente a escala de laboratorio, desde 200 mL hasta 2 L. Sin embargo, pocos investigadores han estudiado su fermentación en volúmenes mayores.

### **Vinagre de Kombucha**

El vinagre es un líquido miscible, con sabor agrio, proveniente de la fermentación acética del vino (Reyes 2015). El proceso para la obtención de vinagre consiste en una oxidación biológica, en la que el sustrato con bajo contenido de etanol se oxida parcialmente por medio de bacterias de ácido acético para producir ácido acético y agua. El vinagre de Kombucha no es más que Kombucha fermentada un largo tiempo (de 4 a 10 semanas) y se puede usar igual que usarías el vinagre de alcohol o de manzana; para cocinar o para limpiar. Naturalmente el vinagre de Kombucha tiene una menor proporción de ácido acético (2%) que los demás vinagres (4%-7%) lo que lo hace mucho más amigable para su consumo.

Según Rubio, 2007; hay gente que debido a su estado precario de salud no le interesa tomar azúcares ni gas carbónico. En este caso la manera es modificar el té hasta que se haga vinagre. Además de esta manera si se toma el té con su ciclo completo de modificación a temperatura media de 20 a 25°C durante 15 días, los compuestos beneficiosos sintetizados por el cultivo estarán en buenas proporciones. Una adecuada forma de empezar a habituarse a tomarlo es en los usos cotidianos del vinagre y con el tiempo empezar a tomarlo diluido en agua. Si el té fermentado se deja con una madre de "Kombucha" durante mucho tiempo (1 a 3 meses) se produce un vinagre muy bueno similar al de manzana. Con la "Kombucha" y zumo natural de manzana o de uva se prepara un vinagre exquisito para el uso habitual del vinagre común. La madre de "Kombucha" usada para este fin, no debería volver a reutilizarse para el cultivo habitual de "Kombucha", ya que la formulación de microorganismos puede variar bastante.

Para la elaboración del vinagre de Kombucha se aplicó el mismo principio de la preparación del té Kombucha con la diferencia de que se aumentó el tiempo de fermentación, con un consorcio de bacterias y levadura las cuales dieron como resultado la producción de vinagre, el cual se almacena a temperatura ambiente desde su fermentación que fue de 4 semanas. La diferencia entre el vinagre de Kombucha y la bebida de Kombucha es que el tiempo de fermentación se prolonga para que todo el azúcar y el alcohol que aún queda en la bebida siga siendo transformado en ácidos orgánicos.

### **Concentrados y saborizantes**

Jugo (zumo) concentrado de fruta: Es el producto obtenido a partir de jugo de fruta al que se le ha eliminado físicamente una parte del agua en una cantidad suficiente para elevar los sólidos solubles (° Brix) en, al menos, un 50% más que el valor Brix establecido para el jugo de la fruta.

Requisitos específicos para los jugos y pulpas concentradas

- El jugo concentrado puede ser turbio, claro o clarificado y debe tener las características sensoriales propias de la fruta de la cual procede.
- La pulpa concentrada debe tener las características sensoriales propias de la fruta de la cual procede.
- El jugo y pulpa concentrado, con azúcar o no, debe estar exento de olores o sabores extraños objetables.
- El contenido de sólidos solubles (°Brix a 20 °C con exclusión de azúcar) en el jugo concentrado será por lo menos, un 50% más que el contenido de sólidos solubles en el jugo original

Sin sabores añadidos, la Kombucha simple de la primera fermentación tiene un sabor agrio y ligeramente dulce, como una sidra de manzana espumosa agria o ginger ale.

Si bien la Kombucha se puede disfrutar en esta etapa, siempre la llevamos a través de una segunda fermentación para agregar sabor y carbonatación.



**Saborizantes:**

Provee del sabor característico de cada bebida, por lo que estos varían ampliamente en cada bebida. Estos pueden ser dulces, ácidos, aromáticos, entre otros. Se clasifican en artificiales y naturales. Entre los saborizantes naturales están las especias, extractos naturales, aceites, frutas o yerbas. Los saborizantes artificiales se utilizan debido a la mayor variedad de sabores y a su mayor disponibilidad en el mercado.

Este es el elemento clave en las bebidas gaseosas, que da el sabor característico a cada una de las variedades presentes en el mercado. Los saborizantes se preparan por empresas especializadas. Con cada sustancia se suministran instrucciones claras y la forma exacta para la preparación del jarabe. Los saborizantes pueden ser naturales (especias, extractos naturales, aceites, frutas o yerbas), idénticos a los artificiales. Estos últimos han sido desarrollados para satisfacer la mayor cantidad de gustos de consumidores. Además de los saborizantes se usan otras sustancias para

mejorar el sabor y el aroma del refresco. Por ejemplo, a los refrescos estilo “cola” se les pone cafeína en proporción de 7 a 23 mg por 100 cc. Se agrega la cafeína no tanto por el efecto estimulante cuanto por su sabor amargo.

## **Materiales y métodos**

### **Recursos:**

Agua Filtrada  
Te negro  
Azúcar  
Cultivo iniciador (Starter)  
Pulpa de arándano  
Vinagre de Kombucha  
Concentrado de arándano  
Suplemento de Minerales

### **Equipos e instrumentos:**

1 Estufa Marca Mabe de 4 hornillas  
1 Olla Marca Winco de Acero inoxidable de 20 litros de capacidad  
Balanza Digital Marca Winco Modelo SCAL-D22, plataforma 6x6, 22 libras de capacidad  
Cornelius Keg (Barril de acero inoxidable) 130 psi, 214mm diámetro x 629 mm alto, 19 litros de capacidad  
Cilindro de CO<sub>2</sub> de 20 libras  
Regulador de Keg Marca HGKEKE  
1 manómetro de presión de 0-3000 PSI  
1 manómetro de presión de 0-60 PSI  
Válvula de conexión de entrada de gas  
Válvula de conexión de salida de gas  
Válvula anti retorno de gas para cabezal ball-lock  
5 pies de manguera de pvc de 5/16" 250 PSI  
5 pies de manguera de 1/4" 250 PSI  
Termómetro digital marca Taylor, rango de temperatura -40°C /230°C  
Potenciómetro (pHmetro) 0-14.00 Marca HANNA Instruments Modelo HI98107  
Refractómetro de Brix, Marca LEERCHUANG, 0-90%  
Sifón  
Tapadora de botellas manual marca Capper  
Varilla llenadora de botellas de acero inoxidable Marca Ubrew usa de 3/8" x 14"  
1 manguera de 6.5 pies x 3/8" grado alimenticio

### **Materiales:**

1 Probetas de 1000 ml  
2 Beakers de 100 ml  
Fracos de vidrio de 500 ml  
Embudo plástico de 114 ml

Botellas de vidrio de 12 onzas

### **Desarrollo experimental**

El desarrollo experimental se dividió en dos etapas, en la primera se realizó la preparación del líquido iniciador (starter) para la preparación de la bebida Kombucha.

En la segunda etapa se realizó la preparación de la bebida Kombucha, utilizando 3 diferentes tipos de té.

### **Líquido iniciador**

**Tiempo de incubación: 15 días**

**Temperatura promedio: 25°C**

Para la preparación del líquido iniciador para la producción de la bebida se desarrolló la siguiente metodología.

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>	<b>unidad de medida</b>	<b>%</b>	<b>observaciones</b>
Te Negro	16	gramos	0.8	10 gramos por cada litro
Agua caliente	1600	ml	80.0	85 G. Celsius
Azúcar	134	gramos	6.7	60 g/lt
Líquido Iniciador (starter)	250	ml	12.5	pH entre 2.85 y 3.15
	2000		100.0	

### **Procedimiento:**

- En una olla de acero inoxidable mezclar el azúcar con el agua y llevar a calentar hasta que alcance 85°C
- Agregar el Té negro y dejar infusionar por 10 minutos
- Luego colar y pasar a un recipiente de vidrio y dejar que baje la temperatura hasta llegar a una temperatura menor de 28°C
- Añadir el líquido iniciador
- Cubrir con un lienzo el envase, sostenerlo con ligas y dejar fermentar a temperatura ambiente en un lugar donde no haya mucha luz.
- Fermentar durante 15 días

- Finalizada la fermentación hacer un análisis de pH y de Concentración de solidos solubles (el rango de pH debe ser 2.8 a 3.2 y el rango de °Brix debe estar entre 6-8°Brix)

Si los rangos son los adecuados, entonces está lista para usarse como liquido iniciador para la fermentación de la bebida.

