



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas en dos variedades de SCOBY de Kombucha (*Medusomyces gisevi*) desarrollados a partir de té de dos especies vegetales, té negro (*Camellia sinensis*) y guayusa (*Ilex guayusa*), para su aplicación como agente antimicrobiano.

Cando Merino, Wendy Carolina y Curipoma Vergara, Karol Jainne

Departamento de Ciencias de la vida y Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología

PhD. Sanchez Llaguno, Sungey Naynee

29 de Agosto 2022

Reporte de verificación de contenido



Trabajo de integración curricular Cando_Curipoma.pdf

Scanned on: 16:58 August 29, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	131
Words with Minor Changes	0
Paraphrased Words	181
Omitted Words	4300



Website | Education | Businesses

Firma:

SUNGEY NAYNEE
SANCHEZ LLAGUNO**PhD. Sánchez Llaguno, Sungey Naynee**

C. C.: 1205348673

Directora del Proyecto de Investigación



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de integración curricular, "**Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas en dos variedades de SCOBY de Kombucha (*Medusomyces gisevi*) desarrollados a partir de té de dos especies vegetales, té negro (*Camellia sinensis*) y guayusa (*Ilex guayusa*), para su aplicación como agente antimicrobiano**" fue realizado por las señoritas **Cando Merino, Wendy Carolina y Curipoma Vergara, Karol Jainne** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 29 agosto del 2022

Firma:



Firmado digitalmente por:
SUNGEY NAYNEE
SANCHEZ LLAGUNO

PhD. Sánchez Llaguno, Sungey Naynee

C. C.: 1205348673

Directora del Proyecto de Investigación



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Nosotras, **Cando Merino, Wendy Carolina** y **Curipoma Vergara, Karol Jainne**, con cédulas de ciudadanía N° 2300292600 y N° 2351098062, declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **"Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas en dos variedades de SCOBY de Kombucha (*Medusomyces gisevi*) desarrollados a partir de té de dos especies vegetales, té negro (*Camellia sinensis*) y guayusa (*Ilex guayusa*), para su aplicación como agente antimicrobiano"** es de nuestra autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 29 agosto del 2022

Firmas

Cando Merino, Wendy Carolina

C.C.: 2300292600

Curipoma Vergara, Karol Jainne

C.C.: 2351098062



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Nosotras, **Cando Merino, Wendy Carolina** y **Curipoma Vergara, Karol Jainne**, con cédulas de ciudadanía N° 2300292600 y N° 2351098062, autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **"Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas en dos variedades de SCOBY de Kombucha (*Medusomyces gisevi*) desarrollados a partir de té de dos especies vegetales, té negro (*Camellia sinensis*) y guayusa (*Ilex guayusa*), para su aplicación como agente antimicrobiano"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 29 agosto del 2022

Firmas

Cando Merino, Wendy Carolina

C.C.: 2300292600

Curipoma Vergara, Karol Jainne

C.C.: 2351098062

Dedicatoria

En primer lugar, a Dios, por ser mi creador y dador de vida por su amor infinito quien me ha sostenido siendo mi guía, luz y fortaleza todos los días de mi vida quien me ha protegido cuidado, amado sin dudarlo hasta hoy puedo decir lo logramos Señor, ambos conocemos que este sueño como este día lo añoraba desde aquella tarde que me encontraba buscando y pensado que es lo que me gustaría estudiar me ha guiado desde siempre y me lo ha dado todo permitiéndome cumplir este sueño importante para mi vida profesional. A la Virgencita María madre Dolorosa por ser mi camino y guía quien ha sostenido en mis días oscuro permitiéndome jamás sentirme lejos de Dios o sola.

A mis padres Tobías Cando y Suriana Merino por ser mi ejemplo, luz, guía quienes siempre me han brindado sus consejos junto con su amor y oraciones quienes me han dado todo su apoyo y sacrificio para culminar mis estudios e inspirado a superarme y jamás rendirme.

A mi ñaño Danilo e Israel por que han confiado en mí y me han sabido brindar consejos, cariño y mucho apoyo me han escuchado y han estado para mí siempre.

A mi abuelita Lida quien me ha dado mucho amor y consejos, sobre todo por cuidarme con sus oraciones.

A mi enamorado Mauricio González porque desde que llego a mi vida me ha brindado todo su amor, cariño y calidez siendo parte de mí, sin duda me ha sostenido durante este proceso universitario quien jamás ha dudado de mi capacidad y ha creído en mí.

A mis amigos y compañeros quienes han estado para brindarme su cálida compañía y por formar parte de mi crecimiento personal como profesional.

Dedicatoria

La presente investigación va a dedicada a mi familia por ser mi principal motor que me impulsa a seguir esforzándome día a día, ya que es gracias a mi madre, mi hermana y mi padre que me encuentro cumpliendo uno de los sueños tan ansiados desde la infancia, que es el realizarme profesionalmente y lo cual, con el presente trabajo lo he logrado alcanzar.

A mi madre Blanca Vergara por darme la convicción de que, con el esfuerzo, la dedicación y osadía que uno se proponga en cada proyecto, se puede llegar a lograr cada uno de nuestros objetivos o metas planteadas, a más de ello por darme mucha comprensión en cada una de las etapas que transcurrí durante mi formación académica, por haber estado incondicionalmente apoyándome y brindándome de mucha calidez para seguir adelante.

A mi hermana Alexandra Curipoma por brindarme mucho afecto y confianza, por ser la mejor amiga y guía, al enseñarme que por más obstáculos que se nos presente en la vida, podemos llegar a cumplir nuestras metas y que ante todo debe primar nuestra bondad, sencillez y calidez humana para ser mejores personas y por tanto mejores profesionales.

A mi padre Jorge Curipoma por brindarme mucho apoyo durante la carrera, por sacarme risas con sus ocurrencias en días muy complicados, por demostrarme que pese a que hay momentos difíciles o de quiebre uno también puede sobreponerse y continuar para llegar a cumplir nuestras metas o como me sabe mencionar con su frase célebre para alzarme los ánimos: “¿Qué prefieres?: ¿ser como una cebolla o como un roble?”

Por qué la cebolla a las 9 semanas ya es vieja o como un roble que a los 100 años es viejo” dándome una lección respecto a la fortaleza que debo tener en todo aspecto de la vida y demostrándome que si bien es cierto que a veces se nos presentan situaciones que son aparentemente más fáciles de manejar, no son siempre las más adecuadas, ya que somos capaces de lograr todo lo propuesto.

A mi hermanos Ignacio y Alex Curipoma por creer siempre en mí, por mostrar su amor, confianza y apoyo incondicional pese a la distancia.

Agradecimiento

Durante todo el trayecto de mi caminar ha sido clave cada etapa hasta poder cumplir este sueño por ello agradezco a Dios y la virgencita por regalarme el don de la vida permitiéndome ser feliz junto a mis seres querido y amigos cercanos por darme la gracia y oportunidad de conseguir esta meta. Gracias por confiar en mí y darme mucha fortaleza en este camino.

Principalmente a mis padres por su apoyo incondicional para culminar mi carrera universitaria.

A mi tutora, PhD. Sungey Sánchez al igual que el PhD. Juan Neira, por ser y haberme, compartido sus conocimientos en mis años de estudios, así como en el trabajo de titulación, desde luego han sido personas maravillosas que siempre me enseñaron a aspirar más me han inspirado en todo mi proceso universitario. Gracias Infinitas.

A la Ingeniera Paola Proaño por ser no solo mi docente sino también amiga por haber confiado en mi por haberme impulsado en mi camino universitario gracias infinitas por enseñarme que todo es posible con dedicación y esfuerzo.

Al Doctor Gooty por ser un gran amigo y consejero quien siempre ha sido muy paciente y colaborador en mi camino universitario, gracias por todos los conocimientos impartidos.

Al Ingeniero Mario Moreno por su calidez de docente, por su colaboración y amistad durante la Carrera.

Al Ingeniero Patricio Vaca por su ayuda y comprensión en cada una de las labores y procesos universitarios quien amablemente me ha brindado su colaboración conjuntamente con su amistad.

A la Ingeniera Katty Medina por su grata amistad y colaboración durante el proyecto de investigación.

A mis amigos Karol, Belen, Haider y Efraín porque desde que los conocí me han enseñado a amar mucho más el estudio porque han sido mi apoyo, consejeros y sobre todo amigos.

A mis amigas Josselyn, Ivonne, Alison, Nicolly porque este camino universitario sin ellas se hubiera tornado muy difícil las quiero mucho gracias por su amistad.

A mis mejores amigos del colegio Gretel, Ashly, Fercho, Pablo y Andrés quienes sin duda me han brindado su cariño y comprensión permitiéndome ser yo misma siempre. Gracias por confiar en mi y por cuidarme siempre.

A mis increíbles chicos a quien tuve la dicha de conocer en este recorrido universitario y que sin duda puedo llamarlos amigos Brandon, Ale, Jazmín, Eve, gracias infinitas por su cariño y apoyo siempre los llevaré en mi corazón.

Es un buen momento para agradecer a amigos que hice fuera de mi carrera y que la U me regalo estoy muy agradecida de que hayan sido parte de este camino que no ha sido fácil pero que en muchas ocasiones estuvieron ahí para mí los quiero y aprecio mucho chicos Omar Ferrín, Yaritza Farfán, Betty Valverde, Fabricio Zambrano, Diego Velasco.

Aprovecho también para agradecer a cada una de las personas que fueron mis compañeros y amigos desde el día uno en la Universidad me enseñó a ser mejor, sin duda cada persona que conocí le aportó a mi vida de una u otra forma, gracias infinitas.

Gracias infinitas a la familia de mi amigo Haider, Karol y de mi enamorado Mauricio quien de una manera especial siempre me han hecho sentir en casa y segura gracias por el cariño, consejos en el trayecto de este camino.

A mis docentes por haberme inculcado y enseñado sobre sus materias y experiencias hoy puedo decir que una parte de ellos se va conmigo porque no solo fueron buenos, fueron excelentes.

Agradecimiento

Son varias las personas que fueron parte de este proceso educativo y de investigación, por ello considero pertinente agradecerles por su apoyo, por sus ánimos y sobre todo por brindarme confianza y por compartirme cada conocimiento, experiencia y momento que han contribuido a mi formación.

A la Dra. Sungey Sánchez por brindarme todo su apoyo y conocimiento durante toda mi formación académica, ya que siempre estuvo pendiente y disponible a cualquier interrogante, así también por permitirme realizar la presente investigación y tenerla como mi tutora y guía en esta etapa tan importante de mi carrera.

Al Dr. Juan Neira por haberme compartido su conocimiento y hacerme notar que todo proceso académico requiere el mayor esfuerzo y dedicación que precisemos para convertirnos en buenos profesionales sin dejar de lado el ser correctas y buenas personas para notar al final del camino que tras dicho esfuerzo se obtienen las recompensas.

A la Ing. Katty Medina por habernos contribuido durante nuestra fase de investigación en los laboratorios.

Al Dr. Jaffer Gooty le agradezco porque a más de haberme compartido sus conocimientos nos ha brindado su amistad, haciéndonos notar en diversas ocasiones la importancia de esta palabra y sobre todo la importancia que debemos dar a nuestros amigos que nos rodean.

Al Ing. Mario Moreno le agradezco por ser una gran persona, por apoyarme en cada proceso realizado y por la confianza depositada en cada etapa.

A cada uno de los profesores/ras que fueron parte de mi formación académica desde los inicios de la carrera, ya que soy el resultado de cada granito de conocimiento que han depositado para lograr convertirme en la persona que actualmente soy.

A mis amigos, Haider Cuello, Diana Macías, Juliet Toaquiza, Kevin Yedra, Carolina Cando y Belén Jacome por brindarme su apoyo incondicional durante todo este proceso, haciéndome notar la capacidad que poseo para realizarme profesionalmente y sobre todo por alegrar mis días en esta etapa, por hacerme notar que los amigos son la familia que uno elige, por tanto, son un regalo valioso que podemos poseer en este mundo.

A quien en vida fue Sebastián Galarza, mi amigo de toda la vida, que siempre confió en mi capacidad y determinación de poder llevar a cabo mi realización profesional, quien siempre me hizo notar que pese a las dificultades que se presentaron durante mi formación académica, lo iba a lograr y no debía desistir hasta alcanzarlo y verlo plasmado.

A la Dra. Karina Ponce por haberme compartido muestras de la Kombucha que posteriormente produjo para llevar a cabo la presente investigación.

A mi familia por apoyarme en cada etapa de este proceso conjuntamente con la bendición de Dios, por haberme cuidado, por guiarme y darme mucha fortaleza y ánimos para llegar a lograr mis objetivos planteados desde que entre a estudiar.

Karol Curipoma

Contenido del índice

Carátula.....	1
Reporte de verificación de contenido.....	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de Publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimiento.....	10
Contenido del índice.....	15
Índice de Tabla.....	20
Índice de Figura.....	23
Resumen.....	26
Abstract.....	27
Capítulo I.....	28
Introducción.....	28
Objetivos.....	31
Objetivo general.....	31
Objetivos específicos.....	31
Hipótesis.....	32
Hipótesis nula.....	32
Hipótesis alternativa.....	32

	16
Capítulo II	33
Revisión literaria	33
Kombucha	33
¿Qué es la Kombucha?	34
¿Qué es el SCOBY?	35
Composición química	35
Propiedades físico-químicas	40
Composición Microbiana	40
Levaduras	41
Bacterias ácido acéticas (BAA)	41
Bacterias ácido lácticas (BAL).....	42
Clasificación-tipos.....	43
Propiedades Conservantes	44
Tipos de fermentaciones	44
Beneficios a favor de la salud	45
Té negro	46
Origen	47
Tipos de té a partir de té verde	48
Té negro	48
Té blanco.....	48
Té Pu-erh	49
Té verde	49
Té Oolong.....	50

	17
Taxonomía	50
Composición química del té	50
Aporte nutricional	52
Propiedades fisicoquímicas.....	53
Guayusa	54
Origen	54
Crecimiento.....	55
Taxonomía	56
Tipos de Guayusa.....	56
Ilex Guayusa	56
Ilex vomitoria	57
Ilex paraguariensis	57
Composición química.....	57
Propiedades fisicoquímicas de la Guayusa.....	58
Beneficios de Ilex Guayusa.....	59
Capitulo III.....	60
Materiales y métodos.....	60
Lugar del área de investigación.....	60
Ubicación política	60
Ubicación Geográfica.....	60
Ubicación ecológica	61
Materiales	62
Preparación de Té.....	62

	18
Determinación de Grados Brix	62
Determinación de pH	63
Determinación de Acidez titulable	63
Recuento de poblaciones microbianas.....	64
Siembra de microorganismos.....	65
Aislamiento de microorganismos	66
Identificación microbiológica de microorganismos	67
Análisis estadístico	67
Niveles y Factores de la investigación	67
Interacción de los tratamientos	68
Tipo de diseño	68
Repeticiones	69
Métodos.....	70
Preparación de Té.....	70
Determinación de Grados Brix	70
Determinación de pH	71
Determinación de Acidez titulable	71
Recuento de poblaciones microbianas.....	72
Siembra de microorganismos.....	73
Aislamiento de microorganismos	74
Identificación microbiológica	74
Identificación bioquímica de microorganismos	75
Capítulo IV	77

	19
Resultados.....	77
Parámetros físico químicos por individual en los diferentes días.....	77
Factor A (Tipo de Kombucha)	83
Factor B (Tipo de especie vegetal).....	88
Interacción Factor A x B (Tipo de Kombucha con tipo de especie vegetal).....	93
Análisis de componentes principales	98
Unidad formadora de colonias	101
UFC por individual en los diferentes días	101
Factor A (Tipo de Kombucha)	106
Factor B (Tipo de especie vegetal).....	109
Interacción A X B (Tipo de Kombucha con tipo de especie vegetal).....	112
Caracterización morfológica	116
Capítulo IV.....	118
Discusión	118
Respecto al pH	118
(Factor A) Tipo de Kombucha.....	118
(Factor B) Tipo de especie vegetal	118
(Factor AXB) Tipo de Kombucha con tipo de especie vegetal	119
Respecto a la acidez.....	120
(Factor A) Tipo de Kombucha.....	120
(Factor B) Tipo de especie vegetal	120
(Factor AXB) Tipo de Kombucha con tipo de especie vegetal	120
Respecto a los grados Brix	121

	20
(Factor A) Tipo de Kombucha.....	121
(Factor B) Tipo de especie vegetal.....	121
(Factor AXB) Tipo de Kombucha con tipo de especie vegetal.....	122
Respecto a los tipos de petrifilm usados.....	122
Respecto a bacterias aerobias.....	122
(Factor A) Tipo de Kombucha.....	122
(Factor B) Tipo de especie vegetal.....	123
(Interacción AXB) Tipo de Kombucha con tipo de especie vegetal.....	123
Respecto a mohos y levaduras.....	123
(Factor A) Tipo de Kombucha.....	123
(Factor B) Tipo de especie vegetal.....	124
(Interacción AXB) Tipo de Kombucha con tipo de especie vegetal.....	124
Conclusiones.....	125
Factor A.....	125
Factor B.....	126
Interacción A*B.....	127
Unidades formadoras de colonias en Petrifilm.....	127
Recomendaciones.....	128

Índice de Tabla

Tabla 1 Principales ácidos orgánicos identificados en la Kombucha.....	36
Tabla 2 Compuestos fenólicos presentes con mayor abundancia en Kombucha de té verde y negro.....	38

	21
Tabla 3 Otros compuestos químicos presentes en la Kombucha	39
Tabla 4 Contenido alcohólico en g/L de la Kombucha según investigaciones.....	40
Tabla 5 Levaduras encontradas en la Kombucha	41
Tabla 6 <i>Bacterias Ácido Acéticas (BAA) encontradas en la Kombucha</i>	41
Tabla 7 Bacterias Ácido Lácticas (BAL) encontradas en la Kombucha	43
Tabla 8 Compuestos químicos del té negro	51
Tabla 9 Composición nutricional del té negro.....	53
Tabla 10 Componentes químicos de la Guayusa	58
Tabla 11 Propiedades fisicoquímicas de la Guayusa	58
Tabla 12 Materiales empleados para la preparación de té negro y guayusa para la obtención de SCOBY.....	62
Tabla 13 Materiales empleados para evaluación de grados Brix en muestras té negro y té de guayusa para la obtención de SCOBY	62
Tabla 14 Materiales requeridos para análisis de pH de té negro y té de guayusa para la obtención de SCOBY.....	63
Tabla 15 Materiales requeridos para el análisis de acidez titulable de té negro y té de guayusa para la obtención de SCOBY	63
Tabla 16 Materiales para el recuento microbiológico de las muestras de té negro y té de guayusa.....	64
Tabla 17 Materiales de siembra dispensables para la obtención de microorganismos presentes en los SCOBY de Kombucha	65
Tabla 18 Materiales para aislamiento de microorganismos a partir de los tipos de SCOBY y especies vegetales	66
Tabla 19 Identificación de microorganismos provenientes de las muestras de té negro y guayusa con sus respectivos SCOBY	67
Tabla 20 Factores y niveles para llevar a cabo la investigación	68
Tabla 21 Interacciones respectivas con sus respectivos tratamientos (Kombucha y sustratos).....	68

	22
Tabla 22 Análisis de varianza, para análisis físico químicos	69
Tabla 23 Análisis de varianza pH día 3	77
Tabla 24 Análisis de varianza de acidez día 3	77
Tabla 25 Análisis de varianza de Brix día 3.....	77
Tabla 26 Análisis de varianza pH día 5	79
Tabla 27 Análisis de varianza acidez día 5	79
Tabla 28 Análisis de varianza grados Brix día 5.....	79
Tabla 29 Análisis de varianza pH día 7	81
Tabla 30 Análisis de varianza acidez día 7	81
Tabla 31 Análisis de varianza Brix día 7.....	81
Tabla 32 Análisis de parámetros físico-químicos de separación de medias del Factor A de los tipos de Kombucha en el día 3.....	83
Tabla 33 Análisis de parámetros físico-químicos de separación de medias del Factor A de los tipos de Kombucha en el día 5.....	85
Tabla 34 Análisis de parámetros físico-químicos de separación de medias del Factor A de los tipos de Kombucha en el día 7.....	87
Tabla 35 Análisis de parámetros físico-químicos de separación de medias del Factor B de los tipos de medio (sustratos vegetales) en el día 3	88
Tabla 36 Análisis de parámetros físico-químicos de separación de medias del Factor B de los sustratos vegetales en el día 5.....	90
Tabla 37 Análisis de parámetros físico-químicos de separación de medias del Factor B de las especies vegetales en el día 7	92
Tabla 38 Análisis de parámetros físico-químicos de separación de medias del Factor A (tipos de Kombucha) y Factor B (especie vegetales) en el día 3	93
Tabla 39 Análisis de parámetros físico-químicos de separación de medias del Factor A (tipos de Kombucha) y Factor B (tipo de especie vegetal) en el día 5	95
Tabla 40 Análisis de parámetros físico-químicos de separación de medias del Factor A (tipo de Kombucha) y Factor B tipos de medio (especies vegetales) en el día 7	96

	23
Tabla 41 Matriz de correlaciones	98
Tabla 42 Matriz de componentes principales	99
Tabla 43 Tabla de varianzas totales.....	99
Tabla 44 Análisis de varianza de UFC de bacterias aerobias día 3.....	101
Tabla 45 Análisis de varianza de UFC de mohos y levaduras en el día 3	102
Tabla 46 Análisis de varianza de UFC de bacterias aerobias en el día 5.....	103
Tabla 47 Análisis de varianza de UFC de mohos y levaduras en el día 5	103
Tabla 48 Análisis de varianza UFC de bacterias aerobias en el día 7.....	104
Tabla 49 Análisis de varianza de mohos y levaduras 7	105
Tabla 50 Análisis de separación de medias con prueba de Tukey para el Factor A (tipos de Kombucha) en los días 3, 5 y 7.	106
Tabla 51 Análisis de separación de medias de las UFC con prueba de Tukey para el Factor B (tipo de especie vegetal) en los días 3, 5 y 7.....	109
Tabla 52 Análisis de separación de medias con prueba de Tukey para la interacción entre el Factor A (tipos de Kombucha) y Factor B (tipo de especie vegetal) en los días 3, 5 y 7....	112
Tabla 53 Pruebas microbiológicas e identificación microbiana de los distintos microorganismos	116

Índice de Figura

Figura 1 Modelo gráfico de una muestra de té de Kombucha.....	35
Figura 2 Principales géneros de Bacterias ácido lácticas (BAL)	43
Figura 3 Ubicación geográfica donde se realizó la investigación	60
Figura 4 Gráfica del análisis de varianza de los parámetros físico-químicos pH (A), Acidez (B) Grados Brix (C) correspondiente al día 3 en el Factor A (tipo de Kombucha).....	84
Figura 5 Gráfica del análisis de varianza de los parámetros físico-químicos pH (A), Acidez (B) Grados Brix (C) correspondiente al día 3 en el Factor A (tipo de Kombucha).....	86

Figura 6 Representación gráfica del análisis A pH, B Acidez y C grados Brix correspondiente al día 7 en el Factor A (tipo de Kombucha)	87
Figura 7 Gráfica del análisis de varianza de las parámetros físico-químicos pH (A), Acidez (B) Grados Brix (C) correspondiente al día 3 en el Factor B (tipo de especie vegetal)	89
Figura 8 Gráfica del análisis de varianza de las parámetros físico-químicos pH (A), Acidez (B) Grados Brix (C) correspondiente al día 5 en el Factor B (tipo de especies vegetales)...	91
Figura 9 Gráfica del análisis de varianza de las parámetros físico-químicos pH (A), Acidez (B) Grados Brix (C) correspondiente al día 7 en el Factor B (especies vegetales)	92
Figura 10 Gráfica del análisis de varianza de los parámetros físico-químicos pH (A), Acidez (B) Grados Brix (C) correspondiente al día 3 en la Interacción del Factor A (Tipo de Kombucha) Factor B (tipo de especie vegetal)	94
Figura 11 Gráfica del análisis de varianza de los parámetros físico-químicos pH (A), Acidez (B) Grados Brix (C) correspondiente al día 5 en la Interacción del Factor A (Tipo de Kombucha) Factor B (tipo de especie vegetal)	95
Figura 12 Gráfica del análisis de varianza de los parámetros físico-químicos pH (A), Acidez (B) Grados Brix (C) correspondiente al día 7 en la Interacción del Factor A (Tipo de Kombucha) Factor B (Tipo de especie vegetal)	97
Figura 13 Gráfico de sedimentación	100
Figura 14 Gráfico de componentes principales	100
Figura 15 Gráfica del análisis de varianza para las UFC de bacterias aerobias (A), mohos y levaduras (B) en el día 3, bacterias aerobias (C) del día 5 correspondiente al Factor A (tipo de Kombucha)	107
Figura 16 Gráfica del análisis de varianza para las UFC de mohos y levaduras (A) en el día 5, bacterias aerobias (B), mohos y levaduras (C) en el día 7 correspondiente al Factor A (tipo de Kombucha)	108
Figura 17 Gráfica del análisis de varianza para las UFC de bacterias aerobias (A), mohos y levaduras (B) en el día 3, bacterias aerobias (C) del día 5 correspondiente al Factor B (tipo de especie vegetal).....	110

Figura 18 Gráfica del análisis de varianza para las UFC de mohos y levaduras (A) en el día 5, bacterias aerobias (B), mohos y levaduras (C) en el día 7 correspondiente al Factor B (tipo de especie vegetal)..... 111

Figura 19 Gráfica del análisis de varianza con prueba de Tukey para las UFC de bacterias aerobias (A), mohos y levaduras (B) en el día 3, bacterias aerobias (C) del día 5 correspondiente a la interacción entre Factor A (tipo de Kombucha) y Factor B (tipo de especie vegetal) 113

Figura 20 Gráfica del análisis de varianza con prueba de Tukey para las UFC de mohos y levaduras en el día 5 (A), bacterias aerobias en el día 7 (B), mohos y levaduras en el día 7 (C), correspondiente a la interacción entre Factor A (tipo de Kombucha) y Factor B (Tipo de especie vegetal). 114

Resumen

El presente estudio se desarrolló con el objetivo de evidenciar si existe la presencia o no de bacterias ácido lácticas en los tipos de Kombucha (SCOBY) empleados, para ello se empleó diferentes tipos de especie vegetales como el té negro y té de guayusa para su desarrollo. Para aislar los diferentes microorganismo se fermento durante 72, 120 y 168 horas hasta obtener así una biopelícula de SCOBY la misma que fue raspada con asas biológicas para proceder a ser cultivadas en medio MRS agar por el método de siembra por estría, obteniendo así colonias aisladas las mismas que no fueron bacterias acido lácticas puesto que como se ha evidenciado en el mismo estudio los SCOBY presentan la mayor cantidad de levaduras por ello y comprobar la evidencia de las bacterias acido lácticas se realizó pruebas en petrifilm para bacterias aerobias como mohos y levaduras de la bebida obtenida obteniendo así resultados favorables en los días de fermentación ya mencionados por lo cual al existir la presencia de bacterias aerobias en mayor cantidad en los días 72 y 120 se hace mención que la presencia de bacterias ácido lácticas están presentes en la bebida obtenida mas no las biopelículas que generaron los tipos de kombucha, en el caso de mohos y levaduras existió presencia en todos los días de fermentación pero su mayor presencia fue a las 168 horas. El diseño experimental a manejarse consto de un bifactorial para parámetros físico químicos como a las unidades formadoras de colonias (UFC) (Tipo de Kombucha 1 y tipo 2; Especie vegetal de té negro y té de guayusa) que consistió en 4 tratamientos con 5 repeticiones para parámetros físico químicos y 3 repeticiones para UFC; se utilizó la prueba de tukey al 5% para diferenciar las medias.