## Preparación y fermentación de Bebida Kombucha

### Formulación Muestra A

Ingredientes	Cantidad	unidad de medida	%	observaciones
Té Verde	120	gramos	0.6	10 gramos por cada litro
Agua caliente	12000	ml	63.2	85 G. Celsius
Azúcar	1400	gramos	7.4	60 g/lit
Líquido Iniciador (starter)	1500	ml	7.9	pH entre 2.85 y 3.15
pulpa de arándano	1500	ml	7.9	
Suplemento mineral (Sulfato de magnesio, citrato de sodio, cloruro de sodio)	18	gramos	0.1	
Agua fría Filtrada	1712	ml	9.0	
Vinagre de Kombucha	560	ml	2.9	3% del volumen total
Concentrado de arándano	190	ml	1.0	
	19000		100.0	

## Formulación Muestra B

Ingredientes	Cantidad	unidad de medida	%	observaciones
Te Negro	120	gramos	0.6	10 gramos por cada litro
Agua caliente	12000	ml	63.2	85 G. Celsius
Azúcar	1400	gramos	7.4	60 g/lit
Líquido Iniciador (starter)	1500	ml	7.9	pH entre 2.85 y 3.15
pulpa de arándano	1500	ml	7.9	
Suplemento mineral (Sulfato de magnesio, citrato de sodio, cloruro de sodio)	18	gramos	0.1	
Agua fría Filtrada	1712	ml	9.0	
Vinagre de Kombucha	560	ml	2.9	3% del volumen total
Concentrado de arándano	190	ml	1.0	
	19000		100.0	

## Formulación Muestra C

Ingredientes	Cantidad	unidad de medida	%	observaciones
Mezcla 50% Té Negro 50 % Té Verde	120	gramos	0.6	10 gramos por cada litro
Agua caliente	12000	ml	63.2	85 G. Celsius
Azúcar	1400	gramos	7.4	60 g/lit
Líquido Iniciador (starter)	1500	ml	7.9	pH entre 2.85 y 3.15
pulpa de arándano	1500	ml	7.9	
Suplemento mineral (Sulfato de magnesio, citrato de sodio, cloruro de sodio)	18	gramos	0.1	
Agua fría Filtrada	1712	ml	9.0	
Vinagre de Kombucha	560	ml	2.9	3% del volumen total
Concentrado de arándano	190	ml	1.0	
	19000		100.0	

## **Procedimiento de preparación de bebida Kombucha:**

### **Fase 1 Infusión**

Primero se calentó en una olla de acero inoxidable de capacidad de 20 litros, el agua filtrada hasta alcanzar 85°C.

Luego se agregó el té (10g/L) en un atado de tela muselina y el suplemento mineral (18 gramos) y se mantuvo a la misma temperatura de 85°C por un periodo de 10 minutos. Luego de este tiempo se retiró el té y se añadió el azúcar siempre manteniendo la temperatura de 85°C, al añadir el azúcar la temperatura bajó a aproximadamente 65°C, se continuó calentando hasta llegar nuevamente a los 85°C y se mantuvo a esa temperatura durante 10 minutos más y luego se apartó para enfriar.

### **Fase 2 Fermentación**

Cuando la infusión alcanza la temperatura ambiente, se colocó en un fermentador y se inoculó 1500 ml de líquido iniciador; se incubó a temperatura ambiente (25°C aproximadamente), en un ambiente oscuro por 15 días.

### **Fase 3 Adición de agua y vinagre**

Al momento de culminar la fermentación se le retiró la película de celulosa que cubre el líquido que se formó durante la fermentación, y se añadió al líquido el agua fría purificada restante (1.72 LT) y vinagre de Kombucha (560 ml).

### **Fase 4 Filtrado**

El siguiente paso es llevar el líquido por un proceso de filtración de 3 etapas:

Primero se pasa el líquido por medio de una bomba de recirculación de 12 V. con conexiones de mangueras de 1/4", hacia un filtro de sedimentos de 20 µm, luego el siguiente filtro de 5 µm y luego el siguiente de 0.8 µm, luego se recircula para desplazar el líquido filtrado hacia el barril de carbonatación.

### **Fase 5 Saborizado**

Se procedió a saborizar agregando pulpa de arándano previamente esterilizada (1500 ml), vinagre de Kombucha (560 ml) y Concentrado de arándano (190 ml).

### **Fase 5 Carbonatación**

Posteriormente luego de que se procedió a trasvasar a un barril Cornelius Keg de 19 litros de capacidad, se enfría en un refrigerador hasta llegar a 4°C, una vez frío, se saca del congelador y se procede a carbonatar conectando el cilindro de CO<sub>2</sub> al regulador y del regulador al barril con una presión de salida de 2.5 Bar, esto se mide por medio de la tabla de volúmenes de Carbonatación de CO<sub>2</sub>. Al momento de que ingresa el CO<sub>2</sub> al

barril de carbonatación se procede a purgar gas por medio de la válvula de escape que tiene incorporado el barril de carbonatación.

Luego se acuesta el barril y se agita hacia atrás y hacia adelante, para incorporar de una manera más rápida el CO<sub>2</sub> en la bebida. Esto se hace durante aproximadamente 3 minutos sin parar. Se vuelve a poner el barril verticalmente en su lugar y esperamos a que el manómetro de presión se nivele a 2.5 Bar (36 Psi) nuevamente y ya luego se desconecta la manguera del barril de carbonatación.

Posteriormente se procede a guardar el barril de nuevo en el refrigerador durante 12 horas. Para asegurarnos de que la carbonatación fue adecuada, se conecta el manómetro al barril para medir su presión en bares y tiene que dar 0.82 bares (11.9 Psi), según la tabla de volúmenes agitando un poco el barril previamente.

Tabla de Volúmenes de CO<sub>2</sub>

		Temperatura °C															
		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
Carbonatación Volúmenes CO <sub>2</sub>	1.5			0.08	0.16	0.25	0.34	0.43	0.53	0.62	0.72	0.82	0.92	1.03	1.13	1.24	1.35
	1.6		0.06	0.15	0.24	0.34	0.43	0.52	0.62	0.72	0.82	0.93	1.04	1.14	1.26	1.37	1.48
	1.7	0.04	0.13	0.22	0.32	0.42	0.51	0.61	0.72	0.82	0.92	1.04	1.15	1.26	1.38	1.49	1.61
	1.8	0.11	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.71	0.81	0.92	1.03	1.15	1.26	1.38	1.50	1.62	1.74
	1.9	0.17	0.27	0.37	0.48	0.58	0.69	0.80	0.91	1.02	1.14	1.26	1.38	1.50	1.62	1.75	1.87
	2.0	0.24	0.34	0.45	0.56	0.66	0.78	0.89	1.01	1.12	1.24	1.36	1.49	1.61	1.74	1.87	2.00
	2.1	0.31	0.41	0.52	0.63	0.75	0.86	0.98	1.10	1.22	1.35	1.47	1.60	1.73	1.86	2.00	2.13
	2.2	0.37	0.48	0.60	0.71	0.83	0.95	1.07	1.20	1.32	1.45	1.58	1.71	1.85	1.99	2.12	2.26
	2.3	0.44	0.55	0.67	0.79	0.91	1.04	1.16	1.29	1.42	1.56	1.69	1.83	1.97	2.11	2.25	2.39
	2.4	0.50	0.62	0.74	0.87	1.00	1.12	1.25	1.39	1.52	1.66	1.80	1.94	2.08	2.23	2.38	2.52
	2.5	0.57	0.69	0.82	0.95	1.08	1.21	1.35	1.48	1.62	1.76	1.91	2.05	2.20	2.35	2.50	2.65
	2.6	0.63	0.76	0.89	1.02	1.16	1.30	1.44	1.58	1.72	1.87	2.01	2.16	2.32	2.47	2.63	2.78
	2.7	0.70	0.83	0.97	1.10	1.24	1.38	1.53	1.67	1.82	1.97	2.12	2.28	2.43	2.59	2.75	2.91
	2.8	0.76	0.90	1.04	1.18	1.32	1.47	1.62	1.77	1.92	2.07	2.23	2.39	2.55	2.71	2.88	3.04
	2.9	0.83	0.97	1.11	1.26	1.41	1.56	1.71	1.86	2.02	2.18	2.34	2.50	2.67	2.83	3.00	3.17
	3.0	0.89	1.04	1.19	1.34	1.49	1.64	1.80	1.96	2.12	2.28	2.45	2.61	2.78	2.95	3.13	3.30

Presiones en bares

### Fase 6 embotellado

Primero se desinfecta el área donde se va a embotellar con una solución de ácido peracético

Se conecta la manguera de línea de salida del barril de carbonatación a la varilla de llenado de acero inoxidable previamente lavada y desinfectada

Se regula la presión de salida del barril de 2 a 4 Psi (0.12 a 0.22 bar)

Se abre la válvula de salida del barril y purgar en un recipiente hasta que no salga espuma y quede más transparente.

Se inserta la varilla de llenado en una botella limpia y desinfectada, se presiona hacia abajo contra el fondo de la botella la varilla y se va llenando poco a poco hasta que alcance el nivel de 12 oz/fl.

Una vez llena la botella se retira lentamente la varilla de llenado y procede a tapar con la tapadora de botellas, así una por una se realiza el mismo procedimiento para todas las botellas a llenar.

Al reducir la presión del gas que ingresa al barril, permite que la Kombucha fluya sin que se forme espuma en la botella ni pierda carbonatación. A medida que la botella se llena de abajo hacia arriba, el CO<sub>2</sub> en la bebida debería, en teoría, expulsar el oxígeno que ya está en la botella, y al tapar con espuma, puede estar seguro de que está atrapando solo CO<sub>2</sub> dentro de la botella con la botella.

### **Metodología de fermentación de la Kombucha**

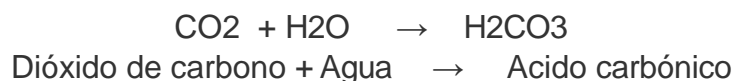
El tiempo necesario para obtener una buena bebida de Kombucha es de aproximadamente 10 a 15 días a una temperatura de alrededor 23°C, durante el cual la bebida se tornará bastante ácida. Esta acidez es la que hace que la bebida sea una fuente saludable eficaz dado que en este tiempo de fermentación se han formado bien los ácidos orgánicos terapéuticos específicos que caracterizan a la bebida de Kombucha.

El cultivo de Kombucha se puede describir como una pequeña industria química que mientras se desarrolla la fermentación, produce una pequeña cantidad de alcohol, dióxido de carbono, vitaminas del grupo B y vitamina C, así como varios ácidos orgánicos que son importantes para el metabolismo humano. (Gunter Frank W. 2005)

La llamada inversión de los disacáridos (azúcares compuestos como por ejemplo caña de azúcar) en monosacáridos (azúcares simples como por ejemplo glucosa, fructosa, galactosa) precede a los procesos de formación de ácidos. Esta división la causan las enzimas y los ácidos. El proceso de fermentación comienza con la conversión de levaduras en alcohol. Este proceso queda representado en la fórmula química siguiente:



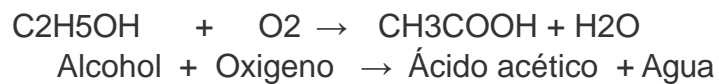
El dióxido de carbono reacciona con la humedad en el té para formar el ácido carbónico:





Al mismo tiempo, las bacterias acéticas construyen su formación mucilaginosa alrededor del cultivo de Kombucha. Convierten el azúcar en celulosa y hacen que la membrana que cubre el cultivo de Kombucha crezca gradualmente: Mientras tanto fermentan el alcohol producido por las levaduras transformándolo en ácido acético y otros ácidos orgánicos

Es un proceso de oxidación que se representa de la siguiente manera:



La acidificación del té endulzado está causada por lo tanto por la actividad metabólica de los microorganismos del cultivo Kombucha. (Gunter Frank W. 2005)

### **Tiempo de Fermentación**

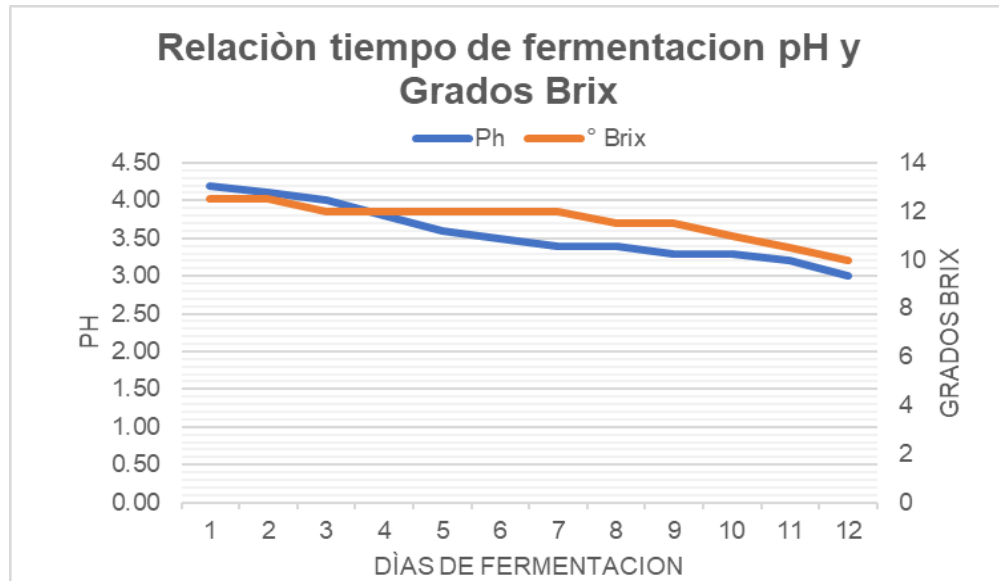
Se realizó una evaluación del tiempo de evaluación y la relación del pH y la concentración de sólidos solubles en un rango de tiempo de 12 días de fermentación.

Se evaluó diariamente el pH con un potenciómetro (pHmetro) 0-14.00 Marca HANNA Instruments Modelo HI98107, y la concentración de sólidos solubles en con un Refractómetro de Brix, Marca LEERCHUANG, 0-90%.

Los resultados se pueden observar en la siguiente Tabla:

<b>Tabla de tiempo de fermentación de Kombucha</b>			
<b>Días de Fermentación</b>	<b>Ph</b>	<b>° Brix</b>	<b>Temperatura °C</b>
1	4.20	12.5	26.50
2	4.10	12.5	25.30
3	4.00	12	25.10
4	3.80	12	25.00
5	3.60	12	25.10
6	3.50	12	24.30
7	3.40	12	24.80
8	3.40	11.5	25.30
9	3.30	11.5	26.00
10	3.30	11	26.30
11	3.20	10.5	25.80
12	3.01	10	25.10
14	3.00	10	25
15	3.00	10	24.9

Podemos observar en la siguiente grafica la tendencia hacia bajar de los grados Brix y del pH al aumentar los días de fermentación:



La disminución en los valores de pH en el medio de cultivo es un indicador de la actividad de los cultivos microbianos de Kombucha sobre los sustratos durante el proceso de fermentación.

### Metodología de carbonatación

La carbonatación es el proceso de absorción de CO<sub>2</sub> por el agua. Esta es una operación de transferencia de masa y se realiza al poner en contacto estas dos fases a una presión alta y baja temperatura. Esto se debe a la relación de solubilidad de gases en líquidos.

En el desarrollo experimental de este proyecto, se tuvo la oportunidad de realizar una carbonatación forzada, por medio de un cilindro de CO<sub>2</sub> de 20 libras el cual se inyecta a un barril de acero inoxidable de carbonatación (Cornelius Keg) de 19 litros de capacidad. Existen básicamente 3 métodos de carbonatación forzada:

- Carbonatación en tanque y reposo
- Carbonatación en tanque y agitación del líquido
- Carbonatación en tanque con piedra difusora

De los 3 métodos se escogió el método de carbonatación en tanque y agitación del líquido por ser el método más rápido y más económico que el de la piedra difusora. El método consiste en ajustar el sistema a la presión de balanceo y agitar el barril en posición horizontal e incrementar la superficie de contacto. Se realizó por medio de una manguera especial para gases de CO<sub>2</sub> conectada permanentemente, acoplada a una válvula anti retorno para que el líquido no se regrese por la manguera. El promedio de tiempo de agitación del barril es de aproximadamente

### Condiciones de la carbonatación en la bebida Kombucha

Densidad del CO<sub>2</sub> =  $\rho$  1.977 kg/m<sup>3</sup>

T= 4°C

P= 0.82 bar

Volumen de CO<sub>2</sub> = 2.5

Volumen de CO<sub>2</sub> en 19 Litros de Kombucha:

Cálculos:

$$V_{CO_2} = 2.5 * 19 = 47.5 \text{ litros} = 0.0475 \text{ m}^3$$

$$m_{CO_2} = \rho_{CO_2} * V_{CO_2}$$

$$m_{CO_2} = \rho \ 1.977 \text{ kg/m}^3 * 0.0475 \text{ m}^3 = 0.094 \text{ kg}$$

$$m_{CO_2/lts} = 0.094 \text{ kg} / 19 \text{ lts.} = 0.005 \text{ kg} = 5 \text{ gr/lts}$$

% de CO<sub>2</sub> en la Kombucha = 2.5% en volumen

$$m_{Kombucha} = \rho_{densidad} * V_{Kombucha}$$

$$m_{Kombucha} = 820 \text{ kg/m}^3 * 0.019 \text{ m}^3 = 15.58 \text{ kg}$$

$$m_{Kombucha \text{ carbonatada}} = 15.58 \text{ kg} + 0.094 \text{ kg} = 15.67 \text{ kg}$$

$$V \text{ total de la Kombucha} + CO_2 = 15.67 \text{ kg} / 820 \text{ kg/m}^3 = 0.019 \text{ m}^3 = 19.11 \text{ litros}$$

Con estos resultados podemos verificar que nuestra carbonatación fue adecuada al lograr obtener 5gr/lit de CO<sub>2</sub> en la bebida.