Palabras clave: Kombucha, SCOBY, especies vegetales, levaduras, bacterias.

Abstract

The present study was developed with the objective of demonstrating whether or not there is the presence of lactic acid bacteria in the types of Kombucha (SCOBY) used, for which different types of plant species such as black tea and guayusa tea were used for their development. To isolate the different microorganisms, they were fermented for 72, 120 and 168 hours until a SCOBY biofilm was obtained, which was scraped with biological loops to proceed to be cultivated in MRS agar medium by the streak seeding method, Thus, isolated colonies were obtained, which were not lactic acid bacteria since, as evidenced in the same study, SCOBY have the highest amount of yeasts, therefore, and to verify the evidence of lactic acid bacteria, tests were performed in petrifilm for aerobic bacteria such as molds and yeasts of the beverage obtained, thus obtaining favorable results. The presence of aerobic bacteria in greater quantities on days 72 and 120 indicates that the presence of lactic acid bacteria is present in the beverage obtained, but not the biofilms that generated the types of kombucha, In the case of molds and yeasts, they were present on all days of fermentation, but their greatest presence was at 168 hours. The experimental design to be used consisted of a bifactorial design for physical-chemical parameters such as colony forming units (CFU) (Kombucha type 1 and type 2; black tea plant species and guayusa tea) that consisted of 4 treatments with 5 replicates for physical-chemical parameters and 3 replicates for CFU; the 5% Tukey test was used to differentiate the means.

Key words: Kombucha, SCOBY, plant species, yeast, bacteria.

Capítulo I

Introducción

Las bebidas fermentadas datan su origen desde los sumerios, debido a su primer hallazgo fermentando los cereales que producían, observando que contaban con sabores y aromas característicos (Muñoz, 2021).

Es desde entonces que este tipo de bebidas tienen un gran consumo a nivel mundial, ya que provienen de la fermentación de frutas o especies vegetales que proporcionan aromas y sabores particulares, siendo claros ejemplos de ello: la cerveza, el vino, la sidra, el sake y la Kombucha, la cual es una bebida fermentada y probiótica con grandes propiedades benéficas.

La Kombucha es una bebida originaria del continente asiático, la cual fue descubierta por el médico Kombu en la ciudad de Manchuria quien llevó el té a Japón con el fin de ayudar aliviar los problemas digestivos del emperador Inkyo, dándose a conocer por las propiedades desintoxicantes, probióticas y energizantes con las que cuenta (Coelho et al., 2020).

Además, la Kombucha se caracteriza porque a más de generar una bebida fermentada desarrolla una biopelícula de celulosa que se forma en el proceso de fermentación del cultivo simbiótico, la cual tiene gran interés en diversas áreas como tecnologías alimentarias, biotecnología ambiental y en el área textil ya que es empleada como cuero o para la preparación de biomateriales (Laavanya et al., 2021).

Es preciso mencionar que esta bebida fermentada cuenta en su composición con ácidos orgánicos, vitaminas del complejo B, polifenoles, etanol, enzimas, proteínas, mismos que proporcionan acciones antioxidantes,

antihipercolesterolémico, antimicrobiano, antiinflamatorio y anticancerígeno (Abaci et al., 2022).

Por otra parte, la Kombucha al ser un consorcio microbiano cuenta con diversos microorganismos, entre los cuales destacan bacterias como *Acetobacter acetii*, *A. estunensis*, *A. pasteurianus*, *Gluconobacter oxydans*, *Komagataeibacter kombuchae*, *Lactobacillus sp.* y levaduras como *Saccharomyces*, *Brettanomyces*, *Dekkera*, *Pichia sp.*, *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulopsis* (Abaci et al., 2022).

Respecto a la preparación de té de Kombucha, se realiza infusiones de especies vegetales como el té negro, té verde, té oolong, entre otras, con la adición de un sustrato que puede ser sacarosa la cual permitirá realizar el proceso de fermentación al cultivo simbiótico de bacterias y levaduras que posee la Kombucha por un período de 7 días aproximadamente (Laavanya et al., 2021).

El té negro es de las especies más empleadas para la obtención de té de Kombucha, gracias a su composición de proteínas, aminoácidos, cafeína, carbohidratos, teaflavinas, minerales (Merchan & Tigre, 2019), aceites esenciales y vitaminas, todos estos componentes proporcionan propiedades digestivas, antioxidantes y anticancerígenas (Supliquicha, 2017).

Al igual que el té negro la guayusa cuenta con componentes como es la cafeína, antioxidantes, vitaminas, minerales y otros como la teobromina, taninos, flavonoides, aminoácidos, los cuales contribuyen a prevenir el envejecimiento prematuro, reducir la presión arterial alta, reducir el estrés y disminuir la fatiga mental y física (Granda & Estupiñan, 2019).

Es por ello, que en la presente investigación se pretende aislar y caracterizar los microorganismos que posee la Kombucha desarrollada a partir de té negro y

guayusa con azúcar como sustratos principales para su formación, con el fin de determinar las características fisicoquímicas que posee cada Kombucha.

Objetivos

Objetivo general

Aislar y caracterizar bacterias ácido lácticas en dos variedades de SCOBY de Kombucha (*Medusomyces gisevi*) desarrollados a partir de té de dos especies vegetales, té negro (*Camellia sinensis*) y guayusa (*Ilex guayusa*), para su aplicación como agente antimicrobiano.

Objetivos específicos

- Aislar microorganismos presentes en las dos variedades de SCOBY de Kombucha (*Medusomyces gisevi*) desarrolladas a partir de té negro (*Camellia sinensis*) y guayusa (*Ilex guayusa*).
- Identificar y caracterizar microorganismos presentes en la Kombucha (*Medusomyces gisevi*) a partir de té negro (*Camellia sinensis*) y guayusa (*Ilex guayusa*).
- Evaluar la actividad microbiana de las bacterias ácido lácticas obtenidas en el SCOBY de Kombucha frente a microorganismo.
- Observar el crecimiento de distintos microorganismos mediante pruebas de detección conocidas como petrifilm para bacterias aerobias, mohos y levaduras.

Hipótesis

Hipótesis nula

Ho: No existe presencia de bacterias ácido lácticas en SCOBY de Kombucha.

Ho: No hay inhibición de microorganismos patógenos.

Ho: No existe presencia de bacterias aerobias.

Ho: No existe presencia de mohos y levaduras.

Hipótesis alternativa

Ha: Si existe presencia de bacterias ácido lácticas en SCOBY de Kombucha.

Ha: Hay inhibición de microorganismos patógenos.

Ha: Si hay presencia de bacterias aerobias.

Ha: Si hay presencia de mohos y levaduras.

Capítulo II

Revisión literaria

Kombucha

La “Kombucha” tiene su origen hace más de 3000 años en la antigua China, específicamente de la región de Manchuria, en donde se difundió a Japón donde se utilizó para fines medicinales. La historia hace referencia a que la Kombucha pudo haberse creado naturalmente vasijas de agua con algún suministro de azúcar otorgado por frutas y taninos dados por infusión de hojas (Montero et al., 2021).

Existe una leyenda del año 212 a.C., el emperador de Japón se encontraba demasiado enfermo, llamaron al Doctor Kombu que viajó desde China con un brebaje medicinal el cual sano al emperador, la bebida fue difundida inmediatamente por el imperio (Montero et al., 2021).

Tanto en China como Japón se hizo costumbre familiar entregar a los novios un cultivo nuevo de Kombucha, y así la mujer se encargaba de mantener y reproducir el cultivo durante todo su matrimonio para después heredarlo a su hija (Vargas, 2013).

De Japón se extendió a Rusia y Europa Oriental a principio del siglo XIX, obteniendo popularidad durante la Segunda Guerra Mundial (Vargas, 2013). Posteriormente, a principios del siglo pasado se conoció en las sociedades occidentales, el resto de Europa, Estados Unidos, África y Latino América (Batista et al., 2022).

Según Vargas (2013); ninguna “Kombucha” es nueva o recién nacida, sino que proviene de un cultivo madre, y este puede tener miles de años de antigüedad. Debido a su expansión por diferentes países del mundo se la conoce con varios

nombres. La forma alemana del nombre en japonés e internacionalmente conocida es: “Kombucha”, Combuca, Komboocha; en países de habla inglesa conocido como: Mushroom-tea, Manchurian mushroom y en Rusia, tea-kwass, teakvass, kargasok.

En la actualidad, Estados Unidos es el país que más ha desarrollado a nivel productivo y de investigación la Kombucha que son moderados en cuanto a estándares de calidad por el comité “Kombucha Brewers International” (Montero et al., 2021).

Sin embargo, en algunas zonas de América del Sur como Chile fue popularizada por los colonos alemanes, en la actualidad las religiones Hinduistas se caracterizan por ofrecer la bebida en sus festivales (Montero et al., 2021). Mientras que en Ecuador la bebida se popularizó en el año 2015 y ha sido comercializada como alternativa de medicina no tradicional, ofreciendo a los consumidores una variedad de sabores (Prado, 2018).

¿Qué es la Kombucha?

La Kombucha es una bebida refrescante producto de la fermentación de un té azucarado y la relación simbiótica entre bacterias y levaduras (Dufresne & Farnworth, 2000; Vargas, 2013). Suele ser una bebida con bajo o nulo contenido alcohólico, ligeramente ácida y en algunas presentaciones comerciales viene carbonatada (Batista et al., 2022).

Usualmente, las personas designan a la Kombucha como la fermentación de un hongo por el disco gelatinoso flotante que se extiende en la superficie del té (Vargas, 2013). Sin embargo, esto es erróneo porque en realidad es un consorcio simbiótico entre bacterias y levaduras conocido como SCOBY, el cual se fermenta en un té dulce durante 7-21 días (Batista et al., 2022).

¿Qué es el SCOBY?

El SCOBY como lo traducen sus siglas en inglés (Symbiotic Colony of Bacteria and Yeast) es una colonia o cultivo simbiótico de bacterias y levaduras (Torán-Pereg et al., 2021). La formación del SCOBY surge durante el proceso de fermentación en donde la *Acetobacter xylinum* produce un biofilm a partir de la sacarosa en donde otras bacterias y levaduras se adhieren formando el característico disco gelatinoso de la Kombucha (Malbaša et al., 2011).

Estudios han revelado que el SCOBY procesado con técnicas culinarias pueden ser de agrado para el consumidor usándolo para la elaboración de comestibles con valor gastronómico y de esta manera reducir los desperdicios que se generan durante la preparación de la Kombucha (Torán-Pereg et al., 2021).

Composición química

La Kombucha está conformada por el SCOBY madre y el té de *Camellia sinensis* que pueden ser de las hojas de té negro y té verde (Moya, 2020).

Figura 1

Modelo gráfico de una muestra de té de Kombucha



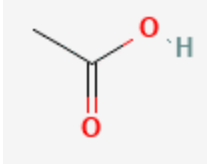
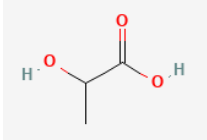
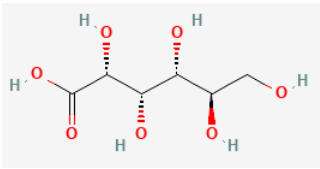
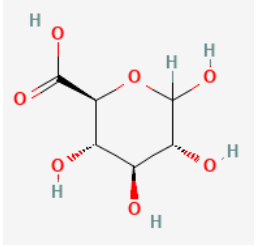
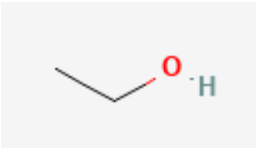
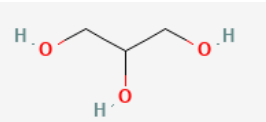
Elaborado por: Autoras

Recuperado de: (Moya, 2020).

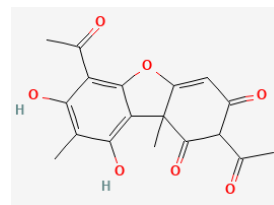
La composición y concentración química dependen del tiempo, las condiciones, microorganismos y del tipo de té que se usen para llevar a cabo la fermentación del SCOBY (Dufresne & Farnworth, 2000).

Tabla 1

Principales ácidos orgánicos identificados en la Kombucha

Nombre del compuesto	Fórmula molecular	Estructura molecular
Ácido acético	CH_3COOH	
Ácido láctico	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$	
Ácido glucónico	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_7$	
Ácido glucurónico	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7$	
Etanol	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	
Glicerol	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	

Ácido úsnico

 $C_{18}H_{16}O_7$ 

Autoras **Recuperado de:** (Dufresne & Farnworth, 2000).

Batista et al. (2022); sugiere que mientras más tiempo de fermentación aumentan las cantidades de compuestos bioactivos beneficiosos para la salud humana como: polifenoles; azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa); vitaminas (C, B₁, B₂, B₆, B₁₂); minerales esenciales como hierro (Fe), manganeso (Mn), Zinc (Zn), cobre (Cu) y níquel (Ni), plomo (Pb), cobalto (Co), cromo (Cr), cloruro, bromuro, yoduro, fosfato, sulfato y ácidos orgánicos (Tabla 1) provenientes del SCOBY (Batista et al., 2022). No obstante, algunos microorganismos con función probiótica también son relevantes en cuanto a la producción ciertos compuestos químicos presentes en la Kombucha (Batista et al., 2022).

La composición química de la Kombucha con respecto al tipo de té ha indicado una diferencia entre los componentes químicos de té verde y té negro usados para su elaboración, sin embargo, en ambas predominan los polifenoles, causantes del sabor amargo, astringente y dulce (Dufresne & Farnworth, 2000). También, se han detectado alrededor de 127 compuestos fenólicos entre ellos flavonoides, teaflavinas, tearugibinas responsables de proporcionar la capacidad antioxidante del té (Cardoso et al., 2020).

En un estudio se hizo una comparación de los componentes químicos entre el té verde y negro de Kombucha que reveló la concentración más baja de sacarosa y así mismo la concentración más alta de ácido glucorónico se produce en el té verde de Kombucha, explicando la acidez del mismo (Cardoso et al., 2020).

Tabla 2

Compuestos fenólicos presentes con mayor abundancia en Kombucha de té verde y negro

Nombre del compuesto	Fórmula molecular	Clase
Galocatequina 3-O-galato/Epigalocatequina 3-O-galato	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	F
Isómero de galocatequina 2/Epigalocatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	F
Catequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	F
Ácido 5-O-galoilquínico	C ₁₄ H ₁₆ O ₁₀	AF
Isómero 2 de quercetina 3-O-ramnosil-ramnosil-glucósido	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	F
Isómero 1 de quercetina 3-O-glucosil-ramnosil-galactósido	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	F
Ácido 3-[2-(carboximetil)-3-4-dihidroxifenil]prop-2-enoico	C ₁₁ H ₁₀ O ₆	AF
Catequina 3-O-galato	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	F
Isómero 2 del ácido 4-cumaroilquínico	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	AF
Catequina 5-O-galato	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	F
Isómero del ácido 1-O-cafeoilquínico ácido 2/3-cafeoilquínico	C ₁₄ H ₁₆ O ₁₀	AF
Teaflavina	C ₂₉ H ₂₄ O ₁₂	P/BF
Tearubiginas	C ₄₃ H ₃₄ O ₂₂	P

Nota: AF: Ácido fenólico, F: Flavonoide, BF: Biflavonoide, P: Polifenol.

Elaborado por: Autoras

Recuperado de: (Cardoso et al., 2020).

Tabla 3

Otros compuestos químicos presentes en la Kombucha

Nombre del compuesto	Fórmula molecular
Estilbenos	
Piceatannol	C ₁₄ H ₁₂ O ₄
Lignanos	
Gomisina M2	C ₂₂ H ₂₆ O ₆
Isómero 1 medioresinol	C ₂₁ H ₂₄ O ₇
Isómero 2 medioresinol	C ₂₁ H ₂₄ O ₇
Otros polifenoles	
Isómero 1 juglona	C ₁₀ H ₆ O ₃
Isómero 2 juglona	C ₁₀ H ₆ O ₃
Florina	C ₁₂ H ₁₆ O ₈
Esculina	C ₁₅ H ₁₆ O ₉
Ligstroside	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₂
Isómero 1 de cumarina	C ₉ H ₆ O ₂
Isómero 2 de cumarina	C ₉ H ₆ O ₂
Ácido litospérmico	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂
Oliuperina	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃
Urolitina	C ₁₃ H ₈ O ₄
Escopoletina	C ₁₀ H ₈ O ₄

Elaborado por: Autoras **Recuperado de:** (Cardoso et al., 2020).

Por otra, a pesar de ser una bebida no alcohólica se han registrado valores superiores al límite legal de 0,5% (v/v) para clasificarla como una bebida no

alcohólica (Cardoso et al., 2020), por ejemplo, Talebi et al. (2017); registro valores de 2% y 1,12% (v/v) en muestras de Kombuchas comerciales.

Tabla 4

Contenido alcohólico en g/L de la Kombucha según investigaciones

Té negro	Té verde	Referencia
4,90	7,29	(Cardoso et al., 2020)

Elaborado por: Autoras

Propiedades físico-químicas

Según investigaciones las propiedades organolépticas y físico-químicas (pH, acidez, sólidos totales) de la Kombucha dependen del endulzante más no de la concentración del té (Moya, 2020 ; Vargas, 2013).

El pH óptimo de la Kombucha debe estar entre 3,5 y 4,5 debido a la presencia de ácido acético y proteínas; gracias a esto se le confiere a la Kombucha propiedades antimicrobianas. Los valores más bajos de pH se podrían deber a una mayor concentración de ácidos orgánicos producto de la fermentación por bacterias y levaduras (Amarasinghe et al., 2018).

Composición Microbiana

La composición microbiana de la Kombucha es variada dependiendo del origen, condiciones ambientales, ubicación geográfica y el medio de fermentación (Torán-Pereg et al., 2021). Según Cardoso et al. (2020); los mayores recuentos microbianos en investigaciones pueden deberse a varios factores como las cantidades de azúcar, el tipo de té y la cantidad de SCOBY utilizados en la preparación de la Kombucha.

Entre las principales clasificaciones de microorganismos tenemos bacterias acéticas, lácticas, mesófilas y levaduras (Cardoso et al., 2020).

Levaduras

Tabla 5

Levaduras encontradas en la Kombucha

Género	Especie
Zygosaccharomyces	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> <i>Zygosaccharomyces spp.</i>
Saccharomycodes	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>
Candida	<i>Candida stellata</i>
Torulaspota	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
Pichia	
Brettanomyces	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>
Schizosaccharomyces	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Saccharomyces	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Elaborado por: Autoras

Recuperado de: (Cuamatzin et al., 2022 ; Torán-Pereg et al., 2021).

Bacterias ácido acéticas (BAA)

Tabla 6

Bacterias Ácido Acéticas (BAA) encontradas en la Kombucha

Género	Especie
<i>Komagataeibacter</i>	<i>Komagataeibacter intermedius</i>

Komagataeibacter xylinus

Komagataeibacter rhaeticus

Komagataeibacter saccharivorans

Komagataeibacter kombuchae

Acetobacter

Acetobacter pasteurianus, *Acetobacter*

xylinum

Acetobacter aceti

Elaborado por: Autoras

Recuperado de: (Andreson et al., 2022 ; Cuamatzin et al., 2022)

Acetobacter xylinum se caracteriza por la formación de biofilm de celulosa extracelular durante la fermentación a partir de la sacarosa (Andreson et al., 2022).

Bacterias ácido lácticas (BAL)

Antes de hablar de las bacterias ácido lácticas (BAL) en la composición simbiótica de la Kombucha se debe conocer que pertenecen al grupo de bacterias grampositivas, que no forman esporas, cocos o bacilos, son catalasas negativas con alta resistencia a pH bajo y su principal producto hace honor a su nombre “ácido láctico” (Mokoena, 2017). Además, son de las bacterias con mayor reconocimiento en el área industrial por su uso en la fermentación de alimentos y mejora de las propiedades organolépticas y nutricionales ciertos productos (Gorbach, 1990 ; Mokoena, 2017).

Varias investigaciones han documentado la capacidad de BAL para inhibir el crecimiento de agentes patógenos (c. antimicrobiana), degradación de micotoxinas y su capacidad probiótica (Mokoena, 2017).

Existe relación simbiótica entre los microorganismos de la Kombucha y son responsables del metabolismo de la glucosa a xilosa, ácido acético y otros metabolitos (Yang et al., 2010).

Tabla 7

Bacterias Ácido Lácticas (BAL) encontradas en la Kombucha

Nombre de la especie bacteriana
<i>Lactobacillus</i>
<i>Leuconostoc</i>
<i>Bifidubacterium</i>

Elaborado por: Autoras

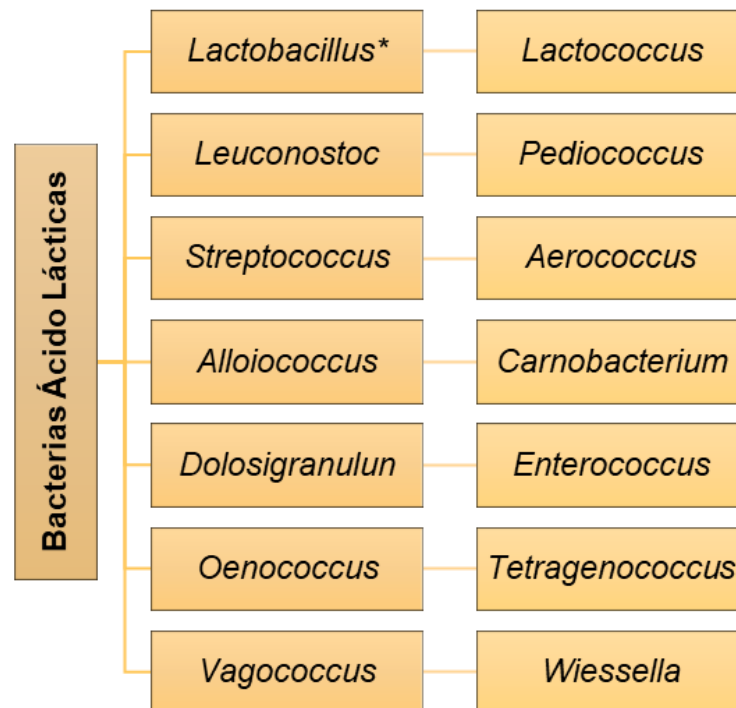
Clasificación-tipos

Las bacterias ácido lácticas se encuentran en una variedad de alimentos de origen animal (lácteos, carnes, pescado), vegetal, frutas en descomposición, fermentados, agua y en cavidades humanas (Mokoena, 2017). En el humano es de conocimiento general que estos microorganismos abundan en la vagina (Todorov, 2009).

Según Mokoena (2017), la clasificación de BAL se basa en la morfología celular, modos de fermentación de la glucosa, rango de temperatura de crecimiento entre otros. Los principales géneros de BAL se los puede observar en la Figura 2.

Figura 2

Principales géneros de Bacterias ácido lácticas (BAL)



Elaborado por: Autoras Recuperado de : (Cardoso et al., 2020).

Propiedades Conservantes

Las propiedades conservantes de la Kombucha se deben a su actividad antimicrobiana, esto debido a la microbiota del cual está constituido y por el bajo pH debido a la presencia de metabolitos que reducen la competencia de otras bacterias, levaduras y hongos (Mo et al., 2008). Las BAL tiene que ver en gran parte con las actividades antimicrobianas ya que gracias a que producen no solo ácido láctico sino otros metabolitos como peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, estas últimas se han aislado y caracterizado con posibles aplicaciones en la conservación de alimentos a nivel industrial (Mokoena, 2017).

Tipos de fermentaciones

Las bacterias ácido lácticas (BAL) tienen dos tipos de fermentación homofermentativa y heterofermentativa, la primera se diferencia solo por la

producción de ácido láctico y la segunda la producción de ácido láctico y otros metabolitos (Parra, 2010).

Homofermentación

Las bacterias ácido lácticas homofermentativas descomponen las hexosas por medio de la glucólisis, dando como producto final ácido láctico (Zúñiga et al., 1993).

Heterofermentación

En cuanto a las bacterias heterofermentativas usan la ruta pentosa-fosfato dando como productos finales ácido láctico, dióxido de carbono, ácido acético y etanol dependiendo de la especie y las condiciones de crecimiento pueden generarse otros productos (Zúñiga et al., 1993).

Beneficios a favor de la salud

Se sabe que las bebidas y alimentos fermentados actúan en el cuerpo humano gracias a la presencia de microorganismos y la capacidad de estos para transformar las materias primas de animales y vegetales en elementos químicos (Cuamatzin et al., 2022).

En general, durante la fermentación de alimentos existe una mejora de todas sus propiedades nutricionales y por ende de sus beneficios para la salud, mediante el aumento de la biodisponibilidad de nutrientes y la estimulación de funciones probióticas y prebióticas (Cuamatzin et al., 2022).

Algunas investigaciones *in vitro* o *in vivo* en animales sugieren que la Kombucha posee propiedades antioxidantes; potenciador energético; mejorar el sistema inmune, el metabolismo hepático y las funciones gastrointestinales;

actividad antiinflamatoria; antibacteriana; antidiabética; anticancerígena (Batista et al., 2022). Otros beneficios reportados por la ingesta de este tipo de alimentos son: desintoxicación de la sangre; reducción de los niveles de colesterol, estrés, insomnio; regula el equilibrio de la flora intestinal; disminuye trastornos menstruales y menopausia, la aterosclerosis, diabetes; cura la hemorroides; reduce la presión arterial; elimina cálculos de los riñones; previene infecciones de vejiga; regula el apetito, la obesidad; mejora la eliminación de residuos del cuerpo; entre otros (Moya, 2020).

Té negro

El té negro proviene de una especie vegetal conocida como *Camellia sinensis* perteneciente al género de las camellias, la cual es ampliamente empleada para el desarrollo de infusiones, bebidas frías, medicamentos, aceites, entre otros (Supliguicha, 2017).

Camellia sinensis o té corresponde a un árbol o arbusto que puede llegar alcanzar una altura de 10 metros, esta especie vegetal tiene un proceso de reproducción por semillas con un proceso de fertilidad de seis meses, a lo cual se tiene presente que para un buen desarrollo precisa de climas cálidos y húmedos con suelos ácidos (López, 2002). Es por ello, que precisa de una humedad del 70% a 90%, un nivel de acidez que se encuentre en un rango de pH 4.5 a 5.5 y procesos de lluvia que se encuentren entre 1800 mm a 2200 mm (Supliguicha, 2017).

Este árbol pertenece a la familia de las *Theaceae* el cual consta con hojas de 12 cm de longitud, tiene flores de color blanco las cuelgan en peciolos de corto tamaño, pero las cuales cuentan con un aroma muy característico y fuerte, por otra parte, es a partir del desarrollo de las flores que se forman frutos capsulares que tienen en su interior de una a tres semillas de coloración negra (Rodrigo, 2019).

Por lo general los frutos de esta especie vegetal tienden a ser desechados, pero en varias ocasiones los emplean para la extracción de aceites esenciales gracias a los metabolitos con los que cuentan, permitiendo de tal manera emplear a dicho producto en perfumes, aromatizantes o en medicamentos gracias a las grandes propiedades antioxidantes con las que cuenta (Rodrigo, 2019).

Cabe mencionar que este árbol puede llegar a tener una vida útil de entre 25 a 30 años y para tener una madurez reproductiva tiene que llegar de 3 a 5 años, debido a esto y al considerarse que el proceso de producción de esta especie que es monocultivo, realizan procesos de intercalado con el objetivo de realizar procesos de reinicio de ciclos reproductivos y así también alternando con la siembra de otras especies vegetales con el fin de poder tener mejor manejo en los suelos y no crear tanto impacto (Supliguicha, 2017).

Origen

Es conocido por el gran consumo que tiene a nivel mundial, teniendo mayor acogida en el continente asiático, a nivel de China que es de donde proviene y donde se ha empleado desde tiempos ancestrales por sus grandes propiedades con el organismo.

Su primer hallazgo fue realizado por el príncipe Shennong, el cual se encontraba haciendo un proceso de peregrinaje en una provincia occidental de China, donde se detuvo un momento a tomar agua tibia y a descansar, después de su lapso de descanso continuó tomando más agua de su tazón sin percatarse que en el interior de este se encontraban hojas del árbol en el que se encontraba reposando (Supliguicha, 2017).

Fue en dicho momento que se percató que su agua tenía otro sabor y por tanto procedió a observar que tenía en su interior, notando de tal manera que eran

hojas del árbol donde se encontraba guardando reposo y a su vez, evidenció que esta mezcla le proporcionó energía con lo cual pudo seguir su trayecto (Supliguicha, 2017).

Es de tal manera que se conoció a esta especie vegetal, sugiriendo que su aparición data hace 2737 a.C. (Supliguicha, 2017), desde aquella época hasta la actualidad se le ha dado un gran empleo y consumo de esta, ya que las infusiones de las hojas de té proporcionan una bebida con un gran sabor y con propiedades medicinales características.

Tipos de té a partir de té verde

Existen varios tipos de té y varían de acuerdo al tipo de elaboración o procesamiento que realicen para su obtención, ya que todos provienen del té verde o *Camellia sinensis*, a continuación, se establecen algunos tipos de té:

Té negro

En este tipo de té existen a su vez dos subtipos conocidos como té negro ortodoxos, los cuales corresponden a té elaborados de manera artesanal y manual con la implementación de pocas máquinas, por otra parte, respecto a la parte sensorial y organoléptica de este tipo de tés se caracterizan por tener un gran aroma con gran intensidad a nivel de sabor, mientras que el té negro cut, tear y curl también denominados CTC se caracteriza por tener un sabor con gran intensidad y astringencia (Supliguicha, 2017).

Té blanco

Se obtiene de brotes jóvenes que se encuentran recubiertos por una capa blanquecina, en la cual se encuentra una gran concentración de nutrientes, propiedades antioxidantes y una menor cantidad de cafeína, así también, este tipo

de té se caracterizan por ser uno de los más caros, apetecidos y por tener grandes propiedades nutricionales (Supliguicha, 2017).

Además, es preciso mencionar que su producción tiene un proceso muy controlado para que los brotes no se malogren y se puedan secar a exposición solar y aire ambiental para evaporación del contenido de agua que poseen dichos brotes (Supliguicha, 2017).

Té Pu-erh

Corresponde a un té desarrollado por procesos específicos que son desconocidos al público, pero el cual tiene un proceso de secado por un tiempo prolongado, lo cual influye para la obtención de su sabor y aroma característico. Es importante mencionar que este tipo de té solo es producido en China y sus características particulares respecto al tema de salud es que permite la pérdida de peso, ayuda al sistema inmunológico y desintoxica el organismo (Supliguicha, 2017).

Té verde

Es la especie vegetal sin procesos de fermentación particulares sino más bien su proceso de obtención consiste en secar y aplicar calor posterior a la recolección de las hojas con el fin de que no tenga procesos de descomposición, así también evitando que haya pérdida de metabolitos secundarios importantes como son los aceites esenciales y antioxidantes (Supliguicha, 2017).

Este tipo de té resaltan por tener un sabor más suave en comparación a los otros tipos de té además de poseer un gran contenido de vitamina C y ser ampliamente empleado por su capacidad preventiva ante cáncer y enfermedades hepáticas y cardíacas (Supliguicha, 2017).

Té Oolong

Su proceso de obtención consiste en fermentar hasta un 75% del proceso general que se realiza para obtener el té negro, por otra parte, tiene un aroma más floral, dulce y tostado; también al igual que los otros tipos de té tiene la capacidad de la reducción de colesterol y la regulación del sistema circulatorio (Supliguicha, 2017).

Taxonomía

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Ericales

Familia: Theaceae

Tribu: Theeae

Género: *Camellia*

Especie: *Camellia sinensis* (L.)

Recuperado de: (Rodrigo, 2019).

Composición química del té

El té consta con compuestos como cafeína, polifenoles, alcaloides, teobromina, teofilina, así también carbohidratos, proteína, clorofila, aminoácidos, compuestos orgánicos volátiles que son los causantes del olor o aroma característico (Fiallos, 2021).

Esto se debe a la consecuencia del contacto entre los polifenoles oxidasas con los flavonoides en el proceso de enrollado de las hojas, a más de ello el aroma y sabor característico los proporcionan las tearubiginas y teaflavinas, además respecto a la oxidación con la que cuenta el té negro se debe principalmente a los ácidos fenólicos así también como a los glucósidos (Merchan & Tigre, 2019).

Los polifenoles que contiene esta especie vegetal tienden a ser susceptibles de procesos de oxidación enzimática, lo cual conlleva a que se de transformación de las catequinas a compuestos poliméricos como son teaflavinas y tearubiginas, lo cual permite explicar lo antes mencionado acerca del aroma y sabor característico del té negro (Pinto et al., 2020).

Por otra parte, es preciso mencionar que los polifenoles que contiene el té negro tiene una gran interacción con proteínas que tienen un buen contenido de prolina, ejemplo de ello son extractos de levaduras, caseína y componentes con gran contenido de aminoácidos (Merchan & Tigre, 2019).

Y respecto al contenido de catequina, el té negro tiene un 20 a 30% dichos valores son inferiores respecto al té verde debido a que se genera dicha reducción por los procesos de calor que se aplica a las hojas de té para la obtención del tipo de deseado (Merchan & Tigre, 2019).

Cabe recalcar que el té negro está compuesto de otros compuestos químicos, por ello según Merchan & Tigre (2019) mencionan los siguientes compuestos:

Tabla 8

Compuestos químicos del té negro

Compuestos	Obtención	Unidades
Calcio	470	(mg/100 g)

Hierro	17,40	(mg/100 g)
Fósforo	320	(mg/100 g)
Potasio	2000	(mg/100 g)
Sodio	3	(mg/100 g)
Vitamina A	900	
Vitamina B1	0,10	
Vitamina B2	0,80	
Niacina	10	(mg/100 g)
Cafeína	3,51	%
Aminoácidos	1	%
Proteínas	20,60	%
Carbohidratos	32,10	%
Lípidos	2,50	%
Polifenoles totales	20	%
Humedad	6	%
Tearubiginas	8,02	%
Teaflavinas	0,78	%
Sustancias altamente polimerizadas	11,19	%
Acido gálico	0,15	%
Catequina	0,18	%
Epigalato de catequina	0,57	%
Galato epicalocatequina	2,86	%
Galato de epicatequina	0,30	%

Elaborado por: Autoras

Recuperado de: (Merchan & Tigre, 2019).

Aporte nutricional

Las infusiones de té negro cuentan con una composición nutricional establecida con minerales, fibra dietética, contenido fenólico total, vitaminas solubles en agua, fenoles condensados, ácidos fenólicos, flavanoles, alcaloides y carotenoides, azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos libres (Alasalvar et al., 2013).

De acuerdo a Alasalvar et al. (2013), mencionan que el té negro tanto de baja calidad como de alta calidad consta con valores que se establecen en los rangos mencionados en la siguiente composición nutricional:

Tabla 9

Composición nutricional del té negro

Compuesto	Cantidad	Unidad
Carbohidratos	56,68-59,84	g/100g
Proteínas	19,31-19,86	g/100g
Fibra dietética	1,28-3,05	mg/100g
Calcio	73,0-130	mg/100g
Cromo	0,16-0,17	mg/100g
Cobre	0,47-0,99	mg/100g
Cobalto	0,06-0,07	mg/100g
Magnesio	179-280	mg/100g
Manganeso	151-166	mg/100g
Molibdeno	0,21-0,42	mg/100g
Fósforo	376-431	mg/100g
Potasio	3928-4625	mg/100g
Sodio	4,41-5,41	mg/100g
Zinc	1,78-2,85	mg/100g
Tiamina	0,09-0,13	mg/100g
Niacina	20,64-20,85	mg/100g
Ácido pantoténico	59,08-62,38	mg/100g
Luteína	0,51-1,24	mg/100g

Elaborado por: autoras. **Recuperado de:** (Alasalvar et al., 2013).

Propiedades fisicoquímicas

Las infusiones de té negro cuentan con un valor de pH de 5,33 debido a que este tipo de té se obtienen por procesos de fermentación completos, esto conduce a que se tenga cantidades inferiores de pH y así también un sabor no tan ácido a comparación de otros tipos de té desarrollados a partir de *Camellia sinensis* (Aguilar et al., 2019).

Por otra parte, respecto a la acidez titulable del té negro se puede mencionar que por lo general tienden a presentar valores altos que por lo general se encuentra en 10,98 g/L esto permite evidenciar que las infusiones de té negro presentan ácidos orgánicos libres, a lo cual se debe dichos valores indicadores (Aguilar et al., 2019).

Respecto a los análisis colorimétricos que se realiza a las infusiones de té negro se puede mencionar que tienen por lo general una coloración rojiza, además

respecto a la reflectancia que posee el té negro es de 400 a 630 nm, dicha longitud de onda está relacionada con el color rojo, lo cual concuerda con la coloración que posee este tipo de té (Aguilar et al., 2019).

Guayusa

Guayusa o *Ilex Guayusa* es una especie vegetal que se desarrolla en la Amazonía del Ecuador, principalmente en las provincias de Morona Santiago, Napo, Pastaza, Zamora Chinchipe y Sucumbíos, esto debido a que dicha región cuenta con un clima tropical que es propicio para su crecimiento. La temperatura promedio de esas zonas es de 24°C con una altitud que se encuentra entre los 400 a 600 msnm y precipitaciones de 4000 mm con humedad relativa del 70% (Tamayo, 2017).

Además, es una de las especies con gran acogida en la actualidad de nivel mundial por generar una bebida energética y también gracias a sus propiedades medicinales, ya que es: digestiva, emética, estimulante, estomática, tónica, hemostática, diurética, antidiarreica, depurativa (Supliguicha, 2017).

Tiene distintos usos y aplicaciones entre las más conocidas en la actualidad es en bebidas caliente o frías, baños de vapor y enjuagues bucales, además las personas nativas de la amazonia la emplean para efectuar rituales de purificación (Granda & Estupiñan, 2019).

Origen

Su origen a nivel mundial data del tiempo de los indios jíbaros donde un grupo de extranjeros se percataron que estas comunidades empleaban estas hojas en infusiones concentradas para poder estimular el organismo de tal manera que les permitan tener alucinaciones con el fin de visualizar cosas que no eran reales (Tamayo, 2017).

Esto concuerda con lo descrito por Reyes (2021), donde menciona que en una carta emitida en 1682 que describía sobre una excursión realizada por la cuenca del río Santiago , cerca del río Marañón, encontraron una zona habitada por indios Jíbaros que realizaban actividades ancestrales con uso de hierbas, donde dejaban hervir las hierbas por una hora hasta que se concentre totalmente en el agua y procedían a beber dichas aguas con el fin de ser premiados por el diablo o que les permitía tener buenos presagios (Reyes, 2021).

Así también hace a años atrás se conocía a la Guayusa como la planta que generaba la bebida energizante para proporcionar energía natural a los guerreros amazónicos para tener más agilidad en actividades de caza y recolección (Granda & Estupiñan, 2019).

Crecimiento

Las hojas de Guayusa se obtiene separarlas del árbol donde se desarrollan para proceder a colgarlas y dejar que se sequen a luz solar o en lugares que les permitan evaporar su humedad, tras este proceso para usarlas lo que se realiza es, colocar a hervir agua y se incluye por lo general cinco hojas por diez minutos a infusión para obtener una bebida caliente y concentrada (Tamayo, 2017).

Cabe señalar que el crecimiento del árbol de esta especie tiende a alcanzar los 10 metros de altura y unos 50 a 80 cm de diámetro, su tronco consta con una corteza de coloración blanca y una textura lisa con diversas ramas flexibles y extendidas. Respecto a sus hojas se puede mencionar que tienen una coloración verde oscura con forma oblonga-elíptica, dentadas, coriáceas, con ápice acuminado, las cuales alcanzan 15 a 21cm de largo con 5 a 7,5 cm de ancho y 1 cm de largo a nivel del pecíolo (Reyes, 2021).

Las flores que tiene la Guayusa son de color blanco con pétalos obtusos, estambres con varios pétalos, con ovario sésil sub globosos que por lo general tiene de 4 a 6 cavidades y su fruto es una baya de coloración verde con un tamaño de 1 cm de ancho (Reyes, 2021).

Taxonomía

Clase: Equisetopsida

Subclase: Magnoliidae

Superorden: Asteranae

Orden: Aquifoliales Senft

Familia: Aquifoliaceae Bercht

Género: Ilex L.

Especie: Ilex Guayusa Loes

Recuperado de: (Reyes, 2021).

Tipos de Guayusa

Ilex Guayusa

Son hojas con forma oblonga-elíptica de coloración verde oscura con un ancho de 5 a 7.5 cm y 15 a 21 cm de largo, las cuales son empleadas para la elaboración de bebidas estimulantes (Tamayo, 2017).

Ilex vomitoria

Corresponde a hojas de coloración verde claro, las cuales son utilizadas como emético natural, además este tipo de hojas cuenta con un largo de 1 a 4.5cm y 1 a 2 cm de ancho y una forma ovalada (Tamayo, 2017).

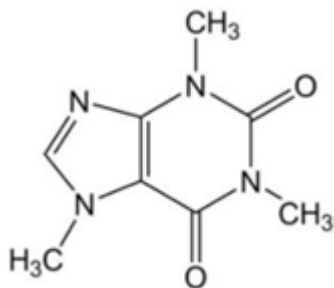
Ilex paraguariensis

Son hojas que se emplean como bebida estimulante que constan con una forma ovalada y las cuales tienen de 7 a 11cm de largo, 3 a 5.5 cm de ancho y una coloración verde oscura (Tamayo, 2017).

Composición química

La Guayusa tiene en su composición química gran contenido de cafeína que tiende a ser superior a las cantidades tanto del café como del té, esto podría explicar la característica principal de la ingesta de la bebida a partir de esta especie vegetal que es la obtención de energía, debido a que la cafeína es un alcaloide que actúa en el organismo como estimulante (Rocha, 2018).

Tiene también compuestos como es la teobromina, xantinas, esteroides, teofilina, lactonasterpénicas y terpenoides (Rocha, 2018), o compuestos que por lo general se encuentran en el té verde como es el ácido glutámico, también cuenta con ácidos clorogénicos, antioxidantes, aminoácidos en grandes concentraciones, minerales como el zinc, potasio, calcio y magnesio y vitaminas como vitamina C y D (Granda & Estupiñan, 2019).



Obtenido de: (Rocha, 2018).

A continuación, se presenta la siguiente tabla con las cantidades de los componentes químicos que posee la Guayusa, según Rocha (2018):

Tabla 10

Componentes químicos de la Guayusa

Compuesto	Cantidad	Unidad
Cafeína	3,33	%
Acido glutámico	-	
Teobromina	0,02	%
Antioxidantes	58	µM/g
Flavonoides	-	

Elaborado por: Autoras

Recuperado de: (Rocha, 2018).

A nivel fitoquímico, la Guayusa cuenta a más de la cafeína con taninos, esteroides, quinonas, derivados de catecol, aceites esenciales, triterpenos, saponinas, cuatro flavonoides, piridoxina, lactonas, riboflavina, colina, ácido nicotínico, tisanas y ácido isobutírico (Reyes, 2021).

Propiedades fisicoquímicas de la Guayusa

Según Valladares & Villa (2021), las propiedades fisicoquímicas de la Guayusa son las siguientes en base a distintos procesos de secado:

Tabla 11

Propiedades fisicoquímicas de la Guayusa

Parámetros	Secado a luz solar	Secado a temperatura ambiente	Secado a horno
Cafeína	2.98 ± 0.15%	3.02 ± 0.07%	3.71 ± 0.11%
Humedad residual	7.65 ± 0.08%	7.82 ± 0.41%	7.33 ± 0.44%
Cenizas totales	6.86 ± 0.11%	6.87 ± 0.12%	6.85 ± 0.11%

Cenizas solubles en agua	3.09 ± 2.10%	3.10 ± 2.12%	3.11 ± 2.12%
Cenizas insolubles en ácido	0.87 ± 0.06%	0.87 ± 0.07%	0.86 ± 0.03%

Elaborado por: Autoras

Recuperado de: (Valladares & Villa, 2021).

Beneficios de Ilex Guayusa

Como se ha mencionado, la Guayusa posee algunas propiedades benéficas en el organismo, por ello a continuación se mencionan otras más y enfocadas a cada acción en el organismo.

A nivel inmunológico, compuestos como son compuestos polifenólicos o las saponinas tienen la acción de proteger al organismo de enfermedades crónicas, ya que dichos compuestos previenen la inflamación y la tensión, lo cual contribuye a mejorar el sistema inmune (Granda & Estupiñan, 2019).

El té de Guayusa actúa como antioxidante, debido a los compuestos fenólicos con los que cuenta, los cuales permiten reducir el estrés oxidativo y la prevención de la acción de los radicales libres que tienden a tener gran impacto en la salud generando en diversos casos cáncer o enfermedades crónicas (Granda & Estupiñan, 2019).

A nivel digestivo el té de Guayusa permite tener una digestión más rápida y estable, ya que posee acciones antiinflamatorias, esto conduce a que también contribuya a pérdida de peso ya que induce a una mejor digestión por medio de la estimulación del metabolismo (Granda & Estupiñan, 2019).