A la hora de medir de alguna manera la cantidad de CO<sub>2</sub> que hay en una bebida, hablamos de “volúmenes de CO<sub>2</sub> “. La teoría nos dice que 1 volumen de CO<sub>2</sub> se define como el mismo volumen de gas disuelto en la misma cantidad de líquido. Por ejemplo, en la producción de cerveza, se hablaría de que 1 volumen de CO<sub>2</sub> sería 1 litro de CO<sub>2</sub> disuelto en 1 litro de cerveza. La mayoría de las cervezas se mueven en un rango de carbonatación de entre 2 y 3 volúmenes.

Una definición más técnica tiene en cuenta la temperatura: un volumen es el espacio que el CO<sub>2</sub> ocuparía a una temperatura de 0 °C y a una presión atmosférica. Si 25 litros de cerveza tuvieran dentro 3 volúmenes de CO<sub>2</sub>, querría decir que el CO<sub>2</sub>, por sí mismo y en su estado gaseoso a 0 °C, ocuparía 3 veces el volumen de la cerveza.

No todas las bebidas tienen el mismo nivel de carbonatación. Hay siete niveles de carbonatación y siete niveles de cuerpo de las bebidas clasificado según la siguiente tabla de abajo:

	CARBONATACIÓN	CUERPO
7	Muy alta	Muy pleno
6	Alta	Pleno
5	Media-alta	Medio-pleno
4	Media	Medio
3	Media-baja	Medio-bajo
2	Baja	Bajo
1	Muy baja	Muy bajo
0	Sin carbonatación	Agua

Esta tabla normalmente es utilizada para cervezas principalmente, pero también para cualquier bebida carbonatada.

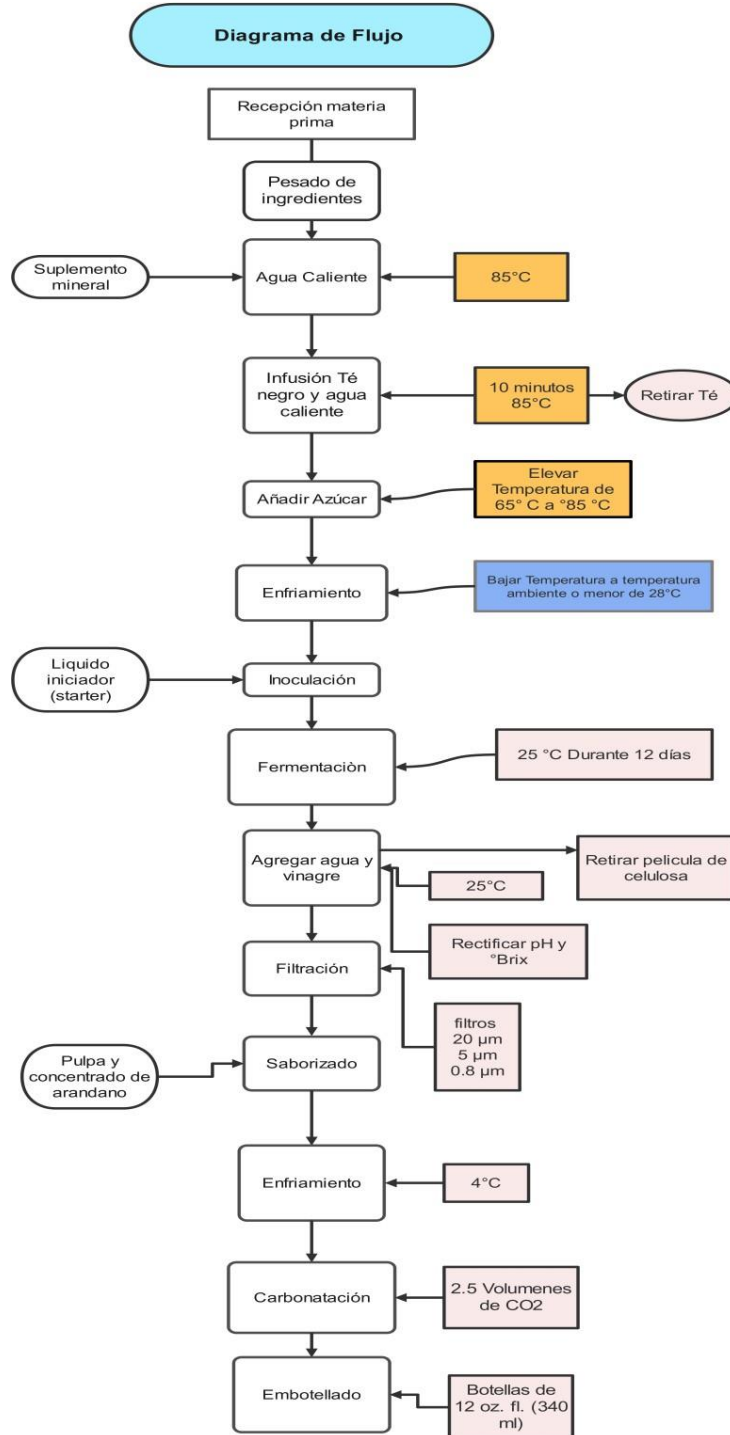
Para este experimento se ha establecido un rango más sencillo de carbonatación para poder escoger el Volumen de carbonatación con más facilidad, este se ha dividido en tres categorías.

Nivel de carbonatación	Vol. CO <sub>2</sub>
Baja	1,5-2,0
Estándar	2,4-2,7
Alta	3,0-3,5

Para este proyecto se ha escogido una carbonatación estándar, la cual es la carbonatación más común en las cervezas comerciales, y queremos aproximadamente llegar a tener una carbonatación similar en nuestra bebida de Kombucha.

## Diagrama de Flujo para elaboración de bebida Kombucha

La siguiente figura muestra el diagrama de flujo de la bebida de Kombucha que se desarrolló.



## **Hipótesis**

Hipótesis Alternativa: Si hay diferencia significativa de sabor entre las muestras diferentes de Bebida Kombucha preparadas con 3 diferentes tipos de té.

Hipótesis nula: No hay diferencia significativa de sabor entre las muestras diferentes de Bebida Kombucha preparadas con 3 diferentes tipos de té.

## **Evaluación Sensorial Kombucha**

Esta prueba está orientada hacia la preferencia del consumidor, para el análisis sensorial se seleccionó aleatoriamente un grupo, compuesto de personas representativas de la población de posibles consumidores (personal administrativo y operativo) de la empresa Grupo CAPSA. En esta prueba no se emplean panelistas entrenados.

La prueba del análisis sensorial se realizó en las instalaciones de la empresa Grupo Capsa, con un panel interno integrado por 10 personas potenciales consumidores de este producto.

El análisis nos ayudara a identificar la aceptabilidad de sabor de los productos y sus defectos. De esta manera se determinará cuál de las formulaciones sometidas al análisis es la que tiene más aceptación por el consumidor.

Se utilizará una escala hedónica la cual se enfoca en el grado de preferencia y aceptabilidad del producto en el consumidor. La escala de la prueba es de una categoría de 7 puntos que van desde “me agrada mucho” hasta “me desagrada mucho”. Los panelistas escogen la categoría que describa su percepción del producto.

Cada muestra fue elaborada con base en las formulaciones desarrolladas donde varían los tipos de té infusionados en las Bebidas

Muestra A = Bebida a base de Té Verde

Muestra B = Bebida a base de Te Negro

Muestra C = Bebida a base de Mezcla de Té Verde y Te Negro

**Procedimiento:**

1. 10 panelistas seleccionados, sin entrenamiento se les pide evaluar el sabor de las tres muestras de bebida de Kombucha.
2. Estas muestras han sido codificadas previamente, a los panelistas se les provee una boleta (ver apéndice #) y se les pide marcar una categoría en la escala, hedónica de 7 puntos, que va desde “me gusta mucho” hasta “me disgusta mucho”
3. Las muestras se presentan en vasos plásticos idénticos de 50 ml, identificados por un código cada uno colocados de manera aleatoria.
4. Se elaboró una boleta de evaluación sensorial para las 3 muestras
5. Después que cada panelista evaluó las tres muestras, las categorías descriptivas se convierten en puntajes numéricos del 1-7, donde uno representa “me disgusta mucho” y 7 “me gusta mucho”
6. Estos valores se analizarán por un análisis de varianza (Anova) para poder identificar si existen diferencias significativas en el promedio de los datos con los puntajes asignados.