Capítulo III

Materiales y métodos

Lugar del área de investigación

La investigación se llevó a cabo en los laboratorios de la Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE" en la sede de Santo Domingo.

Ubicación política

País: Ecuador

Provincia: Santo Domingo de los Tsáchilas

Cantón: Santo Domingo de los Colorados

Parroquia: Luz de América

Dirección: Santo Domingo-Vía Quevedo km 24 margen izquierdo

Ubicación Geográfica

Se desarrolló en el laboratorio de Bromatología y Microbiología ubicados en la Universidad de las Fuerzas Armadas sede Santo Domingo.

Latitud: 00° 24' 36"

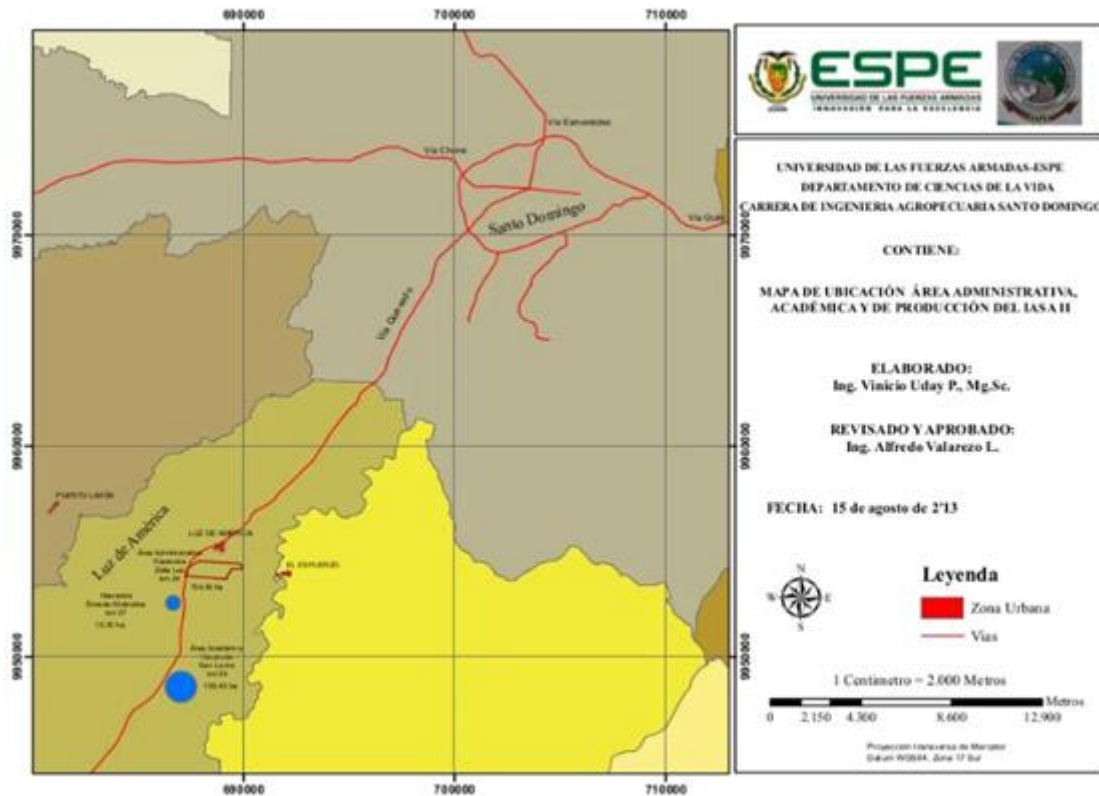
Longitud: 79° 18' 43"

Altitud: 270 msnm

Ubicación geográfica donde se realizó la investigación

Figura 3

Ubicación geográfica donde se realizó la investigación



Nota: En la imagen adjunta se observa la ubicación geográfica donde se llevó a cabo la presente investigación.

Ubicación ecológica

Zona de Vida	:	Bosque húmedo tropical
Altitud	:	224 msnm
Precipitación	:	2860 mm año
Humedad relativa	:	85%

Materiales

Preparación de Té

Tabla 12

Materiales empleados para la preparación de té negro y guayusa para la obtención de SCOBY

Muestras	Equipos	Materiales
Kombucha iniciadora tipo 1	Estufa	Frascos de vidrio de 750 mL
Kombucha iniciadora tipo 2		Toallas de algodón reutilizables
		Ligas plásticas estériles
		Embudo
		Cucharas de palo
		Cedazo
		Ollas de acero quirúrgico

Determinación de Grados Brix

Tabla 13

Materiales empleados para evaluación de grados Brix en muestras té negro y té de guayusa para la obtención de SCOBY

Muestras	Equipos	Materiales
Té negro	Refractómetro	Piceta

Té de guayusa

Vasos de precipitación
de 250 mL

Goteros

Determinación de pH**Tabla 14**

Materiales requeridos para análisis de pH de té negro y té de guayusa para la obtención de SCOBY

Muestras	Equipos	Materiales
Té negro	Potenciómetro	Piceta
Té de guayusa		Vasos de precipitación de 250 mL
		Probeta de 50 mL

Determinación de Acidez titulable**Tabla 15**

Materiales requeridos para el análisis de acidez titulable de té negro y té de guayusa para la obtención de SCOBY

Muestras	Reactivos	Equipos	Materiales
té negro	Hidróxido de sodio 0,1N	Plancha de agitación	Agitador magnético
Té de guayusa		Potenciómetro	Probeta de 50 mL

Vasos de 250 mL
 Vasos de precipitación de 50 mL
 Bureta de 25 mL
 Soporte Universal
 Balones de aforo de 250 mL
 Piceta

Recuento de poblaciones microbianas

Tabla 16

Materiales para el recuento microbiológico de las muestras de té negro y té de guayusa

Muestras	Reactivos	Equipos	Materiales
Kombucha tipo 1 (Kombucha de té negro)	Peptona Agua destilada	Plancha de agitación y calor	Agitador magnético Lámparas de alcohol Espátula-Cuchara
Kombucha tipo 1 (Kombucha de té de guayusa)		Autoclave	Frasco de vidrio Probeta
Kombucha tipo 2 (Kombucha de té negro)		Cámara de flujo laminar	Tubos de ensayo con tapa rosca
Kombucha tipo 2 (Kombucha de té de guayusa)		Incubadora Balanza Contador de colonias Vortex	Vasos de precipitación Micropipetas Puntas para micropipeta Gradilla

Petriefilm

Tijera

Siembra de microorganismos**Tabla 17**

Materiales de siembra dispensables para la obtención de microorganismos presentes en los SCOBY de Kombucha

Muestras	Reactivos	Equipos	Materiales
SCOBY de Kombucha tipo 1 (Kombucha de té negro)	Agar MRS Alcohol 70%	Plancha de agitación y calor	Agitador magnético Lámparas de alcohol Espátula-Cuchara
SCOBY de Kombucha tipo 1 (Kombucha de té de guayusa)		Autoclave	Frasco de vidrio Probeta
SCOBY de Kombucha tipo 2 (Kombucha de té negro)		Cámara de flujo laminar Incubadora	Placas petri Asas bacteriológicas Parafilm
SCOBY de Kombucha tipo 2 (Kombucha de té de guayusa)		Balanza	Tijera

Aislamiento de microorganismos

Tabla 18

Materiales para aislamiento de microorganismos a partir de los tipos de SCOBY y especies vegetales

Muestras	Reactivos	Equipos	Materiales
Cajas petri de bacterias desarrolladas de SCOBY de Kombucha tipo 1 (Kombucha de té negro)	Agar MRS	Plancha de agitación y calor	Agitador magnético Espátula-Cuchara Lámparas de alcohol Probeta
Cajas petri de bacterias desarrolladas de SCOBY de Kombucha tipo 1 (Kombucha de té de guayusa)		Autoclave Balanza	Frasco de vidrio Parafilm
Cajas petri de bacterias desarrolladas de SCOBY de Kombucha tipo 2 (Kombucha de té negro)		Cámara de flujo laminar	Placas petri Asas bacteriológicas Tijera
Cajas petri de bacterias desarrolladas de SCOBY de Kombucha tipo 2 (Kombucha de té de guayusa)			

Identificación microbiológica de microorganismos

Tabla 19

Identificación de microorganismos provenientes de las muestras de té negro y guayusa con sus respectivos SCOBY

Muestras	Reactivos	Equipos	Materiales
Bacterias de SCOBY de Kombucha tipo 1 (Kombucha de té negro)	Cristal violeta	Microscopio	Asas bacteriológicas
	Lugol		Lámparas de alcohol
	Alcohol acetona		Gotero
	Safranina		
Bacterias de SCOBY de Kombucha tipo 1 (Kombucha de té de guayusa)	Aceite de inmersión		Picetas
	Peróxido de Hidrógeno		Portaobjetos
			Varillas de vidrio
			Cubeta de tinción
SCOBY de Kombucha tipo 2 (Kombucha de té negro)			
SCOBY de Kombucha tipo 2 (Kombucha de té de guayusa)			

Análisis estadístico

Niveles y Factores de la investigación

La siguiente investigación se clasificó por factores y niveles de experimento

Tabla 20

Factores y niveles para llevar a cabo la investigación

Factores	Niveles
Kombucha (SCOBY) tipo 1 (A)	A0
Komucha (SCOBY) tipo 2 (A)	A1
Especies vegetales (B)	B0: té negro
	B1: Guayusa

Nota: Se especifican los tipos de Kombucha que se emplearon, el tipo de sustrato en el que se fermento.

Interacción de los tratamientos

Tabla 21

Interacciones respectivas con sus respectivos tratamientos (Kombucha y sustratos)

Tratamiento	Interacción	Combinación
T1	A0B0	Kombucha tipo 1+ té negro
T2	A0B1	Kombucha tipo 1 + té de guayusa
T3	A1B0	Kombucha tipo 2+ té negro
T4	A1B1	Kombucha tipo 2 + té de guayusa

Nota: Etiquetas empleadas para el diseño experimental respectivo.

Tipo de diseño

Para la obtención de las bacterias ácido lácticas de la bebida de Kombucha se aplicó un diseño bifactorial A x B (2x2), obteniendo un total de 4 tratamientos con cinco repeticiones por tratamiento y para las UFC se empleó el mismo diseño con cinco repeticiones. El modelo estadístico empleado es el siguiente:

Modelo matemático del modelo experimental

Factorial $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \gamma_j + (\alpha\gamma)_{ij} + \beta_k + \epsilon_{ijk}$ Donde:

Y_{ijkl} = observación del i-ésimo nivel del factor A, j-ésimo nivel del factor B y k-ésimo nivel réplica.

μ = media general

α_i = efecto i-ésimo de los SCOBY

γ_j = efecto j-ésimo de especies vegetales

$(\alpha\gamma)_{ij}$ = efecto de la interacción de primer orden del i-ésimo de los SCOBY y el j-ésimo del tipo de especies vegetales

β_k = efecto k-ésimo nivel replica

ϵ_{ijk} = error experimental obtenido de los factores

Repeticiones

Se realizó cinco repeticiones por tratamiento, lo cual generó un total de 20 unidades experimentales y para el caso de las UFC se realizó el mismo procedimiento.

Tabla 22

Análisis de varianza, para análisis físico químicos

Fuente de variación		Grados de libertad
Tipos de Kombucha	(a-1)	1
Especies Vegetales	(b-1)	1
(Tipos de SCOBY)(Especies Vegetales)	[(a-1) * (b-1)]	1
Réplica	(r-1)	4
Error	$(a*b*r-1)-(a-1)-(b-1)-[(a-1) * (b-1)]$	12
Total	$(a*b*r-1)$	19

Nota: Modelo aplicado del diseño experimental con sus respectivos grados de libertad.

Análisis funcional. Para dar un resultado óptimo hay que proceder a tomar una decisión con resultados de las variables obtenidos para ello se aplicó y considero la prueba de tukey ($p < 0,05$) para el análisis de varianza.

Métodos

Preparación de Té

Se colocó 2,5 L de agua embotellada en una olla de acero quirúrgico a hervir hasta llegar al punto de ebullición, luego se añadió 12 g por cada litro de agua de té negro, se dejó hervir por 15 minutos y se apagó, luego se procedió a colocar 125 g de azúcar por cada litro de agua, se mezcló hasta diluir totalmente el azúcar y se dejó enfriar.

Para la preparación del té de guayusa se realizó el mismo procedimiento, se colocó 2,5 L de agua embotellada en una olla de acero quirúrgico, se dejó en cocción hasta alcanzar el punto de ebullición, se continuó colocando 12 g de guayusa en polvo por cada litro de agua y se procedió a dejar hervir por 15 minutos, luego se apagó, se añadió 125 g de azúcar por litro y se dejó reposar la solución de té hasta enfriar.

Determinación de Grados Brix

Se adquirió 1 mL de muestra de cada tratamiento de té de Kombucha por separado, luego se limpió la zona de lectura del refractómetro con agua destilada, se procedió a secar con una toalla de papel y se prosiguió a colocar una gota en el refractómetro para medir los grados brix de cada muestra, donde se evidenció dichos grados de acuerdo a donde se reflejaba la coloración azul en la escala de medida y se prosiguió a la toma de resultados.

Determinación de pH

Para la determinación del nivel de pH de cada muestra de té de Kombucha, se adquirió de 15 a 20 mL de cada tratamiento y se colocó en vasos de precipitación de 50 mL de capacidad con el fin de tener un mejor manejo.

Luego se calibró el peachimetro con las soluciones buffer, se procedió a lavar el electrodo con agua destilada y se continuó colocando al mismo en cada una de las muestras de té de Kombucha, lo cual se realizó lecturas por separado, se colocó la opción de medir pH, se dejó por unos minutos al electrodo en el interior de las muestras evitando no moverlo hasta la obtención de los valores.

Determinación de Acidez titulable

Para la determinación en productos líquidos se lo realizó mediante la norma INEN 0381 (1985):

Para ello se utilizó 25 mL de solución de Kombucha en un matraz de 250 mL y se añadió agua destilada hasta llegar al menisco, se procedió a mezclar hasta conseguir una homogeneización. Seguidamente se tomó 25 mL de la disolución del matraz con ayuda de una probeta colocándolo en un vaso de precipitación y se midió el pH. La titulación se dio pausadamente con hidróxido de sodio al 0,1N hasta alcanzar un pH de 7, 8,1 y alrededor de 8,3 aproximadamente. Se registró el volumen de hidróxido de sodio y el pH alcanzado después de cada gota. Para culminar se estableció el pH y volumen ocupado por medio de la interpolación un pH de 8,1 como la norma lo indica.

Para determinar el volumen con precisión de solución de 0,1 N de hidróxido de sodio correspondiente al pH 8,1 se lo realizó por interpolación. Se resuelve

La acidez titulable mediante la siguiente ecuación:

$$A = \left(\frac{(V1N1) 10}{V2} \right)$$

Lo cual se denomina:

A = g de ácido en 1000 mL de producto.

V1 = mL de NaOH usados para la titulación de la alícuota.

N1 = normalidad de la solución de NaOH.

M = peso molecular del ácido de referencia (0,064 de ácido cítrico).

V2 = volumen de la alícuota tomada para el análisis.

Recuento de poblaciones microbianas

Se estableció basándose en la norma INEN 1529-5 (2006), en la determinación de unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL).

Se diluyó en 108 mL de agua destilada, 0,54 gramos de agua peptona, luego se colocó 9mL de la homogenización en tubos de ensayo para la preparación de disoluciones seriadas hasta llegar a 10^{-3} . Se continuó con la esterilización de la solución en los tubos con empleo del autoclave, una vez culminado se prosiguió a llevar los tubos a la cámara de flujo laminar para la preparación de las disoluciones. Se tomó 1mL de la solución de Kombucha la cual se colocó en el primer tubo de ensayo luego se agitó con la ayuda del vortex así hasta llegar a 10^{-3} .

Se sembró 1mL del inóculo de la solución de 10^{-3} en las Petrifilm de mohos y levaduras se incubaron a temperatura ambiente por 72 horas mientras que los Petrifilm de bacterias fueron incubados a 35-37°C durante 48 horas. Luego se realizó el conteo con ayuda del contador de colonias Colony Colony Counter ISOLAB y se resolvió mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Recuento} \left(\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Número de colonias} * \text{Inverso del factor de dilución}}{\text{Volumen inoculado}}$$

Siembra de microorganismos

Se preparó agar MRS con el protocolo propuesto por el fabricante, una vez preparado el medio se prosiguió con la esterilización de todos los materiales requerido y mencionados en la tabla 17, luego de ello se llevó todo a la cámara de flujo laminar y se dispensó el medio en las cajas Petri para dejar en UV por aproximadamente 20 minutos.

Antes de proceder a la siembra de microorganismos se realizó una desinfección de manos con alcohol al 70% a su vez se roseo la parte delantera de la bata que dará justo frente a la cámara de flujo laminar, una vez realizado todo lo mencionado se prosiguió a colocar los 4 tratamientos de Kombucha dentro de la cámara.

Seguidamente se encendió los 2 mecheros de alcohol conjuntamente con el aire de la cámara para evitar así la proliferación de microorganismos que podrían causar contaminación.

Se tomó seguidamente el asa bacteriológica y se sometió al fuego del mechero hasta alcanzar una coloración roja vivo luego se esperó unos segundos para su previo enfriamiento y así proseguir a raspar el SCOBY en diferentes secciones para sembrar de forma estriada en la caja Petri.

Se empleó el mismo proceso para cada uno de los tratamientos obteniendo así 2 placas por cada uno de ellos.

Se realizó la siembra al día 3, 5 y 7 de los SCOBY obtenidos de los 4 tratamientos de la Kombucha.

Aislamiento de microorganismos

En primera instancia se preparó el medio para el crecimiento de los microorganismos, por ello se preparó agar MRS de acuerdo a las indicaciones por parte del fabricante, se continuó a esterilizar todos los materiales a utilizar en el autoclave, con anterioridad se desinfecto la cámara de flujo laminar. Una vez esterilizada la cámara se prosiguió a dispensar el medio en cajas Petri y se dejó enfriar, seguidamente se dejó en UV por un tiempo de 20 minutos.

El aislamiento de las bacterias se llevó a cabo con asas bacteriológicas para ello se seleccionó las colonias que se formaron observando que difieran una de otras, previamente se calentó el asa en el fuego del mechero hasta alcanzar un rojo vivo se dejó enfriar por un momento para así proseguir a tomar la colonia seleccionada, rápidamente se sembró de forma estriada en toda la caja Petri y se selló con Parafilm para luego llevar las muestras obtenidas a la estufa por un periodo de 24 a 48 horas a 37°C.

Identificación microbiológica

Para la identificación microbiológica de microorganismos, se colocó una gota de agua destilada en un portaobjeto limpio, luego se adquirió una pequeña porción de muestra microbiológica con ayuda de un asa bacteriológica y se añadió al portaobjeto con agua, se prosiguió mezclando la bacteria con el agua hasta conseguir una mezcla casi homogénea o hasta evidenciar que no hay restos de bacterias de coloración blanca.

Se procedió a fijar la muestra con aplicación de calor empleando para ello una lámpara de alcohol hasta que se evidenció que estaba totalmente seca, se procedió aplicar la técnica de tinción Gram, para lo cual se añadió primero una gota de cristal violeta se dejó concentrar por un minuto, se procedió a lavar la muestra

con abundante agua destilada y se secó con el calor emitido por la lámpara de alcohol.

Luego se colocó lugol al cual de igual manera se dejó teñir por un minuto, se procedió a lavar con abundante agua destilada y se secó con la lámpara de alcohol, se continuó colocando alcohol acetona, se dejó reposar por 15 segundos para decolorar, de igual manera se lavó con agua destilada y se secó, finalmente se colocó safranina por un minuto, se procedió a lavar y secar con la lámpara de alcohol.

Se continuó colocando la muestra teñida en un microscopio, se colocó una gota de aceite de inmersión en la muestra para observar a 100X y se evidenció las características morfológicas de los microorganismos, así también se identificó de acuerdo al tipo de coloración que presentaron a qué tipo de microorganismos correspondían.

Se prosiguió realizando la prueba de catalasa para evidenciar a nivel químico a que grupo de microorganismos pertenecen, para ello, se utilizó un portaobjeto limpio y desinfectado, luego se colocó una gota de peróxido de hidrógeno y una porción de muestra microbiológica, se mezcló de manera rápida y se dejó reposar unos segundos hasta evidenciar si hay o no presencia de burbujas que es la reacción a catalasa positiva o en ausencia catalasa negativa.

Identificación bioquímica de microorganismos

Prueba de catalasa

Se empleó varios portaobjetos, a los cuales se limpió y desinfectó con alcohol para evitar impurezas que afecten el observar la reacción bioquímica, luego se adquirió una porción de muestra microbiológica con un asa previamente esterilizada con calor, se procedió a colocar una gota de peróxido hidrógeno y se dejó reposar hasta evidenciar la reacción.

Prueba de oxidasa

Se utilizó porciones de papel filtro estéril de aproximadamente 3 a 5 cm cuadrados, mismos que se colocaron en una caja Petri con el fin de evitar derrames de reactivo, se prosiguió a añadir 3 gotas de reactivo Kovacs, se continuó adquiriendo una porción de muestra microbiológica y se aplicó sobre el papel filtro con el reactivo, se dejó por unos segundos hasta evidenciar si se generaba o no reacción.

Capítulo IV

Resultados

Parámetros físico químicos por individual en los diferentes días

Tabla 23

Análisis de varianza pH día 3

Efecto	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	F-valor	P-valor
Tipo de Kombucha (A)	0.0304	1	0.0304	4.15	0.064298
Tipo de especie vegetal (B)	0.0218	1	0.0218	2.97	0.110375
I A*B	0.0020	1	0.0020	0.27	0.610913
Replicas	0.0583	4	0.0146	1.99	0.160262
Error	0.0880	12	0.0073		

Nota: en esta tabla se muestra el análisis de varianza del pH en el día 3 de la fermentación del té.

Tabla 24

Análisis de varianza de acidez día 3

Efecto	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	F-valor	P-valor
Tipo de Kombucha (A)	0.00000000183	1	0.0000000018	0.060	0.811277
	5		35		
Tipo de especie vegetal (B)	0.00000027992	1	0.0000002799	9.090	0.010763
	7		27		
I A*B	0.00000000044	1	0.0000000004	0.014	0.906883
	0		40		
Replicas	0.00000030685	4	0.0000000767	2.491	0.098973
	7		14		
Error	0.00000036953	12	0.0000000307		
	5		95		

Nota: en esta tabla se muestra el análisis de varianza de la acidez en el día 3 de la fermentación del té.

Tabla 25

Análisis de varianza de Brix día 3

Efecto	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	F-valor	P-valor
Tipo de Kombucha(A)	5.000	1	5.000	10.762	0.006573

Tipo de especie vegetal (B)	1.458	1	1.458	3.138	0.101843
I A*B	0.722	1	0.722	1.554	0.236320
Replicas	2.637	4	0.659	1.419	0.286519
Error	5.575	12	0.465		

Nota: en esta tabla se muestra el análisis de varianza de grados Brix en el día 3 de la fermentación del té.

En el análisis de varianza del pH del día 3 (tabla 23) se determinó que el tipo de Kombucha no presento influencia en sus niveles ya que el valor proporcionado de la probabilidad es mayor al de referencia $0.05 > P$ ($0.05 < 0.064298$), en tipo de especie vegetal se determinó que el sustrato suministrado no tuvo influencia por parte de los medios ya que la probabilidad proporcionada resultó ser mayor a la que se toma como referencia $0.05 > P$ ($0.05 < 0.110375$), respecto a la interacción se evidenció que este no tiene influencia como tal de sus niveles ya que el valor proporcionado por la probabilidad es mayor del tomado como referencia $0.05 > P$ ($0.05 < 0.610913$).

En el análisis de varianza de la acidez del día 3 (tabla 24) se determinó que el tipo de Kombucha no presento influencia en sus niveles ya que el valor proporcionado de la probabilidad es mayor al de referencia $0.05 > P$ ($0.05 < 0.811277$), en tipo de especie vegetal se determinó que el sustrato suministrado tuvo influencia por parte de los medios ya que la probabilidad proporcionada resultó ser menor a la que se toma como referencia $0.05 > P$ ($0.05 > 0.010763$), respecto a la interacción se evidenció que este no tiene influencia como tal de sus niveles ya que el valor proporcionado por la probabilidad es mayor del tomado como referencia $0.05 > P$ ($0.05 < 0.906883$).