**Escala Hedónica**

<b>Número</b>	<b>Categoría</b>	<b>Puntaje numérico para análisis de datos</b>
<b>1</b>	Me gusta mucho	<b>7</b>
<b>2</b>	Me gusta moderadamente	<b>6</b>
<b>3</b>	Me gusta solo un poco	<b>5</b>
<b>4</b>	No me gusta ni me disgusta	<b>4</b>
<b>5</b>	Me disgusta solo un poco	<b>3</b>
<b>6</b>	Me disgusta moderadamente	<b>2</b>
<b>7</b>	Me disgusta mucho	<b>1</b>



Boleta de evaluación sensorial				
Nombre				
Fecha				
Instrucciones: Por favor sírvase evaluar las siguientes muestras de bebidas. Marque con una x aquel lugar que con mayor exactitud interpreta la magnitud de agrado o desagrado que producen las muestras				
Puntaje	Categoría	Muestras		
		A	B	C
7	Me gusta mucho			
6	Me gusta moderadamente			
5	Me gusta solo un poco			
4	No me gusta ni me disgusta			
3	Me disgusta solo un poco			
2	Me disgusta moderadamente			
1	Me disgusta mucho			
Observaciones:				

**Análisis de los datos:** Para el análisis de los datos, las categorías se convierten en puntajes numéricos del 1 al 7, donde 1 representa "disgusta muchísimo" y 7 representa "gusta muchísimo". Los puntajes numéricos para cada muestra se tabulan y analizan utilizando análisis de varianza (ANOVA), para determinar si existen diferencias significativas en el promedio de los puntajes asignados a las muestras.

En el análisis de varianza (ANOVA), la varianza total se divide en varianza asignada a diferentes fuentes específicas. La varianza de las medias entre muestras se compara con la varianza de dentro de la muestra (llamada también error experimental aleatorio). Si las muestras no son diferentes, la varianza de las medias entre muestras será similar al error experimental. La varianza correspondiente a los panelistas o a otros efectos de agrupación en bloque, puede también compararse con el error experimental aleatorio.

Los puntajes numéricos para cada muestra se tabularán y analizarán utilizando análisis de varianza (Anova). Con los datos tabulados se procede hacer los siguientes cálculos:

Tratamientos: 3 muestras diferentes

Bloques (panelistas): 10 panelistas

N (Número total de respuestas): 30

## Análisis Estadístico

Evaluación Sensorial						
Test de aceptación						
Panelista (bloques)	muestra A	Muestra B	Muestra C	(Σ) Total Panelistas	Media de los panelistas	Suma de cuadrados
1	6	7	6	19	6.33	361.00
2	7	6	4	17	5.67	289.00
3	2	6	3	11	3.67	121.00
4	6	6	3	15	5.00	225.00
5	6	7	4	17	5.67	289.00
6	5	6	6	17	5.67	289.00
7	3	5	6	14	4.67	196.00
8	2	7	7	16	5.33	256.00
9	4	6	5	15	5.00	225.00
10	5	7	6	18	6.00	324.00
Total de muestras	46	63	50	159	53	2575
Media de las Tratamientos (muestras)	4.6	6.3	5	15.9	Factor de corrección	842.7
Suma de Cuadrados	2116	3969	2500	8585		

## Análisis de Varianza

<b>suma total de los cuadrados</b>	<b>SC(T)</b>	$\sum(\text{cada respuesta individual}^2) - FC$	<b>909</b>	<b>66.3</b>
Suma de los cuadrados de las tratamientos	<b>SC(Tr)</b>	Total de cada muestra <sup>2</sup> / número de respuestas por tratamiento-FC		
<b>SC(Tr)</b>		<b>15.8</b>		
<b>Suma de los cuadrados de los panelistas</b>	<b>Total de cada panelista<sup>2</sup>/ número de respuestas por panelista -FC</b>			
<b>SC(P)</b>		<b>15.63</b>		
<b>Suma de los cuadrados del error</b>	<b>SC(T) - SC(Tr) - SC(P)</b>			
<b>SC(E)</b>		<b>34.87</b>		

La medida de la varianza total para la prueba es la suma total de los cuadrados SC(T)

$$FC = \frac{(\sum \square \square \square \square \square)^2}{\square} = \frac{25281}{30} = FC = 842.7$$

**Suma total de cuadrados:**

$$SC(T) = \sum(\text{cada respuesta individual}^2) - FC$$

$$= 909 - 842.7 = 66.3$$

**Suma de los cuadrados de los tratamientos:**

$$SC(Tr) = [\sum E(\text{total de cada tratamiento}^2)] / [\text{número de respuestas por tratamiento}] - FC$$

$$= 2116 + 3969 + 2500 = 8585 / 10 - 842.7 = 15.8$$

**Suma de los cuadrados de los Panelistas:**

$$SC(Tr) = [\sum E(\text{total de cada panelista}^2)] / [\text{número de respuestas por panelista}] - FC$$

$$= 2575 / 3 - 842.7 = 15.63$$

Los valores Cuadráticos Medios (CM) se calcularon dividiendo los valores SC entre sus respectivos grados de libertad, como se presenta a continuación:		
<b>Total de grados de libertad</b>	<b>gl(T)</b>	<b>Número de respuestas - 1</b>
N-1		30
<b>Total de grados de libertad</b>		<b>29</b>
<b>Grados de libertad de los tratamientos</b>	<b>gl(Tr)</b>	<b>Número de tratamientos - 1</b>
N-1		3-1
<b>Total de grados de libertad</b>		<b>2</b>
<b>Grados de libertad de los panelistas</b>	<b>gl(P)</b>	<b>Número de panelistas - 1</b>
N-1		10-1
<b>Total de grados de libertad</b>		<b>9</b>
<b>Grados de libertad de los errores</b>	<b>gl(e)</b>	<b>gl(T)-gl(Tr)-gl(P)</b>
		29-2-9

<b>Total de grados de libertad</b>		<b>18</b>
<b>Promedio de los cuadrados de los tratamientos</b>	<b>CM(Tr)</b>	<b>SC(Tr)/gl(P)</b>
		15.8/9
<b>Promedio de los cuadrados de los tratamientos</b>		<b>1.76</b>
<b>Promedio de los cuadrados de los panelistas</b>	<b>CM(P)</b>	<b>SC(P)/gl(P)</b>
		7.9/6
Promedio de los cuadrados de los panelistas		<b>1.74</b>
<b>Promedio de los cuadrados de los errores</b>	<b>CM(E)</b>	<b>SC(E)/gl(E)</b>
		34.87/18
<b>Promedio de los cuadrados de los errores</b>		<b>1.94</b>

<b>Tabla de Análisis de Varianza</b>					
<b>Variables</b>	<b>Grados de Libertad(gl)</b>	<b>Suma de Cuadrados (SC)</b>	<b>Cuadrados Medios (CM)</b>	<b>Factor Calculado (FC)</b>	<b>Factor Tabulado (ft) ≤ (0.05)</b>
<b>Total(T)</b>	29	66.3			
<b>Tratamiento (Tr)</b>	2	15.8	1.76	0.91	3.554
<b>Panelistas (P)</b>	9	15.6	1.74	0.90	2.456
<b>Error (e)</b>	18	34.87	1.94		
Los valores F para tratamientos y panelistas, se calcularon dividiendo sus respectivos valores CM entre el CM del error.					
Los valores F tabulados se obtuvieron a partir de las tablas estadísticas de distribución F (Tabla 1) (gl Tr )2 (e) 18 = 3.554 y (gl P) 9 (e) 18 = 2.456					
Dado que el valor F calculado para tratamientos es de 0.91 y es inferior al valor F tabulado que es de 3.554, se llega a la conclusión de que no existe una diferencia significativa (p0.05), entre los puntajes hedónicos promedio para las 3 muestras					
El valor F calculado para los panelistas fue de 090. Este valor no fue mayor al valor F tabulado que es de 2.456; por lo tanto, no se encontró un efecto significativo de panelistas.					

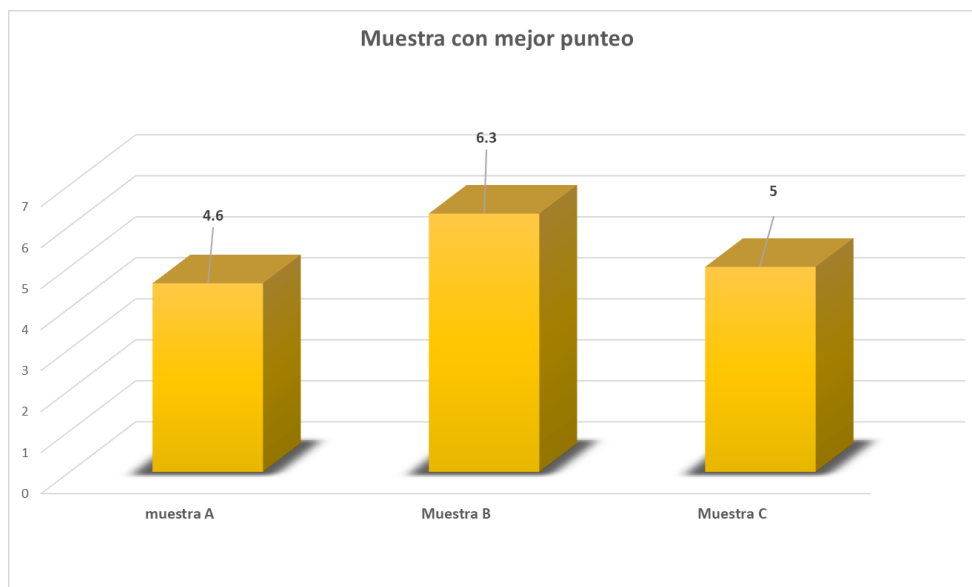
Prueba de amplitud múltiple de Duncan				
Variedades de Muestras	A	B	C	Para comparar las 3 medias, se calcularon los valores de amplitud para rangos de 3 y 2 medias utilizando la siguiente ecuación:
Medias de los tratamientos	4.60	6.30	5.00	

Amplitud = $Q \sqrt{CM(E)/t}$		
CM(E)= 1.94	t=número de respuestas individuales =10	
Amplitud = $Q \sqrt{1.94/10}$		
Amplitud =	Q	0.440

Diferencia entre muestras	Diferencia muestra	Diferencia entre medias	Comparación de medias	Valor de Amplitud	Significativa o no Significativa
B-A	6.30-4.60	1.70	2 medias	1.31	Significativo
C-A	5-4.60	0.40	2 medias	1.31	No Significativo
B-C	6.30-5	1.30	2 medias	1.31	No Significativo
<b>Se observó que la muestra B fue significativamente más aceptada que las otras muestras, con una diferencia entre medias de 1.70</b>					
Significativo	>Valor amplitud				
No Significativo	<valor amplitud				

Valores de Q * Amplitud	
Amplitud = Q(0.440)	
amplitud para 3 medias	1.37
amplitud para 2 medias	1.31

Valores de Q		
Valor de gl(e)	Los valores Q se obtienen de la tabla 2 (Valores de Q) al mismo nivel de significancia utilizado en el análisis de la varianza, $p \leq 0.05$ .	
18		
18→3	Valor Q para 3 medias	3.118
18→2	Valor Q para 2 medias	2.971



**Interpretación de resultados:** se pudo determinar por medio del análisis de comparación múltiple Duncan que si existe diferencia de aceptación de la muestra A respecto a la muestra B con una diferencia de medias de 1.70

## **Análisis Físicoquímico**

El análisis físicoquímico de alimentos es una herramienta fundamental en la industria alimentaria y en la investigación científica. Este análisis permite conocer las propiedades físicas y químicas de los alimentos, lo que resulta esencial para garantizar su calidad, seguridad y valor nutricional. Los análisis físicoquímicos son fundamentales en la industria para garantizar la calidad y seguridad de los productos. También son útiles para evaluar el rendimiento de los procesos de producción y detectar posibles problemas o deficiencias en los mismos. Entre los principales análisis físicoquímicos que se realizan en la industria se encuentran la determinación de pH, la medición de la viscosidad, la determinación de la densidad, la evaluación de la estabilidad y la evaluación de la toxicidad.

En resumen, los análisis físicoquímicos son esenciales para asegurar la calidad y seguridad de los productos industriales, así como para mejorar los procesos de producción

### **Determinación de pH**

Primero se calibro el potenciómetro Hanna HI98107 pH Meter con las soluciones buffer de calibración 7.01, 4.01 y 10.0.1.

Se utilizó un vaso de precipitación de 50 ml y se agregó 25 ml de la muestra, se mezcló bien por medio de un agitador y se ajustó la temperatura a  $20^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ .

Se sumergió el electrodo del potenciómetro en la muestra de manera que lo cubra.

Se esperó 25 segundos aproximadamente hasta que la lectura digital del potenciómetro se balanceara y diera el dato correcto.

Se procedió a anotar el pH y se sacó el electrodo y se procedió a lavar con agua destilada.

El resultado de la medición de pH fue de 3.4, el cual se encuentra entre el rango adecuado de producto terminado de Kombucha que es entre 2.3 – 3.8.

### **Determinación de sólidos solubles**

Para determinar los sólidos solubles se utilizó un Refractómetro de Brix, Marca LEERCHUANG, 0-90%, se colocó en una posición que difunda luz natural o artificial.

Se limpió cuidadosamente antes de hacer la lectura.

Se colocó solamente dos gotas de muestra sobre el prisma del refractómetro Se tomó la lectura en escala de  $^{\circ}\text{Brix}$  para todos los tratamientos

El Resultado de la lectura del refractómetro fue de 8°Brix

### **Determinación del alcohol con densímetro**

Esta medición tiene su basamento en el hecho que la densidad (o peso específico) de una solución hidro alcohólica disminuye de manera inversamente proporcional a la cantidad de alcohol que contiene. Es decir, mientras más alcohol contenga la solución, menor será su densidad.

**Hidrómetro:** Es un instrumento que basa su acción en la variación de flotabilidad que sufre un cuerpo cuando es sumergido en soluciones de diferente densidad. Es similar al densímetro empleado para medir sólidos solubles (ver artículo) pero su escala expresa la masa o peso de la solución por unidad de volumen, lo que se conoce como densidad o peso específico. Mediante tablas esta densidad puede ser relacionada con el contenido de alcohol y expresarse entonces como porcentaje o grado Gay-Lussac (°G.L.)

Un hidrómetro mide el peso de un líquido con relación al agua. El azúcar y otros sólidos fermentables agregan densidad al líquido, aumentando la gravedad específica. Durante se produce la fermentación los sólidos solubles son convertidos en alcohol, bajando la gravedad específica. Consecuentemente la gravedad específica es un indicador muy útil de fermentación previamente a inocular y por comparación con las lecturas iniciales, podemos obtener lecturas acertadas en los resultados.

El agua por definición tiene una gravedad específica de 1.000. La Kombucha sin fermentar, tiene altos niveles de sólidos fermentables, por lo cual tendrá gravedad específica más alta que 1.000.

Las diferentes escalas en un hidrómetro interpretan la gravedad específica de un líquido en 3 diferentes maneras:

- Escala de Brix o Balling: esta escala muestra el porcentaje de azúcar por peso
- Escala de alcohol potencial por volumen: esta escala indica el alcohol potencial en el líquido, para determinar el contenido de alcohol en una bebida, se necesita tomar lecturas de la fermentación inicial y la fermentación final.
- Escala de Gravedad específica: esta indica el cambio de gravedad específica entre la lectura de fermentación inicial y la lectura de fermentación final

Materiales:

1 probeta de 250 ml

1 densímetro de triple escala

Para determinar el grado de alcohol en este experimento se utilizó un densímetro o hidrómetro de triple escala. Primero se colocó el líquido en una probeta de 250 ml,



luego se introduce el hidrómetro con el peso hacia abajo, darle un giro con los dedos para desalojar las burbujas de aire. A la altura de los ojos, lea las líneas de medida en el vástago del hidrómetro donde la superficie del líquido atraviesa. Las líneas de medida dirán el contenido de azúcar y el contenido de alcohol. Antes de hacer la medición se ajustó la temperatura de la muestra a 15°C, que es la temperatura en la cual el hidrómetro da una lectura más exacta.

El resultado de la lectura fue el siguiente:

Gravedad específica Inicial = 1.060

Gravedad específica Final = 1.050 (después de 12 días de fermentación)

Con la siguiente fórmula calculamos el porcentaje de alcohol en base a la densidad.

Densidad Inicial DI – Densidad Final DF \* 131 = % de alcohol

$(1.055 - 1.050) * 131 = 0.65$

Con este resultado encontramos que el porcentaje de alcohol que se obtuvo en la bebida fue de 0.65% en Volumen.

### **Análisis Organoléptico**

Se realizó un análisis organoléptico por medio de un panel sensorial entrenado en las instalaciones de la Empresa Grupo Capsa, se utilizó el mismo grupo de 5 panelistas del área de control de calidad que tiene la empresa ya que son personas con experiencia y entrenamiento en la evaluación sensorial escogidas con el objeto de formar parte del panel sensorial de la empresa.

A cada panelista se le dio una muestra de 50 ml, de la bebida y en una boleta indicar la calidad de la bebida describiendo las sensaciones en las siguientes categorías:

- Sabor
- Color
- Olor
- Textura

Los resultados son los siguientes:

Análisis Organoléptico Kombucha	
Sabor	Ligeramente ácido
Olor	Violeta translúcido
Textura	fresca - sedosa
Color	Rojo - violeta translúcido

### **Tiempo de vida útil**

Con los resultados obtenidos podemos observar que es una bebida de calidad ya que se encuentra dentro de los valores obtenidos como óptimos.

En lo que respecta al resultado del análisis microbiológico se determinó que la bebida cumple con una buena calidad sanitaria.

El resultado de la medición de pH fue de 3.4, el cual se encuentra entre el rango adecuado de producto terminado de Kombucha que es entre 2.3 – 3.8.