En el análisis de varianza de los grados Brix del día 3 (tabla 25) se determinó que el tipo de Kombucha presento influencia en sus niveles ya que el valor proporcionado de la probabilidad es menor al de referencia $0.05 > P$ ($0.05 < 0.006573$), en tipo de especie vegetal se determinó que el sustrato suministrado no tuvo

influencia por parte de los medios ya que la probabilidad proporcionada resultó ser mayor a la que se toma como referencia $0.05 > P$ ($0.05 < 0.101843$), respecto a la interacción se evidenció que este no tiene influencia como tal de sus niveles ya que el valor proporcionado por la probabilidad es mayor del tomado como referencia $0.05 > P$ ($0.05 < 0.236320$).

Tabla 26

Análisis de varianza pH día 5

Efecto	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	F-valor	P-valor
Tipo de Kombucha (A)	0.0110	1	0.0110	1.25	0.286274
Tipo de especie vegetal (B)	0.0076	1	0.0076	0.86	0.372676
I A*B	0.0018	1	0.0018	0.20	0.659928
Replicas	0.0922	4	0.0231	2.60	0.089509
Error	0.1064	12	0.0089		

Nota: en esta tabla se muestra el análisis de varianza del pH en el día 5 de la fermentación del té.

Tabla 27

Análisis de varianza acidez día 5

Efecto	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	F-valor	P-valor
Tipo de Kombucha (A)	0.000001	1	0.000001	12.666	0.003932
Tipo de especie vegetal (B)	0.000000	1	0.000000	4.955	0.045950
I A*B	0.000003	1	0.000003	50.199	0.000013
Replicas	0.000000	4	0.000000	0.833	0.529480
Error	0.000001	12	0.000000		

Nota: en esta tabla se muestra el análisis de varianza de la acidez en el día 5 de la fermentación del té.

Tabla 28

Análisis de varianza grados Brix día 5

Efecto	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	F-valor	P-valor
Tipo de Kombucha (A)	0.024	1	0.024	0.39	0.545600
Tipo de especie vegetal (B)	0.012	1	0.012	0.20	0.664759

I A*B	0.760	1	0.760	12.01	0.004672
Replicas	0.532	4	0.133	2.10	0.143784
Error	0.760	12	0.063		

Nota: en esta tabla se muestra el análisis de varianza del Brix en el día 5 de la fermentación del té.

La tabla 26 representa el análisis de varianza aplicado al pH del día 5 se pudo identificar que el tipo de Kombucha no tuvo diferencia significativa ya que el valor comparado con la medida $0.05 > P$ no cumplen la relación ($0.05 < 0.286274$) por lo que se pudo determinar que sus niveles proporcionan datos estadísticamente iguales, referente al tipo de especie vegetal se determinó que no existió diferencia significativa ya que al ser comparado con la medida estándar $0.05 > P$ ($0.05 < 0.372676$), referente a la interacción se puede determinar que no existe diferencia significativa ya que el valor proporcionado por el análisis es mayor al estándar comparado $0.05 > P$ ($0.05 < 0.659928$).

La tabla 27 representa el análisis de varianza aplicado a la acidez del día 5 se pudo identificar que el tipo de Kombucha tuvo diferencia significativa ya que el valor comparado con la medida $0.05 > P$ cumple con la relación ($0.05 > 0.003932$) por lo que se pudo determinar que sus niveles proporcionan datos estadísticamente diferentes, referente al tipo de especie vegetal se determinó que existió diferencia significativa ya que al ser comparado con la medida estándar $0.05 > P$ cumple con la premisa ($0.05 > 0.045950$), referente a la interacción se puede determinar que existe diferencia significativa ya que el valor proporcionado por el análisis es menor al estándar comparado $0.05 > P$ ($0.05 > 0.000013$).

La tabla 28 representa el análisis de varianza aplicado a los grados Brix del día 5 se pudo identificar que el tipo de Kombucha no tuvo diferencia significativa ya que el valor comparado con la medida $0.05 > P$ no cumplen la relación ($0.05 < 0.545600$) por lo que se pudo determinar que sus niveles proporcionan datos estadísticamente iguales, referente al tipo de especie vegetal se determinó que no

existió diferencia significativa ya que al ser comparado con la medida estándar $0.05 > P$ ($0.05 < 0.664759$), referente a la interacción se puede determinar que no existe diferencia significativa ya que el valor proporcionado por el análisis es menor al estándar comparado $0.05 > P$ ($0.05 < 0.004672$).

Tabla 29

Análisis de varianza pH día 7

Efecto	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	F-valor	P-valor
Tipo de Kombucha (A)	0.0281	1	0.0281	3.43	0.088589
Tipo de especie vegetal (B)	0.0022	1	0.0022	0.27	0.613265
I A*B	0.0151	1	0.0151	1.85	0.199133
Replicas	0.0596	4	0.0149	1.82	0.190122
Error	0.0983	12	0.0082		

Nota: en esta tabla se muestra el análisis de varianza del pH en el día 7 de la fermentación del té.

Tabla 30

Análisis de varianza acidez día 7

Efecto	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	F-valor	P-valor
Tipo de Kombucha (A)	0.000021	1	0.000021	51.020	0.000012
Tipo de especie vegetal (B)	0.000036	1	0.000036	89.070	0.000001
I A*B	0.000002	1	0.000002	5.787	0.033178
Replicas	0.000001	4	0.000000	0.373	0.823379
Error	0.000005	12	0.000000		

Nota: en esta tabla se muestra el análisis de varianza de la acidez en el día 7 de la fermentación del té.

Tabla 31

Análisis de varianza Brix día 7

Efecto	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	F-valor	P-valor
Tipo de Kombucha (A)	1.984	1	1.984	10.34	0.007424
Tipo de especie vegetal (B)	2.245	1	2.245	11.69	0.005087

I A*B	8.845	1	8.845	46.07	0.000019
Replicas	0.028	4	0.007	0.04	0.997092
Error	2.304	12	0.192		

Nota: en esta tabla se muestra el análisis de varianza de grados Brix en el día 7 de la fermentación del té.

En el análisis de varianza del pH del día 7 (tabla 29) se determinó que el tipo de Kombucha no presento influencia en sus niveles ya que el valor proporcionado de la probabilidad es mayor al de referencia $0.05 > P$ ($0.05 < 0.088589$), en tipo de especie vegetal se determinó que el sustrato suministrado no tuvo influencia por parte de los medios ya que la probabilidad proporcionada resultó ser mayor a la que se toma como referencia $0.05 > P$ ($0.05 < 0.613265$) respecto a la interacción se evidenció que este no tiene influencia como tal de sus niveles ya que el valor proporcionado por la probabilidad es mayor del tomado como referencia $0.05 > P$ ($0.05 < 0.199133$).

En el análisis de varianza de la acidez del día 7 (tabla 30) se determinó que el tipo de Kombucha presento influencia en sus niveles ya que el valor proporcionado de la probabilidad es menor al de referencia $0.05 > P$ ($0.05 > 0.000012$), en tipo de especie vegetal se determinó que el sustrato suministrado tuvo influencia por parte de los medios ya que la probabilidad proporcionada resultó ser menor a la que se toma como referencia $0.05 > P$ ($0.05 > 0.000001$), respecto a la interacción se evidenció que este tiene influencia como tal en sus niveles ya que el valor proporcionado por la probabilidad es mayor del tomado como referencia $0.05 > P$ ($0.05 > 0.033178$).

En el análisis de varianza de los grados Brix del día 7 (tabla 31) se determinó que el tipo de Kombucha presento influencia en sus niveles ya que el valor proporcionado de la probabilidad es menor al de referencia $0.05 > P$ ($0.05 > 0.007424$), en tipo de especie vegetal se determinó que el sustrato suministrado tuvo influencia por parte de los medios ya que la probabilidad proporcionada resultó ser menor a la que se toma como referencia $0.05 > P$ ($0.05 > 0.005087$) se identificó influencia de los

niveles existentes en este factor, respecto a la interacción se evidenció que este tiene influencia como tal de sus niveles ya que el valor proporcionado por la probabilidad es menor del tomado como referencia $0.05 > P$ ($0.05 > 0.000019$).

Factor A (Tipo de Kombucha)

Tabla 32

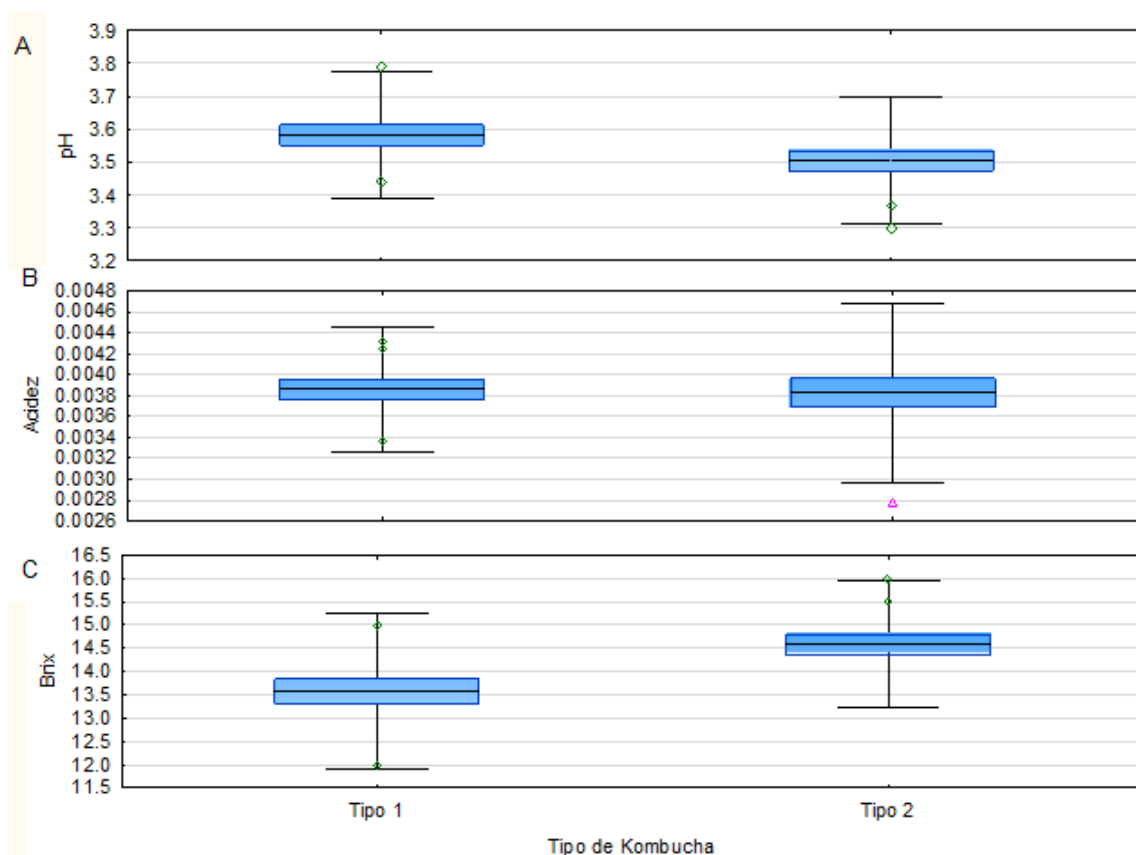
Análisis de parámetros físico-químicos de separación de medias del Factor A de los tipos de Kombucha en el día 3

	pH	Acidez	Grados Brix
Tipo 1	3.58 ^A	0.003908 ^A	13.58 ^A
Tipo 2	3.51 ^A	0.003927 ^A	14.58 ^B

Nota: Análisis de separación de medias donde podemos identificar los grupos homogéneos y heterogéneos usando la prueba de tukey.

Figura 4

Gráfica del análisis de varianza de las parámetros físico-químicos pH (A), Acidez (B) Grados Brix (C) correspondiente al día 3 en el Factor A (tipo de Kombucha)



Nota: El gráfico está dividido por tres análisis A pH, B Acidez y C con grados Brix, estos representados en gráficos de cajas y bigotes estos gráficos corresponden al factor A tipo de Kombucha en el día 3.

La figura 4 en la sección A se pudo observar que no existió diferencia algún confirmando con el análisis de separación de medias tukey que como los dos tipos de Kombucha aplicados en el estudio pertenecen al mismo grupo, respecto a la sección B acidez al no existir diferencia significativa no se considera que las medias sean distintas de igual manera en la sección C grados Brix se encontró como tal

diferencia significativa donde el tipo de Kombucha 2 presentó una media de 14.58 mayor a la del tipo 1 con 13.58.

Tabla 33

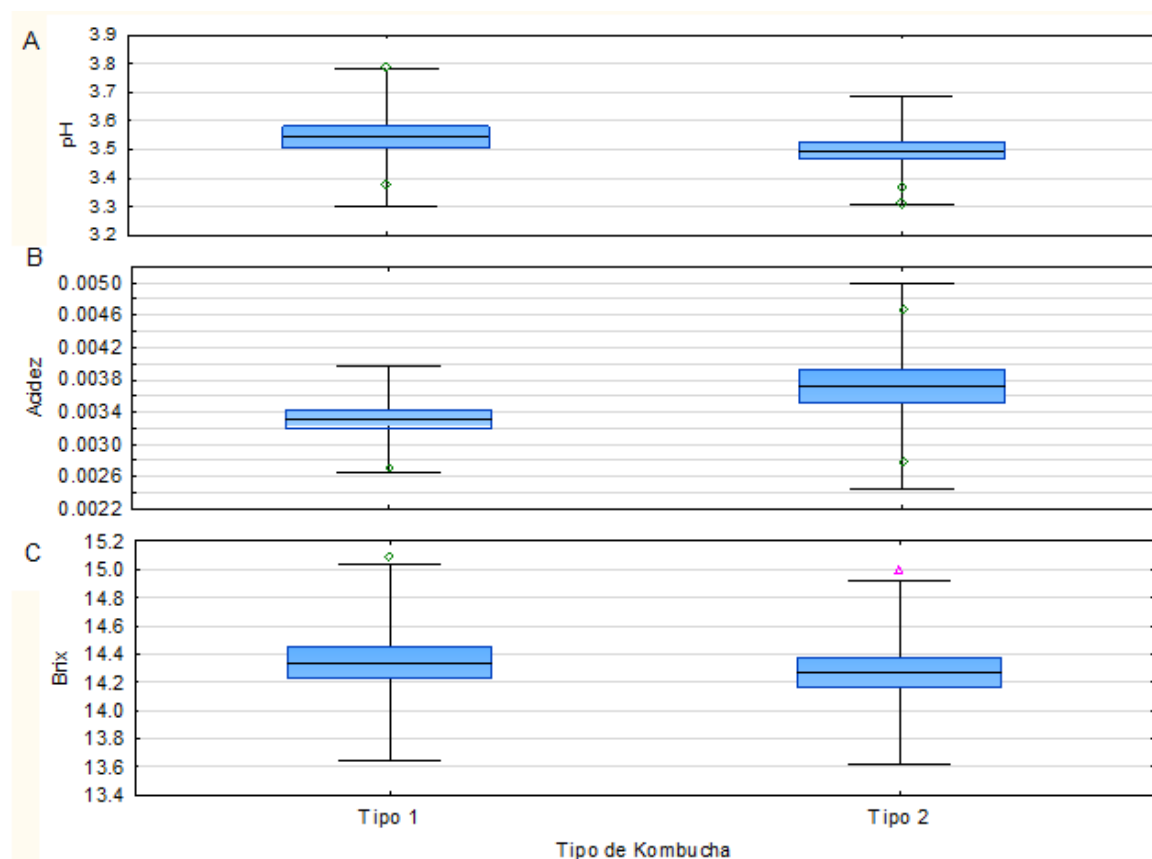
Análisis de parámetros físico-químicos de separación de medias del Factor A de los tipos de Kombucha en el día 5

	pH	Acidez	Grados Brix
Tipo 1	3.54 ^A	0.003311 ^A	14.34 ^A
Tipo 2	3.50 ^A	0.003719 ^B	14.27 ^A

Nota: Análisis de separación de medias donde podemos identificar los grupos homogéneos y heterogéneos usando la prueba de tukey.

Figura 5

Gráfica del análisis de varianza de las parámetros físico-químicos pH (A), Acidez (B) Grados Brix (C) correspondiente al día 5 en el Factor A (tipo de Kombucha)



Nota: El gráfico está dividido por tres análisis A pH, B Acidez y C con grados Brix, estos representados en gráficos de cajas y bigotes estos gráficos corresponden al factor A tipo de Kombucha en el día 5.

La figura 5 en la sección A pH se evidenció que no existió diferencia significativa por lo que las medias son estadísticamente iguales, respecto a la sección B acidez se puede evidenciar que tipo 2 con media 0.003719 es mayor al tipo 1 con media 0.003311, respecto a la sección C grados Brix no existió diferencia significativa por lo que el tipo 1 y el tipo 2 estadísticamente son los mismos.

Tabla 34

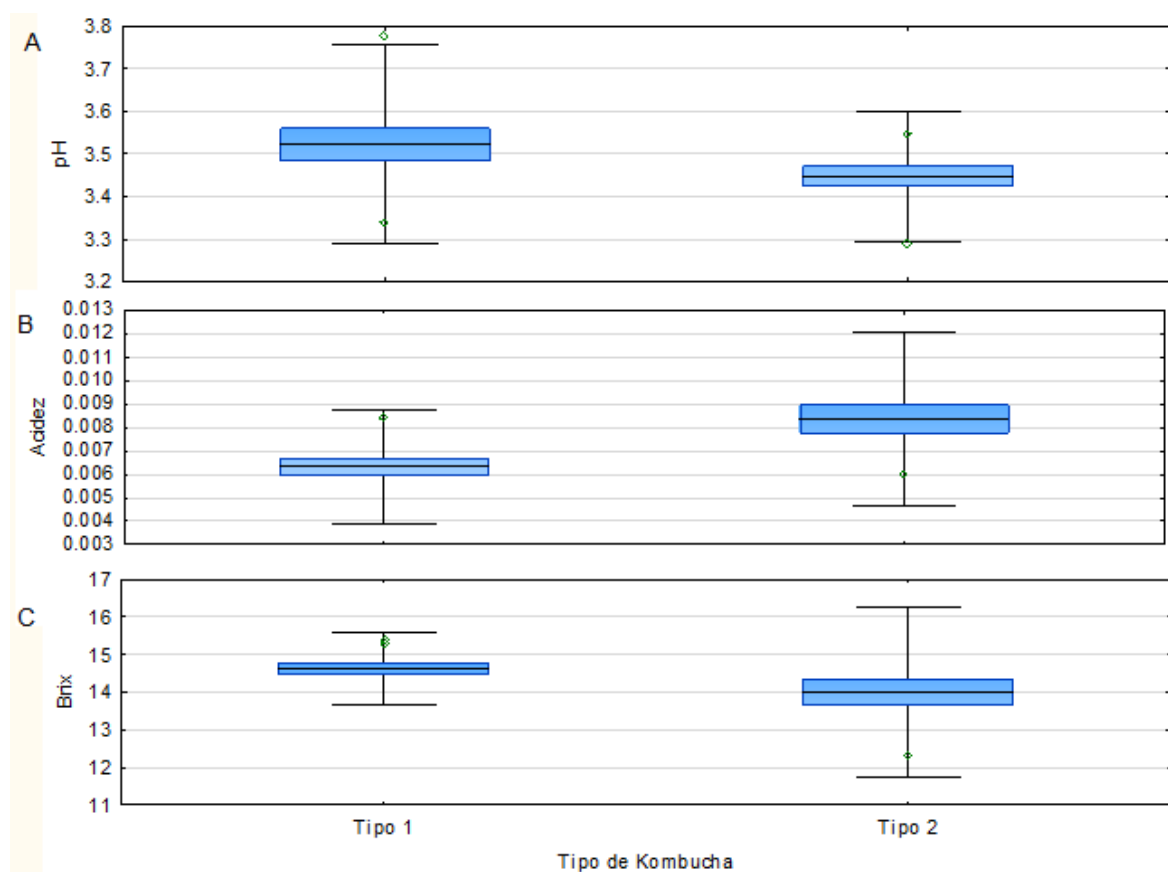
Análisis de parámetros físico-químicos de separación de medias del Factor A de los tipos de Kombucha en el día 7

	pH	Acidez	Grados Brix
Tipo 1	3.52 ^A	0.006317 ^A	14.63 ^B
Tipo 2	3.45 ^A	0.008358 ^B	14.00 ^A

Nota: Análisis de separación de medias donde podemos identificar los grupos homogéneos y heterogéneos usando la prueba de tukey.

Figura 6

Representación gráfica del análisis A pH, B Acidez y C grados Brix correspondiente al día 7 en el Factor A (tipo de Kombucha)



Nota: El gráfico está dividido por tres análisis A pH, B Acidez y C con grados Brix, estos representados en gráficos de cajas y bigotes estos gráficos corresponden al factor A tipo de Kombucha en el día 7.

La figura 6 en la sección A se puede determinar que no existe diferencia significativa por lo que el tipo 1 y el tipo 2 en pH al día 7 se mantiene estadísticamente igual, respecto a la sección B en la acidez podemos determinar que el tipo 2 con 0.008358 siendo esta mayor que el tipo 1 con 0.006317, mientras que en la sección C se evidencio en grados Brix que el tipo 1 es mayor el grado con 14.63 a comparación del tipo 2 con 14.00.

Factor B (Tipo de especie vegetal)

Tabla 35

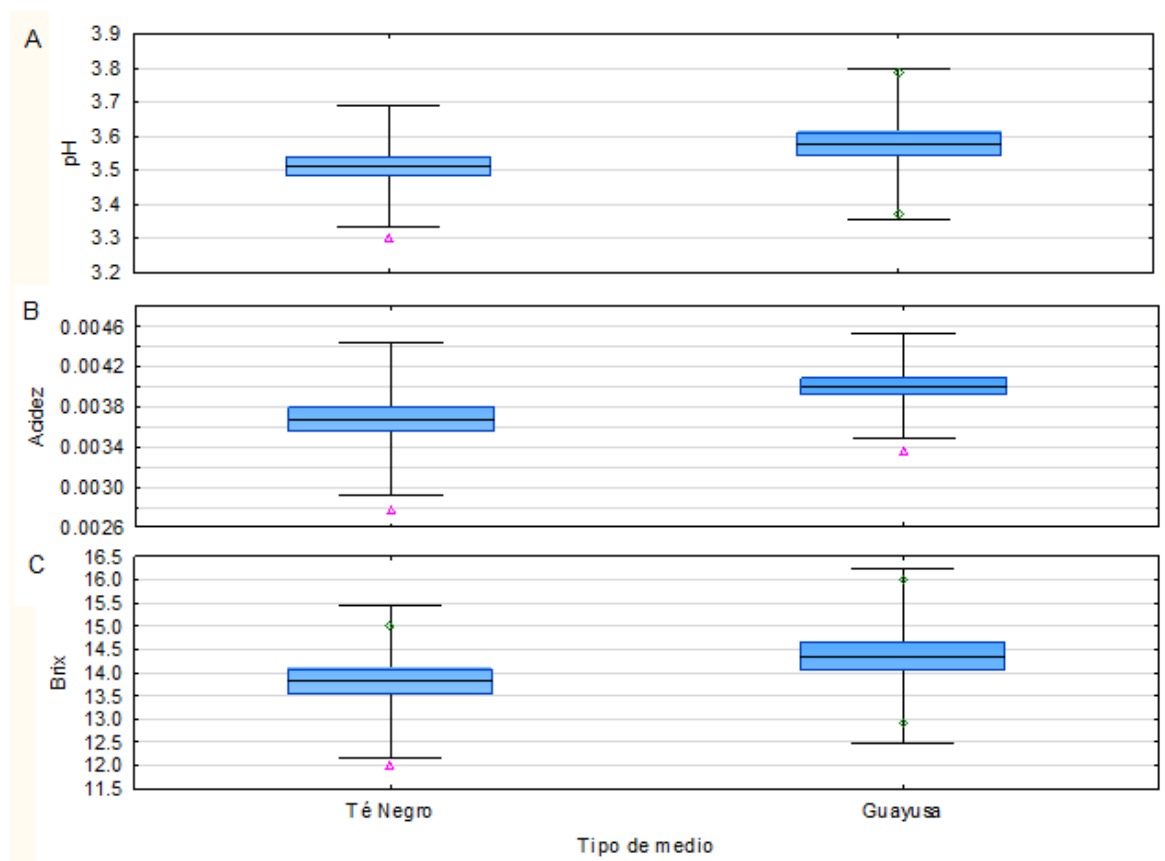
Análisis de parámetros físico-químicos de separación de medias del Factor B de los tipos de medio (sustratos vegetales) en el día 3

	pH	Acidez	Grados Brix
Té negro	3.51 ^A	0.003799 ^A	13.81 ^A
Guayusa	3.58 ^A	0.004036 ^B	14.35 ^A

Nota: Análisis de separación de medias donde podemos identificar los grupos homogéneos y heterogéneos usando la prueba de tukey.