El Resultado de la lectura del refractómetro fue de 8°Brix lo cual indica que existen 8g de azúcar por cada 100ml de líquido.

Uniéndolos todos los resultados, se determinó que el tiempo de vida útil del producto elaborado es de un mes en refrigeración a una temperatura óptima de 4°C.  $\pm 1$ , para inactivar o inhibir el proceso fermentativo propio de los microorganismos anaerobios si hubiera algún residuo de ellos después del proceso de filtración.

# Análisis Proximal



## Laboratorio VIDM, S.A.

Análisis Microbiológicos y Físicoquímicos para la Industria  
11 Avenida 5-29 Zona 4 Colonia Monte Real II, Mixco, Guatemala  
[info@labvidm.com.gt](mailto:info@labvidm.com.gt)  
[ventas@labvidm.com.gt](mailto:ventas@labvidm.com.gt)

### INFORME DE ENSAYO No. 2023-0845

Fecha y Hora Emisión 5/07/2023 11:57

<b>Empresa:</b>		<b>Lugar de toma de muestra:</b> Ciudad de Guatemala
<b>Solicitado por:</b> Josue David Lemus		<b>Fecha y hora de toma de muestra:</b> 13/06/2023 13:45h
<b>Dirección:</b> Ciudad de Guatemala		<b>Responsable de toma de muestra:</b> Cliente tomo muestra
<b>Fecha y hora de ingreso de muestra:</b> 13/06/2023 13:58h		

Muestra: Kombucha						
No	Código	Tipo de muestra	Lote		Observaciones	
1	2021	Bebida	NA		NA	
Análisis	Resultado	Unidad de medida	LD/LC	Metodología	Fecha de análisis	
Humedad	97.61	%	0.10	Balanza termogravimétrica	13/06/2023	
Grasa	ND	%	0.50	Extracción soxhlet	13/06/2023	
Proteína	ND	%	0.50	AOAC 976.05	13/06/2023	
Fibra cruda	ND	%	0.50	AOAC 962.09	13/06/2023	
Cenizas	0.09	%	0.10	AOAC 942.05	13/06/2023	
Carbohidratos solubles	2.30	%	NA	Por fórmula	13/06/2023	
Energía (Calorías)	9.2	kcal/100g	NA	Por fórmula	13/06/2023	

**Abreviaciones:**

LD/LC = Límite de detección/cuantificación

ND = No detectable

NA: No aplica

Última Línea

**Ingrid Marbella Guerra Ruiz**  
Ingeniera Química  
Colegiada No. 2987

Jefe Técnico de Laboratorio  
Colegiado



Laboratorio VIDM, S.A.  
Análisis Microbiológicos y Físicoquímicos para la Industria  
11 Av. 5-29 Zona 4 Colonia Monte Real II, Mixco  
Teléfonos: 4211-4425 / 4211-4000

\*Estos resultados corresponden únicamente a las muestras recibidas por el personal del laboratorio. Se prohíbe la reproducción total o parcial de éste informe sin la autorización del laboratorio.  
Muestra Evaluada en Laboratorio VIDM, S.A.

Teléfonos: (+502) 4224-7412 / 4211-4425 / 4211-7077

## Análisis microbiológico

14.3 Subgrupo del alimento: Jugos y bebidas artificiales no pasteurizados			
Parámetro	Categoría	Tipo de Riesgo	Límite Máximo permitido
<i>Escherichia coli</i>	5	B	<3 NMP/mL
<i>Salmonella ssp</i> /25 g (para jugos)	10		Ausencia



Alimentos Industriales Santa Lucía S.A  
Laboratorio de Microbiología

### INFORME DE ANÁLISIS

Fecha de Recepción de la muestra: 12/05/2,023  
 Fecha del Análisis: 12/05/2,023  
 Lugar de Análisis: Alimentos Industriales Santa Lucía, S.A.  
 Tipo de Muestra: Producto Terminado  
 Responsables de Análisis: Herber Quintana  
 Temperatura del Producto: 4°C

Cliente: **Josué David Lemus**  
 Producto: **Kombucha**  
 Fecha de vencimiento: 10/06/23  
 Número de Lote: 10052023

Parámetros	Recuento Aeróbico total	Coliformes Totales	<i>E. coli</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Salmonella spp</i>	Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>
RTCA 67.04.50:08-14.3	N/A	<10	<10	N/A	Ausencia en 25g	N/A
<b>UFC/g</b>						
<b>Resultados</b>	<1,000	<3	<3	Ausencia	Ausencia	Ausencia

#### Método: Petrifilm

AOAC 990.12 Recuento Total  
 AOAC 991.14 Coliformes / *E. coli*  
 AOAC 2003.07 Recuento de *Staphylococcus aureus*  
 AOAC 2014.01 *Salmonella Spp*  
 AOAC 101202 *Listeria Spp*

#### Observaciones

Está prohibida la reproducción parcial o total de este informe sin previa autorización de Alimentos Industriales Santa Lucía, S.A.

  
**Herber Quintana**  
 Laboratorio Microbiológico



Km 18.5 Carretera a San Juan Sacatepéquez, El Naranjito zona 06 de Mixco  
 PBX – FAX: (502) 2417-4865

## Discusión de resultados

Según la norma del RTCA 67.04.50:08 la clasificación de los alimentos por riesgo es la siguiente:

- Alimento riesgo tipo A: Comprende los alimentos que por su naturaleza, composición, proceso, manipulación y población a la que va dirigida, tienen una alta probabilidad de causar daño a la salud.
- Alimento Riesgo tipo B: Comprende los alimentos que por su naturaleza, composición, proceso, manipulación y población a la que va dirigida tienen una mediana probabilidad de causar daño a la salud.
- Alimento Riesgo tipo C: Comprende los alimentos que por su naturaleza, composición, proceso, manipulación y población a la que va dirigida tienen una baja probabilidad de causar daño a la salud.

La Kombucha al ser preparada con un volumen de alcohol por debajo del 0.5% ABV, se clasifica en el Grupo 14 de Bebidas no alcohólicas, la cual a su vez se clasifica como alimento riesgo tipo B. Según los resultados del informe de análisis microbiológico se puede concluir que la bebida cumple con los criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos establecidos por el RTCA.

Kombucha es bebida refrescante bien conocido por sus efectos beneficiosos para la salud. Kombucha es un té fermentado que se obtenido mediante la inoculación de té endulzado con bacterias del ácido acético y levaduras (Blanc, 1996; Jayabalan et al., 2010). Después de 10 a 14 días de la inoculación se desarrolla un nuevo hongo del té en la superficie del té. El té de Kombucha consiste en capa de película celulósica de dos porciones que flota en la parte superior del caldo y líquido agrio caldo. A medida que avanza la fermentación olor característico de fermentación y gas burbujas formadas debido al ácido fénico producidos son observados (Chen & Liu, 2000; Jayabalan et al., 2014). Estas observaciones son típicas del crecimiento de la fermentación Kombucha e indicativo de la fermentación del té (Jayabalan et al., 2014). En el presente estudio, observación notada con respecto a los signos del ciclo de fermentación es similar al estudio reportado por Jayabalan et al., por lo que se concluyó que el ciclo de fermentación se llevó a cabo en el presente estudio fue exitoso.

En esta investigación se realizaron pruebas de la bebida Kombucha infusionada con 3 tipos diferentes de té, Té negro, té verde y mezcla de los dos té, durante un período de 15 días de fermentación y luego se probaron. El análisis estadístico por medio de análisis de varianza y análisis de comparación múltiple de Duncan se logró comprobar que si existe diferencia de aceptación de la muestra B con respecto a las otras muestras siendo esta la más aceptada.

## Verificación de Hipótesis

Con los resultados del análisis estadístico realizado se acepta la hipótesis alternativa.

**Hipótesis Alternativa:** Si hay diferencia significativa de sabor entre las muestras diferentes de Bebida Kombucha preparadas con 3 diferentes tipos de té.

Esto nos dice que al aceptar la hipótesis alternativa las infusiones de diferentes tipos de té utilizados si influyen en la calidad sensorial y físico química de la bebida fermentada Kombucha.

## Conclusiones

El medio de cultivo de Kombucha durante la fermentación disminuye su valor de pH y los sólidos solubles también disminuyen, pero en menor escala. Mientras que la población microbiana va aumentando con el tiempo ya que producen ácidos orgánicos en la fermentación lo cual hace que el pH disminuya por la concentración de acidez, y los sólidos solubles disminuyan también porque el azúcar es sustrato que utilizan los microorganismos como fuente de carbono.

De acuerdo con los resultados fisicoquímicos realizados en la experimentación de esta investigación, se determina que la formulación a base de Té negro, que consistió en preparar la bebida con una concentración de 10g/L, de té negro marca Lipton y una concentración de 12 °Brix, es viable para replicar a nivel comercial ya que aplica los estándares mínimos solicitados en el Reglamento Técnico Centroamericano, RTCA 67.01.60:10 Etiquetado Nutricional Productos Alimenticios Pre envasados para Consumo Humano. Esto puede declararse en la etiqueta dando un mayor valor nutricional, y saludable a nivel comercial.