Figura 7

Gráfica del análisis de varianza de los parámetros físico-químicos pH (A), Acidez (B) Grados Brix (C) correspondiente al día 3 en el Factor B (tipo de especie vegetal)



Nota: El gráfico está dividido por tres análisis A pH, B Acidez y C con grados Brix, estos representados en gráficos de cajas y bigotes, estos gráficos corresponden al factor B tipo de especie vegetal en el día 3.

La figura 7 sección A de pH no se evidenció diferencia significativa por lo que se entiende que el té negro estadísticamente proporciona el mismo pH con la guayusa, en la sección B se evidenció una mayor acidez en guayusa con 0.004036 comparado a té negro con 0.003799 respecto a la sección C los grados Brix no presentaron diferencia significativa por lo que al día 3 no se vio cambio respecto al sustrato aplicado.

Tabla 36

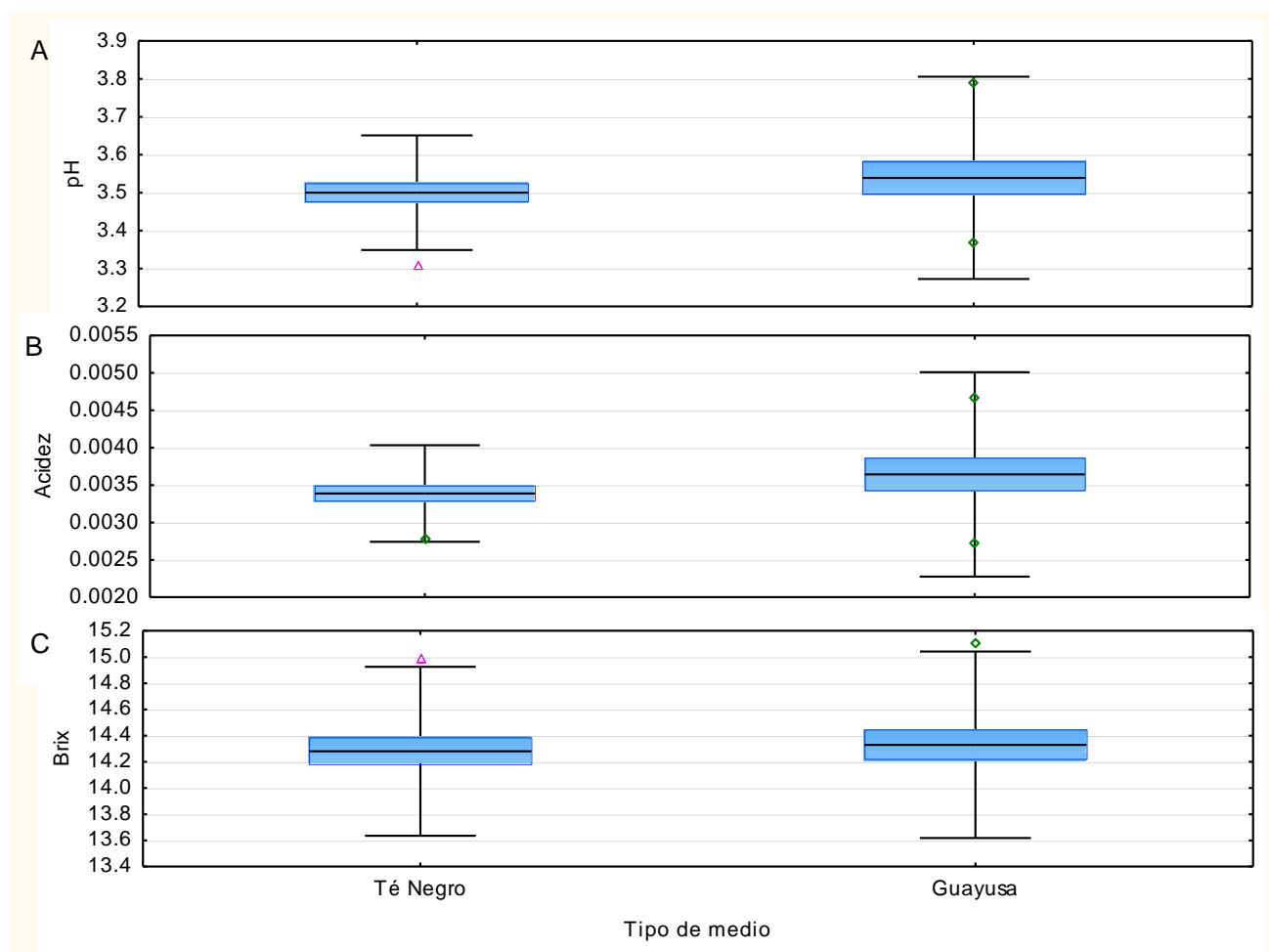
Análisis de parámetros físico-químicos de separación de medias del Factor B de los sustratos vegetales en el día 5

	pH	Acidez	Grados Brix
Té negro	3.50 ^A	0.003388 ^A	14.28 ^A
Guayusa	3.54 ^A	0.003643 ^B	14.33 ^A

Nota: Análisis de separación de medias donde podemos identificar los grupos homogéneos y heterogéneos usando la prueba de tukey.

Figura 8

Gráfica del análisis de varianza de los parámetros físico-químicos pH (A), Acidez (B) Grados Brix (C) correspondiente al día 5 en el Factor B (tipo de especies vegetales)



Nota: El gráfico está dividido por tres análisis A pH, B Acidez y C con grados Brix, estos representados en gráficos de cajas y bigotes estos gráficos corresponden al factor B tipo de especie vegetal en el día 5.

Figura 8 en la sección A se pudo evidenciar que no existió diferencia significativa por lo que el pH en el Té negro y la guayusa en el día 5 presentó datos estadísticamente iguales, respecto a la sección B acidez mostro que la guayusa al día 5 tuvo mayor acidez (0.003643) comparado al té negro con 0.003388, en la sección C los grados Brix no presentaron diferencia significativa.

Tabla 37

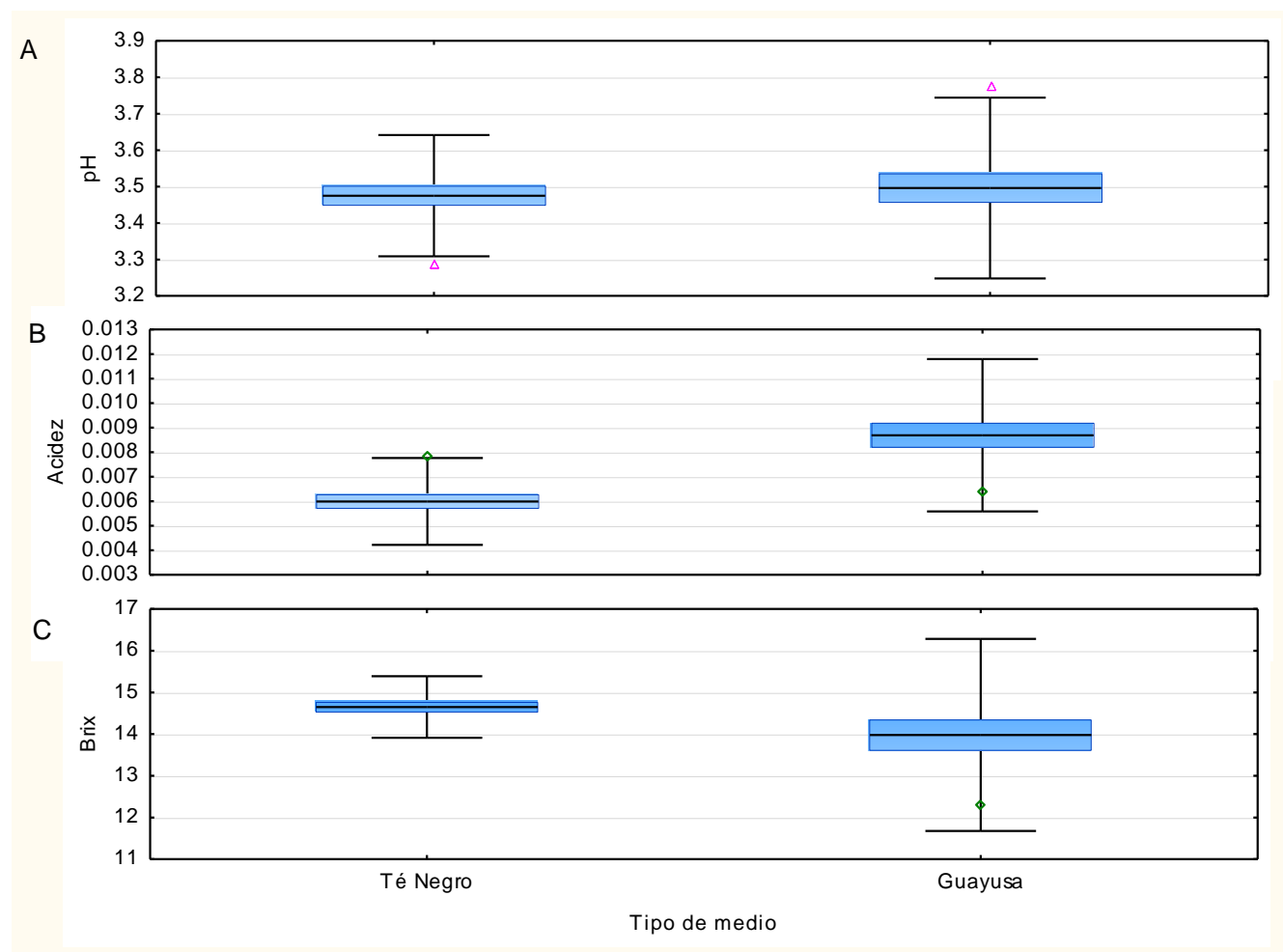
Análisis de parámetros físico-químicos de separación de medias del Factor B de las especies vegetales en el día 7

	pH	Acidez	Grados Brix
Té negro	3.47 ^A	0.005989 ^A	14.65 ^B
Guayusa	3.50 ^A	0.008686 ^B	13.98 ^A

Nota: Análisis de separación de medias donde podemos identificar los grupos homogéneos y heterogéneos usando la prueba de tukey.

Figura 9

Gráfica del análisis de varianza de las parámetros físico-químicos pH (A), Acidez (B) Grados Brix (C) correspondiente al día 7 en el Factor B (especies vegetales)



Nota: El grafico está dividido por tres análisis A pH, B Acidez y C con grados Brix, estos representados en gráficos de cajas y bigotes estos gráficos corresponden al factor B tipo de especie vegetal en el día 7.

Figura 9 se puede evidenciar que en la sección A en pH no se evidenció diferencia significativa, en la sección B acidez la guayusa presentó mayor acidez esta con 0.008686 mientras que el té negro tuvo una acidez de 0.005989, en la sección C respectivamente en grados Brix al día 7 el té negro tuvo mayor cantidad de grados Brix 14.65 comparado a la guayusa con 13.98.

Interacción Factor A x B (Tipo de Kombucha con tipo de especie vegetal)

Tabla 38

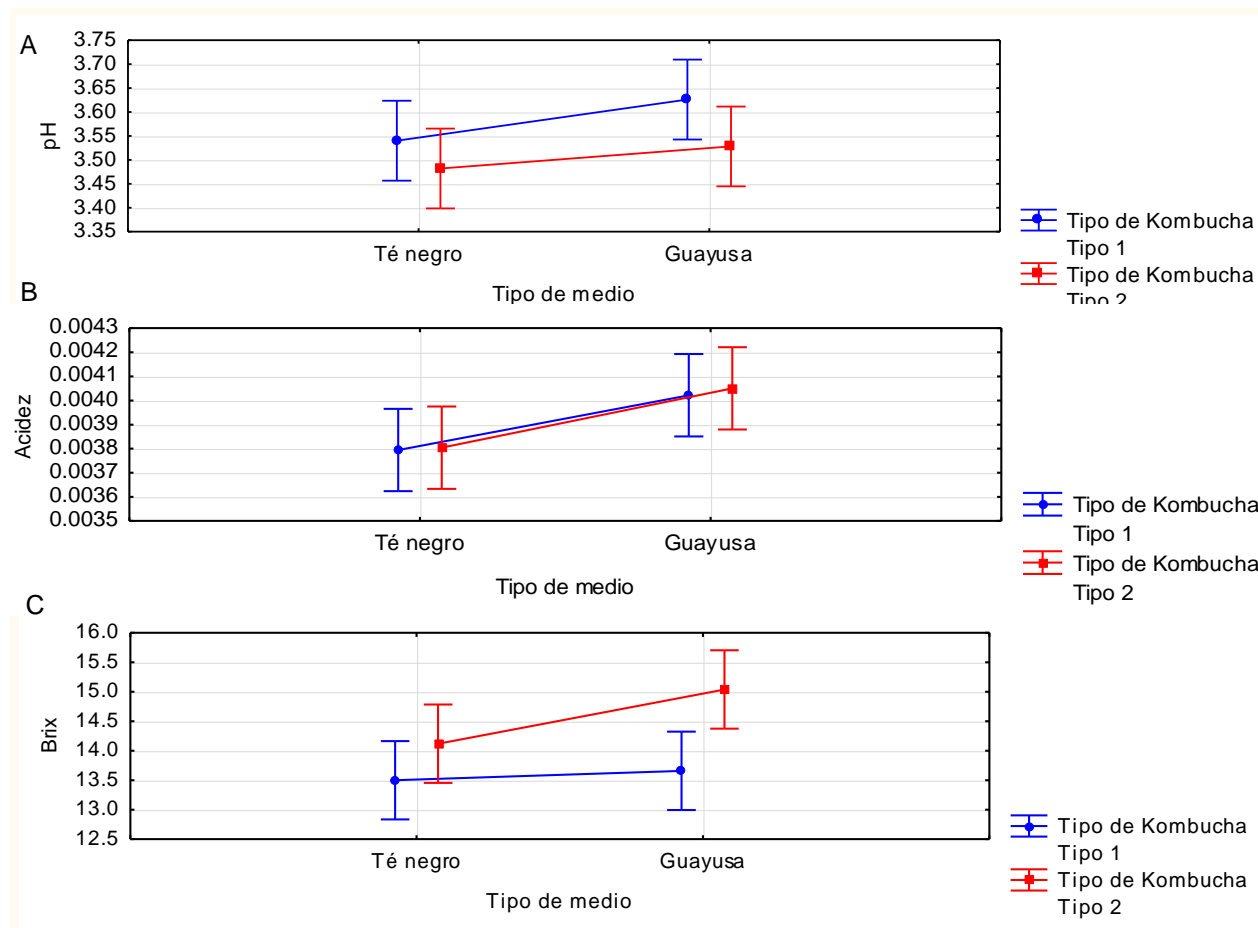
Análisis de parámetros físico-químicos de separación de medias del Factor A (tipos de Kombucha) y Factor B (especie vegetales) en el día 3

	pH	Acidez	Grados Brix
Tipo 1 * Té negro	3.54 ^A	0.003794 ^A	13.50 ^A
Tipo 1 * Guayusa	3.63 ^A	0.004022 ^A	13.66 ^A
Tipo 2 * Té negro	3.48 ^A	0.003804 ^A	14.12 ^A
Tipo 2 * Guayusa	3.53 ^A	0.004050 ^A	15.04 ^A

Nota: Análisis de separación de medias donde podemos identificar los grupos homogéneos usando la prueba de tukey.

Figura 10

Gráfica del análisis de varianza de los parámetros físico-químicos pH (A), Acidez (B) Grados Brix (C) correspondiente al día 3 en la Interacción del Factor A (Tipo de Kombucha) Factor B (tipo de especie vegetal)



Nota: El gráfico está dividido por tres análisis A pH, B Acidez y C con grados Brix, estos representados en gráficos de medias y de error, corresponden a la interacción del tipo de Kombucha con el tipo de especie vegetal en el día 3.

En la figura 10 en la sección A en pH no se evidenció diferencia significativa por lo que no hubo diferencia estadísticamente hablando en las interacciones al día 3, en la sección B en acidez no se evidenció diferencia significativa en las interacciones respectivas además en la sección C en grados Brix tampoco se evidencio diferencia significativa en las interacciones al día 3.

Tabla 39

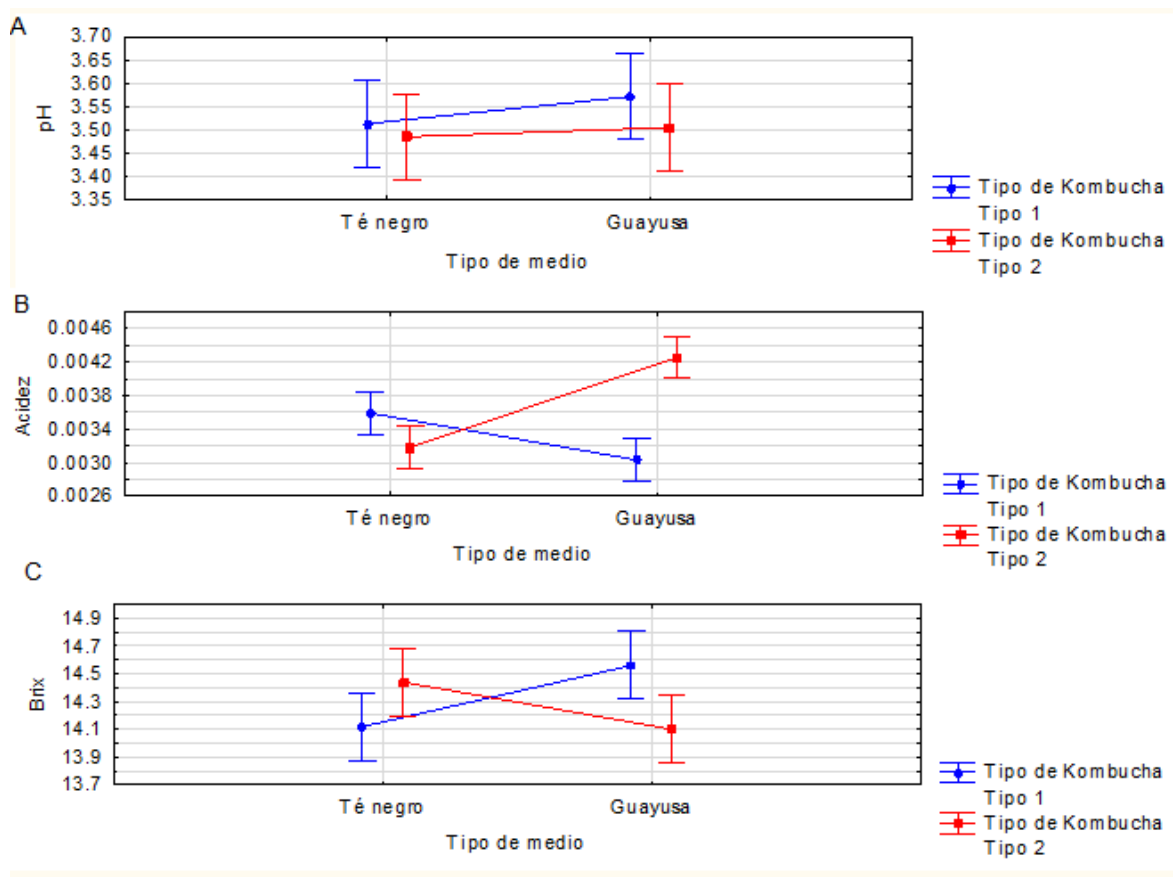
Análisis de parámetros físico-químicos de separación de medias del Factor A (tipos de Kombucha) y Factor B (tipo de especie vegetal) en el día 5

	pH	Acidez	Grados Brix
Tipo 1 * Té negro	3.51 ^A	0.003590 ^B	14.12 ^A
Tipo 1 * Guayusa	3.57 ^A	0.003033 ^A	14.56 ^B
Tipo 2 * Té negro	3.49 ^A	0.003186 ^{AB}	14.44 ^{AB}
Tipo 2 * Guayusa	3.51 ^A	0.004253 ^C	14.10 ^A

Nota: Análisis de separación de medias donde podemos identificar los grupos homogéneos y heterogéneos usando la prueba de tukey.

Figura 11

Gráfica del análisis de varianza de los parámetros físico-químicos pH (A), Acidez (B) Grados Brix (C) correspondiente al día 5 en la Interacción del Factor A (Tipo de Kombucha) Factor B (tipo de especie vegetal)



Nota: El grafico está dividido por tres análisis A pH, B Acidez y C con grados Brix, estos representados en gráficos de medias y de error, corresponden a la interacción del tipo de Kombucha con el tipo de especie vegetal en el día 5.

Figura 11 sección A el pH al día 5 no vario entre las interacciones ya que estas estadísticamente fueron los mismos, en la sección B la acidez presentó una mayor acidez en la interacción Kombucha tipo 2 con Guayusa con 0.004253 mientras que la interacción tipo 1 con guayusa (0.003033) y Kombucha tipo 2 con té negro (0.003186) fueron los que menos acidez presentaron, en la sección C los grados Brix al día 5 aquellos que presentaron mayor cantidad de grados Brix fue tipo 1 con guayusa (14.56) y tipo 2 con té negro (14.44).

Tabla 40

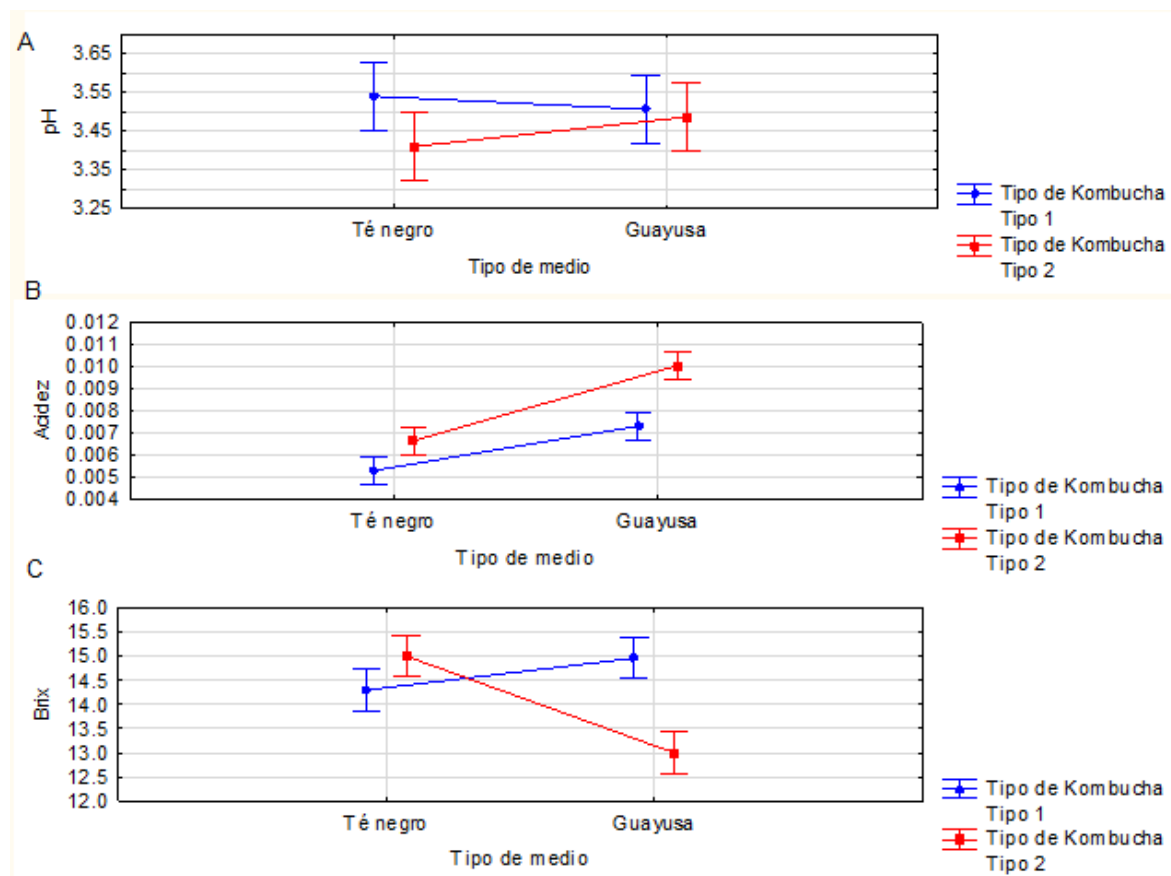
Análisis de parámetros físico-químicos de separación de medias del Factor A (tipo de Kombucha) y Factor B tipos de medio (especies vegetales) en el día 7

	pH	Acidez	Grados Brix
Tipo 1 * Té negro	3.54 ^A	0.005312 ^A	14.30 ^B
Tipo 1 * Guayusa	3.51 ^A	0.007322 ^B	14.96 ^B
Tipo 2 * Té negro	3.41 ^A	0.006666 ^B	15.00 ^B
Tipo 2 * Guayusa	3.49 ^A	0.010051 ^C	13.00 ^A

Nota: Análisis de separación de medias donde podemos identificar los grupos homogéneos y heterogéneos usando la prueba de tukey.