Según los factores de este estudio establecidos en la investigación se demostró que el factor determinante en las características organolépticas y fisicoquímicas son el pH y Sólidos Solubles, de la bebida ya que estos fueron los valores más significativos en el análisis organoléptico. Sin embargo, podemos observar a partir del análisis estadístico que también es importante el tipo de infusión de té a utilizar en la bebida ya que de todas las muestras la infusión de té negro demostró tener una diferencia de aceptación significativa. Esto nos permitió establecer una receta adecuada para la obtención de una bebida apta para el consumo humano

El tiempo óptimo de fermentación en la ciudad de Guatemala, que en esta época del año entre marzo y junio mantiene una temperatura promedio de 25°C aproximadamente, fue de 15 días ya que en la experimentación la bebida alcanzo a obtener un pH de 3.4 el cual se encuentra en los niveles óptimos para una bebida de Kombucha.

## Recomendaciones

En base a la investigación realizada en este documento, mediante la teoría y estudios mencionados, se puede concluir que el consumo periódico de la bebida Kombucha se puede recomendar para todas las persona que deseen experimentar los beneficios de una salud preventiva y también para persona que presenten quebrantos de salud, debido que la tratarse de un producto natural no se han reportado contraindicaciones, sin embargo el consumo en exceso puede revertir los resultados beneficiosos de la bebida.

Durante el proceso de elaboración de la bebida se recomienda no utilizar y manipular la bebida directamente con recipientes metálicos que no sean aptos para uso alimentario, hay algunos tipos de metales como el aluminio, que pueden crear una reacción química al contacto con el producto por su baja acidez y consecuentemente alterar las propiedades beneficiosas en los microorganismos y en la bebida.

Es vital mantener la temperatura de refrigeración de la bebida de Kombucha una vez terminado el proceso de fermentación, entre 0°C a 5 °C de una manera controlada, evitando romper la cadena de frío, ya que una vez envasada la bebida pueden haber microorganismos vivos aun después de la filtración y la fermentación puede retomar su proceso generando una bebida muy acida y fuera de los parámetros permitidos.

Para asegurar la inocuidad del producto final es necesario respetar normas básicas de higiene y Buenas Prácticas de Manufactura durante todas las etapas del proceso de elaboración, especialmente en la fase de la inoculación y fermentación, ya que el cultivo simbiótico de bacterias y levaduras, son muy susceptibles de contaminarse por microorganismos, especialmente, especies de mohos como el *Aspergillus*, el cual de darse el caso, representaría un riesgo para los consumidores, principalmente por la temperatura de fermentación que normalmente es a temperatura ambiente.

Se recomienda continuar el estudio e investigación de alimentos o materias primas que contengan compuestos bioactivos con actividad biológica, como la actividad antioxidante o la presencia de probióticos, debido a que ofrecen beneficios a la salud de los consumidores.

Se sugiere el aprovechamiento de frutas, vegetales y materias primas nativas de Guatemala, las cuales contienen importantes beneficios nutricionales y potencialmente funcionales para el desarrollo de nuevos e innovadores productos que van cobrando interés en una sociedad cada vez más atenta en la incorporación de alimentos que le brinden algún beneficio asociado a la salud.

## Bibliografía

Toribio, L. D. (2019). Efecto de tres concentraciones de Kombucha en las características morfo estructurales del micelio de oídium farinosum Cooke.

Téllez, S. G. y Vázquez, D. O. (2018). Bebidas fermentadas nutraceúticas elaboradas a partir del hongo Kombucha y su uso potencial en el tratamiento de síndrome metabólico. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos, 3, 338-343. Disponible en: <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume3/4/4/56.pdf>

RTCA. (2011). Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.01.60:10 Etiquetado Nutricional, Productos Alimenticios Pre envasados para Consumo Humano para la Población a partir de 3 años.

González, T. (2018). Bebidas fermentadas nutraceúticas elaboradas a partir del hongo Kombucha y su uso potencial en el tratamiento de Síndrome metabólico. Disponible en: <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume3/4/4/56.pdf>

Aedo, V. R. (2011). Determinación de parámetros de fermentación para la producción de Kombucha utilizando una población mixta de microorganismos denominado fermento de té. (Tesis Profesional de Ingeniería Industrial). Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Perú. Disponible en: [http://repositorio.unamba.edu.pe/bitstream/handle/UNAMBA/418/T\\_0029.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unamba.edu.pe/bitstream/handle/UNAMBA/418/T_0029.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Gerard J., Tortora N. 1993. Introducción a la Microbiología. 3ra ed. España. Editorial Acribia. 765 p.

Pacheco, C., Yee, M., Zentella, C., & Marván, E. (2017). Celulosa Bacteriana en *Gluconacetobacter Xylinum*: Biosíntesis y Aplicaciones. TIP Revista Especializada en Ciencias Químicas-Biológicas

Mayser, P., Fromme, S., Letizmann, C., & Grunder, K. (1995). The yeast spectrum of the tea fungus kombucha. Mycoses, 38, 289-295

Kontturi, E. (2015). Cellulose: structure, morphology, and crystalline forms. Aalto University, School of Chemical Engineering

Günther W. Frank - 2005-. Kombucha, una Bebida Saludable y Remedio Natural del Lejano Oriente, (150 Págs.). Austria

Neil Stevens - Kombucha el Té extraordinario - 1996 EDITORIAL SIRIO, S.A. Panaderos, 9 - 29005-Málaga

Keshk, S., & Sameshima, K. (2005). Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production. African Journal of Biotechnology, 4(6), 478-482. East (9va ed.).



Sharma, C., & Bhardwaj, N. K. (2019). Biotransformation of fermented black tea into bacterial nanocellulose via symbiotic interplay of microorganisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132, 166–177

Amarasinghe, H., Weerakkody, N. S., & Waisundara, V. Y. (2018). Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha “Tea Fungus” during extended periods of fermentation. *Food Science and Nutrition*, 6(3), 659–665

Jayabalan, R., Malbaša, R. V., & Sathishkumar, M. (2017). Kombucha Tea: Metabolites. En J. M. Mérillon, & K. G. Ramawat (Edits.), *Fungal Metabolites* (págs. 965-978)

Rosina Fasching, *Té Del Hongo Kombucha, el Remedio Natural y sus Implicancias en Tratamiento de Cáncer y otros Desórdenes Metabólicos*. (60 Págs.)

Balentine, D., Wiseman, S., & Bouwens, L. (1997). The chemistry of tea flavonoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (37), 693-704.

Blanc, P. (1996). Characterization of the tea fungus metabolites. *Biotechnology Letters* (18), 139-142.

Mayser, P., Fromme, S., Letzmann, C., & Grunder, K. (1995). The yeast spectrum of the tea fungus kombucha. *Mycoses*, 38, 289-295

GALLEGOS J., *Manual de prácticas de Microbiología de los Alimentos.*, 1 ed., Riobamba - Ecuador., 2003., Pp.14 – 16, 45 -46

STEVENS, N., *La Kombucha. El té extraordinario.*, 3 ed., Barcelona – España., Editorial Sirio., 2003., Pp. 18 - 57. E-book: <http://books.google.com.ec/books?id=QqITo033pMgC&pg=PA18&dq=kombucha+%28Manchurian+fungus%29&hl=es419&sa=X&ei=nQQ7UsjTPJC88wTo5oHgAQ&ved=0CDcQ6AEwAQ#v=onepage&q=kombucha%20%28Manchurian%20fungus%29&f=false>.

AMMAR, E y otros., *Revista científica., Antimicrobial effect of Kombucha analogues.*, 1 ed., Tunisia - Tunez., Elsevier., *LWT - Food Science and Technology.*, Vol. 47., No.1., 2012, .E-Book: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643812000023>

JAYABALAN, R y otros., *Revista Científica., Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation.*, 1ed., Tamil Nadu -India., Elsevier., *Food Chemistry.*, Vol. 102., No. 1., 2007., Pp. 391 – 393. E Book: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814606004250>

RUBIO, ALFREDO., *Té de Kombucha y sus beneficios para el sistema digestivo.*, *Maestría en Neuropatía.*, Universidad Particular Equinoccial., (UPE). Cuenca-Ecuador., Pp. 20 - 29. E-Book: <http://www.monografias.com/trabajos-pdf4/te-kombucha-y-salud/te-kombucha-y-salud.pdf>

Scale-up of black tea batch fermentation by kombucha institution of chemical engineers. eBook:

<http://scihub.org/mail/lg.php?doi=10.1205/fbp.05061&url=aHR0cDovL2xpYmdlbi5vcmcvc2NpbWFnMy8xMC4xMjA1L2ZicC4wNTA2MS5wZGY%3DBuscado el 7/ 01/2014>