Figura 12

Gráfica del análisis de varianza de los parámetros físico-químicos pH (A), Acidez (B) Grados Brix (C) correspondiente al día 7 en la Interacción del Factor A (Tipo de Kombucha) Factor B (Tipo de especie vegetal)



Nota: El grafico está dividido por tres análisis A pH, B Acidez y C con grados Brix, mismos que están representados en gráficos de medias y de error, corresponden a la interacción del tipo de Kombucha con el tipo de especie vegetal en el día 7.

Figura 12 sección A se puede evidenciar que no existió diferencia significativa en las respectivas interacciones por lo que se entiende que en pH al día 7 entre las interacciones no hay ningún cambio como tal, respecto a la sección B en la acidez se evidencio que la interacción Kombucha tipo 2 con Guayusa presento mayor acidez 0.010051 mientras que la interacción Kombucha tipo 1 con té negro presento la acidez más baja 0.005312, en la sección C en grados Brix se determinó

que la interacción tipo 2 con guayusa fue la que proporcionó menor grados Brix mientras que las otras interacciones fueron iguales y por ende mayores que la mencionada.

Análisis de componentes principales

Tabla 41

Matriz de correlaciones

	pH día 3	Acidez día 3	pH día 5	Acidez día 5	pH día 7	Acidez día 7	Brix día 3	Brix día 5	Brix día 7
pH día 3	1.000	-.058	.873	-.316	.673	-.029	-.139	.282	.127
Acidez día 3	-.058	1.000	-.268	.180	-.207	.453	.346	-.085	-.223
pH día 5	.873	-.268	1.000	-.229	.809	-.037	-.222	.263	.126
Acidez día 5	-.316	.180	-.229	1.000	-.001	.642	.498	-.656	-.876
pH día 7	.673	-.207	.809	-.001	1.000	-.154	-.424	.145	.007
Acidez día 7	-.029	.453	-.037	.642	-.154	1.000	.634	-.245	-.701
Brix día 3	-.139	.346	-.222	.498	-.424	.634	1.000	-.275	-.573
Brix día 5	.282	-.085	.263	-.656	.145	-.245	-.275	1.000	.599
Brix día 7	.127	-.223	.126	-.876	.007	-.701	-.573	.599	1.000

Se puede determinar que existe correlación significativa (tabla 41) en el pH del día 5 con el pH del día 3 este en (0.873), el pH del día 5 y el pH del día 3 con el pH del día 7 (0.673), la acidez del día 5 tuvo de igual manera correlación significativa con la acidez del día 7 (0.642) a su vez la acidez del día 5 con los grados Brix del día 5 siendo esta una correlación negativa (-0.656) y grados Brix del día 7 (-0.876), la acidez del día 7 tuvo una correlación significativa con los grados Brix del día 3 (0.634) y una correlación negativa con los grados Brix del día 7 (-0.701), los grados Brix del día 5 tuvieron una relación positiva con los grados Brix del día 7 (0.599).

Tabla 42

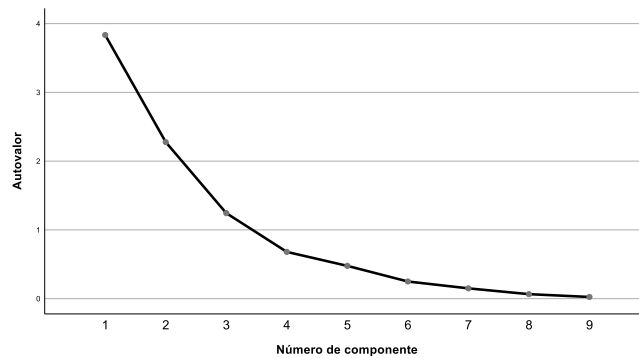
Matriz de componentes principales

	Componente		
	1	2	3
pH día 3	0.543	0.721	0.259
Acidez día 3	-0.439	0.03	0.66
pH día 5	0.581	0.773	0.043
Acidez día 5	-0.819	0.371	-0.326
pH día 7	0.509	0.741	-0.229
Acidez día 7	-0.712	0.44	0.352
Brix día 3	-0.728	0.158	0.362
Brix día 5	0.637	-0.136	0.54
Brix día 7	0.797	-0.484	0.181

Tabla 43

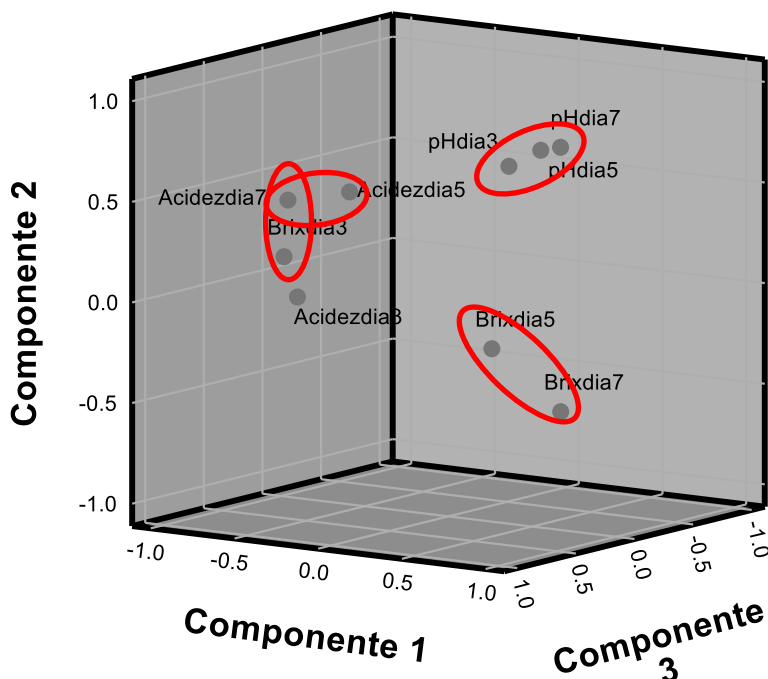
Tabla de varianzas totales

Componente	Autovalores iniciales			Sumas de cargas al cuadrado de la extracción		
	Total	% de varianza	% acumulado	Total	% de varianza	% acumulado
1	3.834	42.604	42.604	3.834	42.604	42.604
2	2.277	25.298	67.901	2.277	25.298	67.901
3	1.244	13.818	81.720	1.244	13.818	81.720
4	0.680	7.557	89.277			
5	0.477	5.297	94.574			
6	0.249	2.769	97.343			
7	0.149	1.661	99.004			
8	0.065	0.725	99.729			
9	0.024	0.271	100.000			

Figura 13*Gráfico de sedimentación*

Se puede identificar en la Figura 13 los tres componentes principales encontrados donde el componente 1 aporta a la reducción 42.6%, el componente 2 aporta 25.30% y el componente 3 aporta 13.82 % en total explica el 81.72% del experimento en un gráfico tridimensional, donde el componente 1 está proporcionado por Brix del día 7, el componente 2 por pH del día 5 y el componente 3 por la acidez del día 3.

Figura 14*Gráfico de componentes principales*



En la figura 14 se evidencio como la acidez del día 7 y la acidez del día 5 los compone el componente 2 el cual está compuesto por el pH 5 de igual manera el componente 1 está compuesto por el pH del día 3, 5 y 7, componiendo en los planos las agrupaciones más influyentes como la acidez del día 7 con la acidez del día 5, de igual manera la acidez del día 7 con los grados Brix del día 3 mientras que el otro grupo influyente está compuesto por el pH de los días 3, 5 y 7, el componente 1 también relaciona los grados Brix del día 5 y los del día 7 los cuales están relacionados como tal.

Unidad formadora de colonias

UFC por individual en los diferentes días

Tabla 44

Análisis de varianza de UFC de bacterias aerobias día 3

Efecto	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	F-valor	P-valor
--------	-------------------	----	------------------	---------	---------

Tipo de Kombucha (A)	1.245005E+08	1	1.245005E+08	72.46	0.000002
Tipo de medio (B)	6.204980E+08	1	6.204980E+08	361.16	0.000000
I A*B	1.291844E+10	1	1.291844E+10	7519.10	0.000000
Replicas	1.434500E+07	4	3.586250E+06	2.09	0.145572
Error	2.061700E+07	12	1.718083E+06		

Nota: en la tabla se muestra el análisis de varianza de UFC de bacterias aerobias en el día 3 de la fermentación del té.

Tabla 45

Análisis de varianza de UFC de mohos y levaduras en el día 3

Efecto	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	F-valor	P-valor
Tipo de Kombucha (A)	306701120	1	306701120	5371.376	0.000000
Tipo de medio (B)	153568820	1	153568820	2689.511	0.000000
I A*B	226329920	1	226329920	3963.804	0.000000
Replicas	43730	4	10933	0.191	0.938236
Error	685190	12	57099		

Nota: en la tabla se muestra el análisis de varianza de UFC de mohos y levaduras en el día 3 de la fermentación del té.

En el análisis de varianza de petrifilm correspondiente a bacterias aerobias del día 3 (tabla 44) se determinó que el tipo de Kombucha si presenta influencia en sus niveles puesto que el valor obtenido de la probabilidad cumple con la media estándar $0.05 > P$ ($0,05 > 0,000002$), en el tipo de especie vegetal se determinó que el sustrato suministrado tuvo influencia por parte de los medios ya que la probabilidad proporcionada resultó ser menor a la que se toma como referencia $0.05 > P$ ($0.05 > 0.000000$), respecto a la interacción se evidencio diferencia significativa ya que el valor al ser comparado con la media estándar $0.05 > P$ cumple con la premisa ($P > 0.000000$).

En el análisis de varianza de petrifilm mohos y levaduras del día 3 (tabla 45) se pudo identificar que el tipo de Kombucha tuvo diferencia significativa ya que el valor comparado con la media $0.05 > P$ cumple con la relación ($0,05 > 0,000000$) por

lo cual se puede mencionar que sus niveles estadísticamente son diferentes, en cuanto al tipo de especie vegetal se determinó que hay diferencia significativa ya que al ser comparado con la media estándar $0.05 > P$ cumple ($P > 0.000000$), respecto a la interacción se evidencio diferencia significativa ya que el valor al ser comparado como la media estándar $0.05 > P$ cumple con la premisa ($P > 0.000000$).

Tabla 46

Análisis de varianza de UFC de bacterias aerobias en el día 5

Efecto	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	F-valor	P-valor
Tipo de Kombucha (A)	1.718445E+08	1	1.718445E+08	105.28	0.000000
Tipo de medio (B)	8.112195E+08	1	8.112195E+08	496.98	0.000000
I A*B	1.153801E+10	1	1.153801E+10	7068.59	0.000000
Replicas	5.737500E+06	4	1.434375E+06	0.88	0.505087
Error	1.958750E+07	12	1.632292E+06		

Nota: en la tabla se muestra el análisis de varianza de UFC de bacterias aerobias en el día 5 de la fermentación del té.

Tabla 47

Análisis de varianza de UFC de mohos y levaduras en el día 5

Efecto	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	F-valor	P-valor
Tipo de Kombucha (A)	122784901	1	122784901	1021.849	0.000000
Tipo de medio (B)	72942901	1	72942901	607.050	0.000000
I A*B	95506351	1	95506351	794.829	0.000000
Replicas	662905	4	165726	1.379	0.298674
Error	1441915	12	120160		

Nota: en la tabla se muestra el análisis de varianza de mohos y levaduras en el día 5 de la fermentación del té.

En el análisis de varianza de petrifilm correspondiente a bacterias aerobias del día 5 (tabla 46) se determinó que tanto el tipo de Kombucha, el tipo de especie vegetal y la interacción tuvieron diferencia significativa, por tanto, se evidenció que el valor

generado en el tipo de Kombucha comparado al de la medida $0.05 > P$ cumple con la relación ($0.05 > 0.000000$) por lo que se puede destacar que sus niveles proporcionan datos estadísticamente diferentes. Con respecto al tipo de especie vegetal se evidenció que se presentó diferencia significativa ya que al ser comparado con la medida estándar $0.05 > P$ se cumple la relación ($0.05 > 0.000000$) y referente a la interacción se pudo determinar que existe diferencia significativa debido a que el valor obtenido es inferior a $0.05 > P$ el cual es de ($0.05 > 0.000000$). El análisis de varianza de petrifilm de mohos y levaduras del día 5 (tabla 47) se identificó que el tipo de Kombucha comparado a la medida $0.05 > P$ cumple con la relación ($0.05 > 0.000000$) por lo que se puede señalar que sus niveles proporcionan datos estadísticamente distintos. En referencia al tipo de especie vegetal se determinó que se existe diferencia significativa ya que al ser comparado con la medida estándar $0.05 > P$ se cumple la relación ($0.05 > 0.000000$) y respecto a la interacción se pudo observar que existe diferencia significativa, ya que el valor obtenido es inferior a $0.05 > P$ lo cual cumple con la relación ($0.05 > 0.000000$).

Tabla 48

Análisis de varianza UFC de bacterias aerobias en el día 7

Efecto	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	F-valor	P-valor
Tipo de Kombucha (A)	4140500	1	4140500	290.5614	0.000000
Tipo de medio (B)	4140500	1	4140500	290.5614	0.000000
I A*B	4140500	1	4140500	290.5614	0.000000
Replicas	57000	4	14250	1.0000	0.444946
Error	171000	12	14250		

Nota: en la tabla se muestra el análisis de varianza de UFC de bacterias aerobias en el día 7 de la fermentación del té.

Tabla 49*Análisis de varianza de mohos y levaduras 7*

Efecto	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	F-valor	P-valor
Tipo de Kombucha (A)	593401	1	593401	216.999	0.000000
Tipo de medio (B)	10592401	1	10592401	3873.497	0.000000
I A*B	593401	1	593401	216.999	0.000000
Replicas	14105	4	3526	1.290	0.328110
Error	32815	12	2735		

Nota: en la tabla se muestra el análisis de varianza de mohos y levaduras en el día 7 de la fermentación del té.

En el análisis de varianza de petrifilm de bacterias aerobias del día 7 (tabla 48) se determinó que el tipo de Kombucha presenta influencia en sus niveles ya que el valor obtenido cumple con ($0,05 > 0,000000$), en el tipo de especie vegetal se determinó que el sustrato suministrado tuvo influencia por parte de los medios ya que la probabilidad proporcionada resultó ser ($0,05 > 0,000000$), respecto a la interacción se evidencio diferencia significativa ya que el valor al ser comparado como la media estándar $0,05 > P$ cumple con la premisa ($P > 0,000000$).

En el análisis de varianza de petrifilm de mohos y levaduras del día 7 (tabla 49) se pudo identificar que el tipo de Kombucha tuvo diferencia significativa ya que el valor comparado con la media $0,05 > P$ cumple con la relación ($0,05 > 0,000000$) por lo cual se puede mencionar que sus niveles estadísticamente son diferentes, en cuanto al tipo de especie vegetal se determinó que hay diferencia significativa ya que al ser comparado con la media estándar $0,05 > P$ cumple ($P > 0,000000$), respecto a la interacción se evidencio diferencia significativa ya que el valor al ser comparado como la media estándar $0,05 > P$ cumple con la premisa ($P > 0,000000$).

Factor A (Tipo de Kombucha)**Tabla 50**

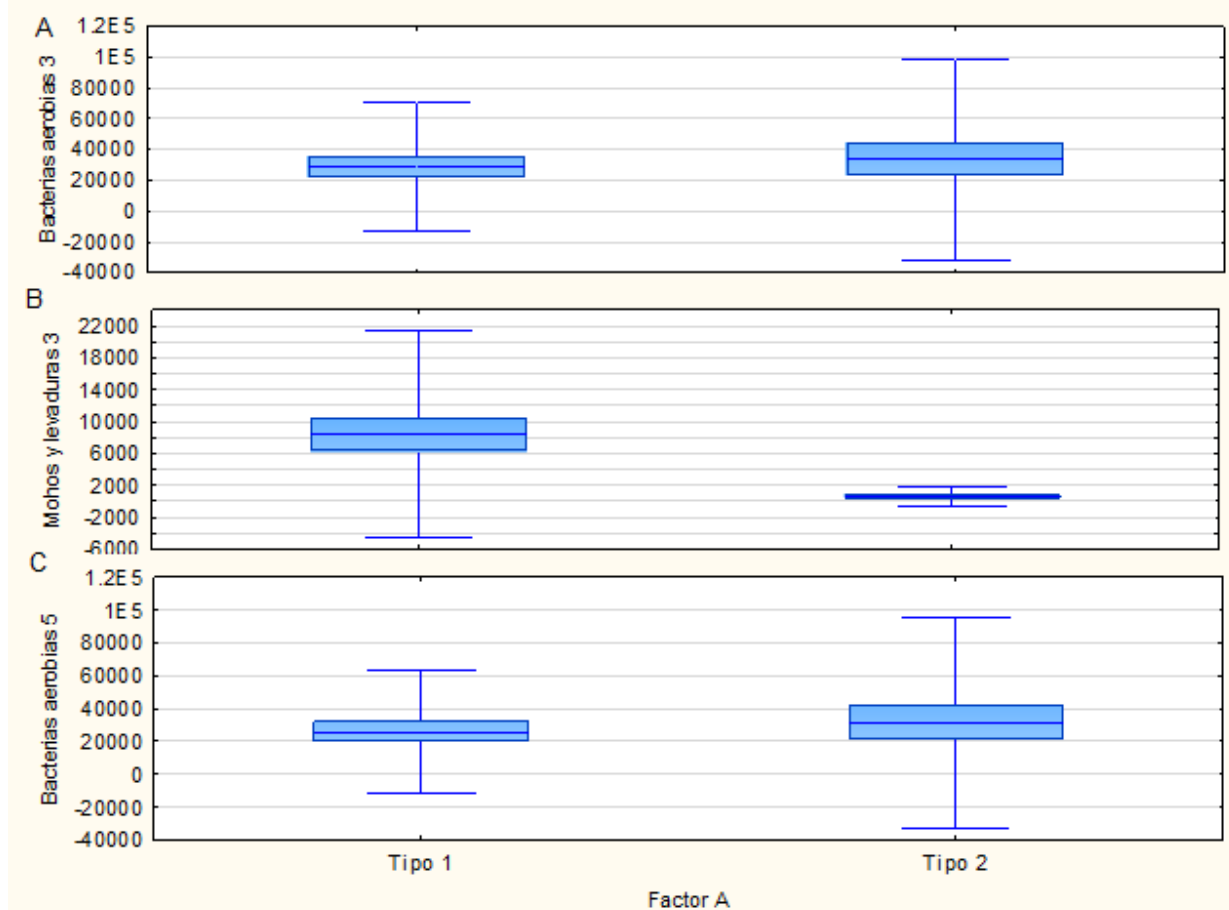
Análisis de separación de medias con prueba de Tukey para el Factor A (tipos de Kombucha) en los días 3, 5 y 7.

	Bacterias aerobias 3	Mohos y levaduras 3	Bacterias aerobias 5
Tipo 1	28555 A	8425 B	25950 A
Tipo 2	33545 B	593 A	31813 B
	Mohos y levaduras 5	Bacterias aerobias 7	Mohos y levaduras 7
Tipo 1	5505 B	0 A	556 A
Tipo 2	550 A	910 B	900 B

Nota: análisis de separación de medias para identificar grupos homogéneos y heterogéneos haciendo uso de la prueba de Tukey.

Figura 15

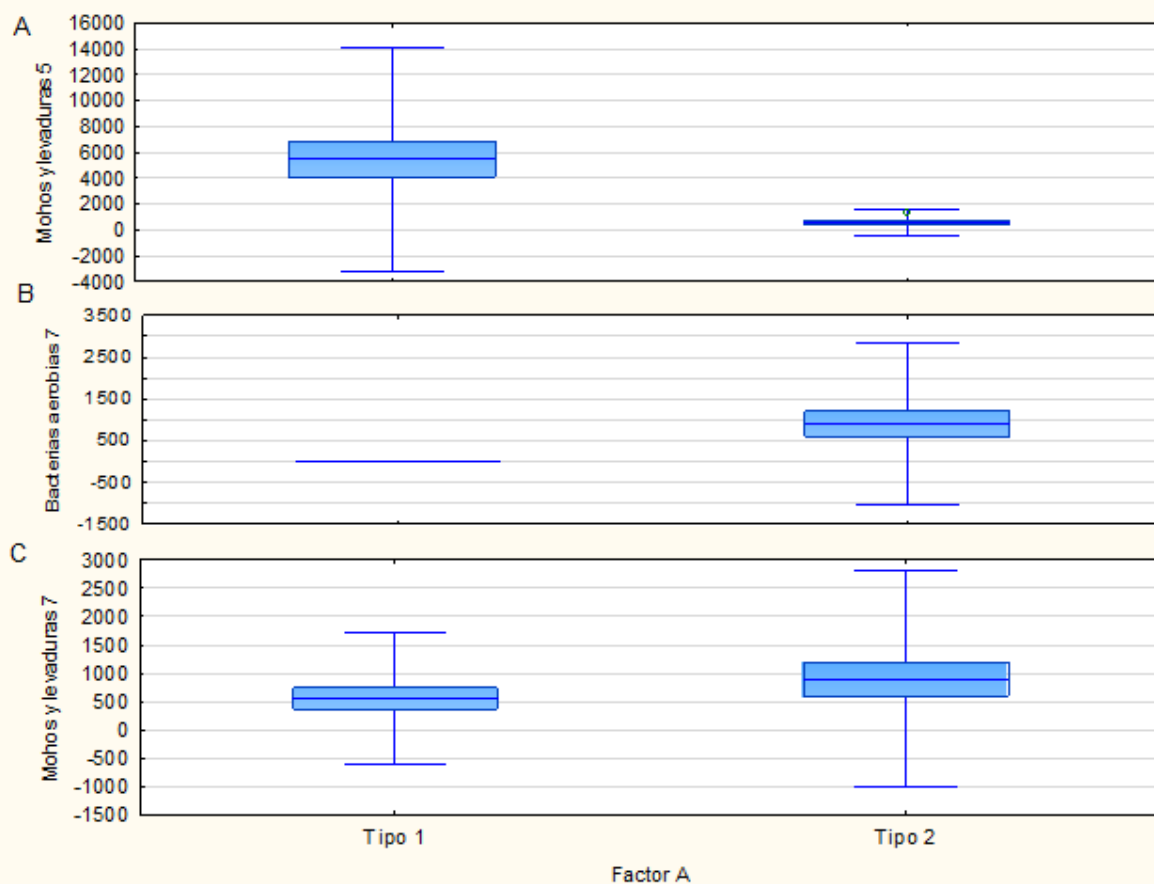
Gráfica del análisis de varianza para las UFC de bacterias aerobias (A), mohos y levaduras (B) en el día 3, bacterias aerobias (C) del día 5 correspondiente al Factor A (tipo de Kombucha)



Nota: el gráfico se encuentra establecido por tres análisis de UFC para bacterias aerobias en el día 3 (A), mohos y levaduras en el día 3 (B) y bacterias aerobias en el día 5 (C), dichas representaciones gráficas están representadas en forma de cajas y bigotes y los cuales corresponden al Factor A o tipo de Kombucha en el día 3 y 5.

Figura 16

Gráfica del análisis de varianza para las UFC de mohos y levaduras (A) en el día 5, bacterias aerobias (B), mohos y levaduras (C) en el día 7 correspondiente al Factor A (tipo de Kombucha)



Nota: el gráfico se encuentra establecido por tres análisis de UFC para mohos y levaduras en el día 5 (A), bacterias en el día 7 (B) y mohos y levaduras en el día 7 (C), los gráficos están representadas en forma de cajas y bigotes, los mismos corresponden al Factor A o tipo de Kombucha en el día 5 y 7.

La figura 15 en la sección A se identificó diferencia significativa en el parámetro bacterias aerobias en el día 3, ya que la Kombucha tipo 2 presento una media de 33545 la cual es mayor a la Kombucha tipo 1 que alcanzó una media de 28555, en la sección B se pudo evidenciar que hay diferencia significativa con respecto a las UFC de mohos y levaduras en el día 3, presentando la Kombucha tipo

1 una media de 8425 valor que es mayor a comparación de la Kombucha tipo 2 con una media de 593.

En la sección C se observó que existe diferencia significativa por lo que se puede mencionar que el tipo de Kombucha tipo 1 es estadísticamente distinta de la Kombucha tipo 2, ya que se puede determinar que la Kombucha tipo 2 es mayor con 31813 respecto a la Kombucha tipo 1 que tiene una media de 25950.

En la figura 16 de la sección A correspondiente al parámetro de UFC de mohos y levaduras en el día 5, se pudo identificar que existe diferencia significativa, debido a que la Kombucha tipo 1 presento una media de 5505 siendo mayor a la media de la Kombucha tipo 2 de 550.

Por otra parte, en la sección B respecto al parámetro de bacterias aerobias en el día 7 se observa que hay diferencia significativa, ya que en la Kombucha tipo 1 no hay presencia de UFC de bacterias aerobias, mientras que la Kombucha tipo 2 presentó una media de 910. Respecto a la sección C correspondiente al parámetro mohos y levaduras se presentó diferencia significativa entre los dos tipos de Kombucha, siendo la Kombucha tipo 2 la que presenta mayor cantidad de UFC de mohos y levaduras con una cantidad de 900 a comparación a al Kombucha tipo 1 que presentó una cantidad de 556.

Factor B (Tipo de especie vegetal)

Tabla 51

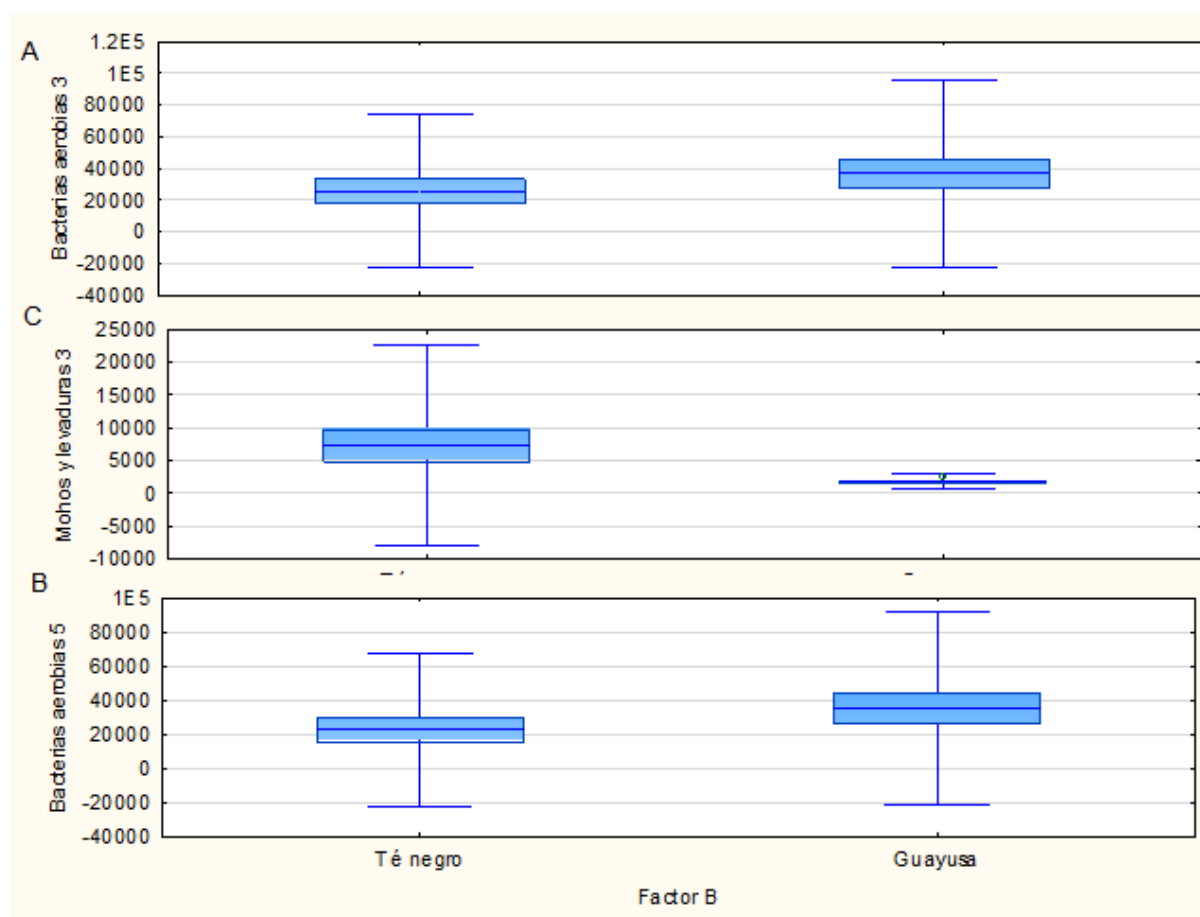
Análisis de separación de medias de las UFC con prueba de Tukey para el Factor B (tipo de especie vegetal) en los días 3, 5 y 7.

	Bacterias aerobias 3	Mohos y levaduras 3	Bacterias aerobias 5
Té negro	25480 A	7280 B	22513 A
Guayusa	36620 B	1738 A	35250 B
	Mohos y levaduras 5	Bacterias aerobias 7	Mohos y levaduras 7
Té negro	4937 B	910 B	0 A
Guayusa	1118 A	0 A	1456 B

Nota: análisis de separación de medias para identificar grupos homogéneos y heterogéneos haciendo uso de la prueba de Tukey en las pruebas de petrifilm.

Figura 17

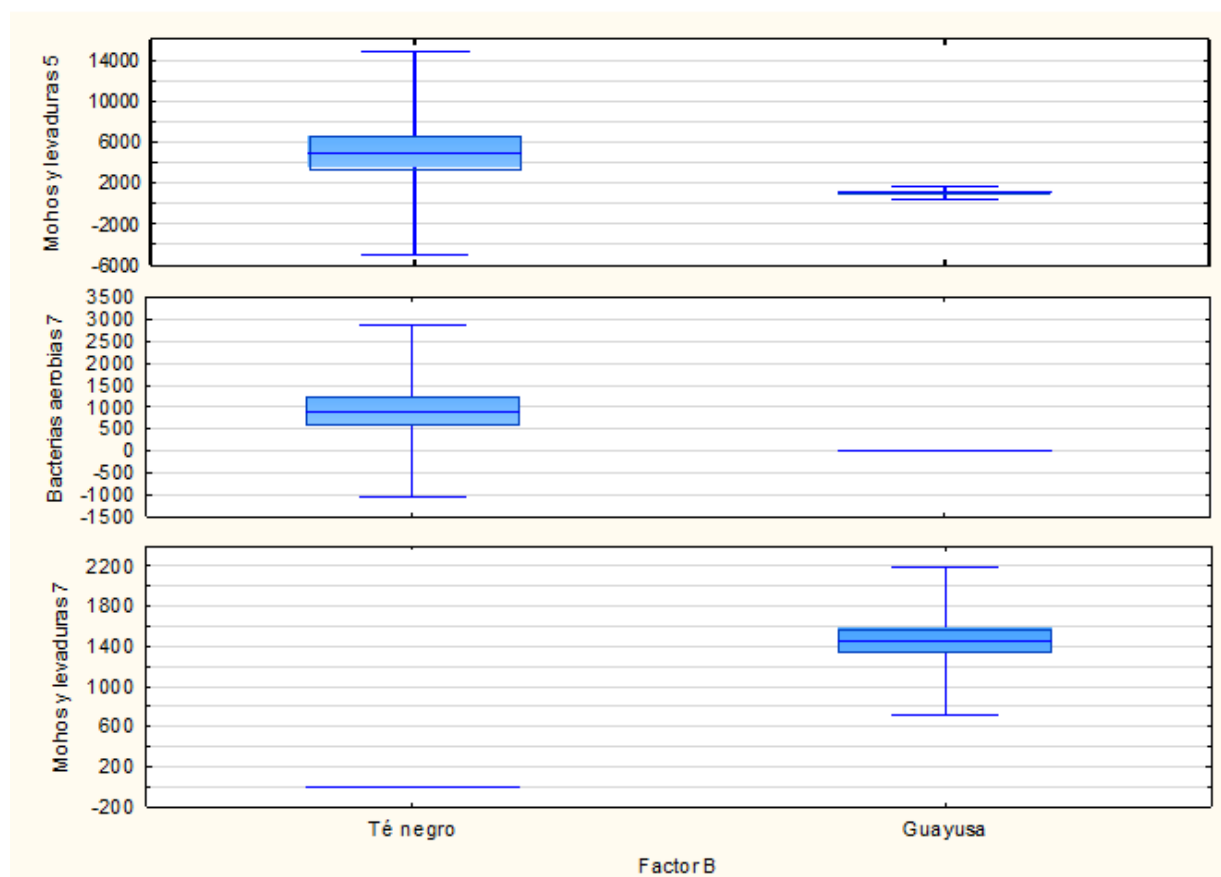
Gráfica del análisis de varianza para las UFC de bacterias aerobias (A), mohos y levaduras (B) en el día 3, bacterias aerobias (C) del día 5 correspondiente al Factor B (tipo de especie vegetal)



Nota: el gráfico se encuentra establecido por tres análisis de UFC para bacterias aerobias en el día 3 (A), mohos y levaduras en el día 3 (B) y bacterias aerobias en el día 5 (C), dichas representaciones gráficas están representadas en forma de cajas y bigotes y los cuales corresponden al Factor B o tipo de especie vegetal en el día 3 y 5.

Figura 18

Gráfica del análisis de varianza para las UFC de mohos y levaduras (A) en el día 5, bacterias aerobias (B), mohos y levaduras (C) en el día 7 correspondiente al Factor B (tipo de especie vegetal)



Nota: el gráfico se encuentra establecido por tres análisis de UFC para mohos y levaduras en el día 5 (A), bacterias en el día 7 (B) y mohos y levaduras en el día 7 (C), los gráficos están representadas en forma de cajas y bigotes, los mismos corresponden al Factor B tipo de especie vegetal en el día 5 y 7.

En la figura 17 se observa que para el factor B con los niveles del té negro y té de guayusa en la sección A se identificó diferencia significativa para bacterias aerobias en el día 3, puesto que el té de guayusa presento una media de 36620 UFC mientras que el té de negro alcanzo una media menor de 25480, en la sección B se pudo evidenciar que hay diferencia significativa con respecto a las UFC de

mohos y levaduras en el día 3, presentando el té negro una media de 7280 valor que es mayor a comparación del té de guayusa con una media de 1738.

En la sección C se observó que para bacterias aerobias existe diferencia significativa por lo que se puede mencionar que el té de guayusa es estadísticamente distinto del té negro, ya que se puede observar que el té de guayusa es mayor con 35250 UFC respecto del té negro que tiene una media de 22513.

En la sección A de la figura 18 correspondiente al parámetro de UFC de mohos y levaduras en el día 5, se pudo identificar que existe diferencia significativa, debido a que el té negro presento una media de 4937 siendo mayor a la media del té de guayusa de 1118.

Por otra parte, en la sección B respecto al parámetro de bacterias aerobias en el día 7 se observa que hay diferencia significativa, ya que el té de guayusa no presento de UFC, mientras el té negro presentó una media de 910. Respecto a la sección C correspondiente a mohos y levaduras se presentó diferencia significativa entre las dos especies vegetales, siendo el té de guayusa que presenta mayor cantidad de UFC con una cantidad de 1456 a comparación del té negro que no presentó UFC.

Interacción A X B (Tipo de Kombucha con tipo de especie vegetal)

Tabla 52

Análisis de separación de medias con prueba de Tukey para la interacción entre el Factor A (tipos de Kombucha) y Factor B (tipo de especie vegetal) en los días 3, 5 y 7.

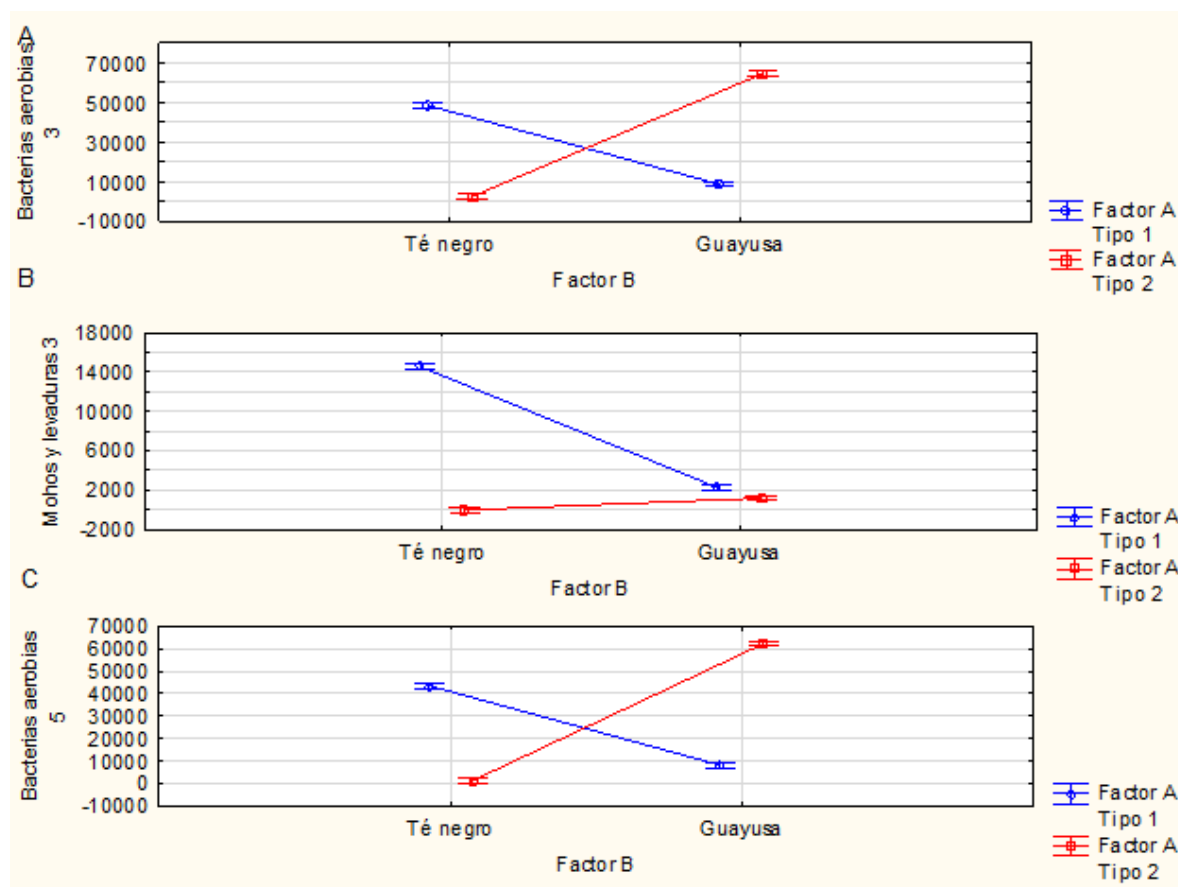
	Bacterias aerobias 3	Mohos y levaduras 3	Bacterias aerobias 5
A0B0	48400 C	14560 D	43600 C
A0B1	8710 B	2290 C	8300 B
A1B0	2560 A	0 A	1425 A
A1B1	64530 D	1186 B	62200 D
	Mohos y levaduras 5	Bacterias aerobias 7	Mohos y levaduras 7
A0B0	9600 C	0 A	0 A

A0B1	1410 B	0 A	1111 B
A1B0	274 A	1820 B	0 A
A1B1	825 AB	0 A	1800 C

Nota: análisis de separación de medias para identificar grupos homogéneos y heterogéneos haciendo uso de la prueba de Tukey.

Figura 19

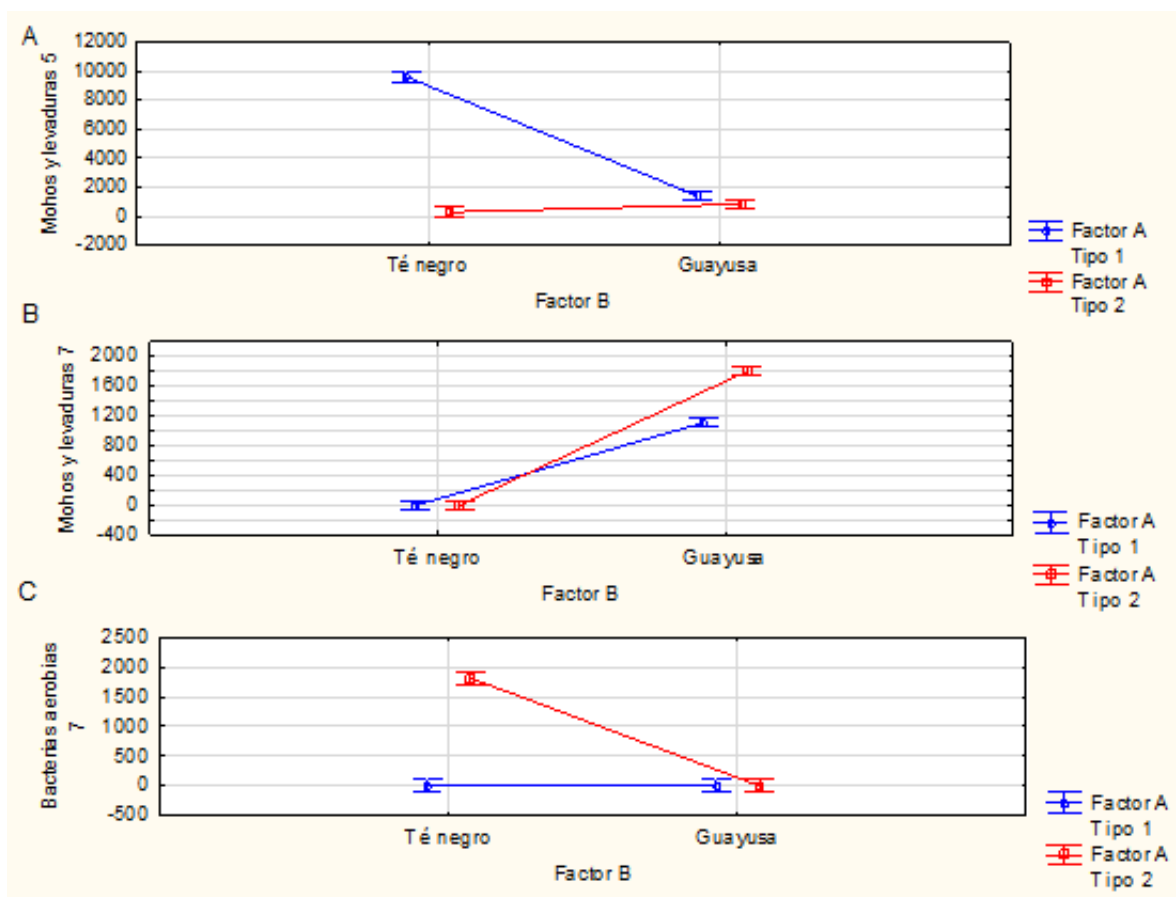
Gráfica del análisis de varianza con prueba de Tukey para las UFC de bacterias aerobias (A), mohos y levaduras (B) en el día 3, bacterias aerobias (C) del día 5 correspondiente a la interacción entre Factor A (tipo de Kombucha) y Factor B (tipo de especie vegetal)



Nota: el gráfico se encuentra dispuesto en tres análisis correspondientes a bacterias aerobias (A) en el día 3, mohos y levaduras (B) en el día 3, bacterias aerobias (C) en el día 5, dichos gráficos se representan en forma de medias y de error los cuales corresponden a la interacción del tipo de Kombucha con el tipo de té empleado tanto para el día 3 y el día 5.

Figura 20

Gráfica del análisis de varianza con prueba de Tukey para las UFC de mohos y levaduras en el día 5 (A), bacterias aerobias en el día 7 (B), mohos y levaduras en el día 7 (C), correspondiente a la interacción entre Factor A (tipo de Kombucha) y Factor B (Tipo de especie vegetal).



Nota: el gráfico se encuentra dispuesto en tres análisis correspondientes a mohos y levaduras (B) en el día 5, bacterias aerobias (C) en el día 7 y mohos y levaduras en el día 7 (C), dichos gráficos se representan en forma de medias y de error mismos que corresponden a la interacción del tipo de Kombucha con el tipo de té empleado tanto para el día 5 y el día 7.

La figura 19 en la sección A correspondiente a bacterias aerobias en el día 3, se identificó diferencias significativas entre las interacciones, evidenciando de tal manera que la interacción de la Kombucha tipo 2 con té de guayusa (A1B1) tiene la

mayor cantidad de UFC de bacterias aerobias con un valor de 64530 mientras que la interacción de Kombucha tipo 1 con té negro (A0B0) presento un valor de 48400 siendo el segundo más alto mientras que las interacciones que presentaron valores inferiores fueron Kombucha tipo 1 con té de guayusa (8710) y la interacción de Kombucha tipo 2 con té negro (2560).

Por otra parte, en la sección B se pudo observar que también existe diferencia significativa entre las interacciones de los factores correspondientes al día 3, por lo cual se observa que la interacción de tipo de Kombucha tipo 1 con té negro presenta el valor más alto de UFC de mohos y levaduras con 14560 mientras que la interacción que no presentó UFC de este parámetro fue la interacción Kombucha tipo 2 con té negro y las interacciones que presentaron menor cantidad de UFC de mohos y levaduras fue Kombucha tipo 2 con té de guayusa (A1B1) con 1186 y Kombucha tipo 1 con té de guayusa con 2290.

En la sección C de la figura 19 se evidenció que hay diferencia significativa entre las interacciones para el día 5, siendo la interacción de Kombucha tipo 2 con té de guayusa con mayor cantidad de UFC de bacterias aerobias con 62200, mientras que la interacción que presentó menor cantidad de bacterias aerobias fue la Kombucha tipo 2 con té negro con 1425.

La sección A de la figura 20 correspondiente al parámetro mohos y levaduras en el día 5, se evidenció diferencias significativas entre las interacciones analizadas, siendo la interacción de Kombucha tipo 1 con té negro la que presentó mayor cantidad de UFC con un valor de 9600 mientras que la interacción de Kombucha tipo 2 con té negro presentó la cantidad más baja de UFC de mohos y levaduras con 274.

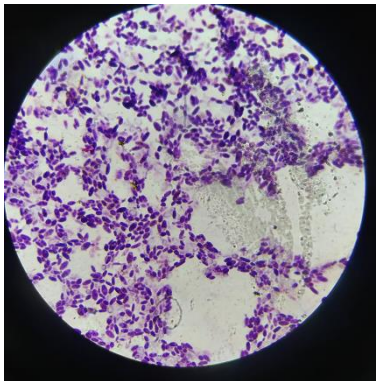
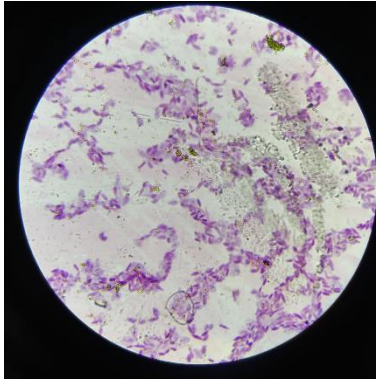
En la sección B que corresponde a bacterias aerobias en el día 7, se observó que si existió diferencia significativa entre las interacciones correspondientes puesto que la interacción de Kombucha tipo 2 con té negro fue la única que presento un valor de 1820 UFC y en la sección C que respecta a UFC de mohos y levaduras se

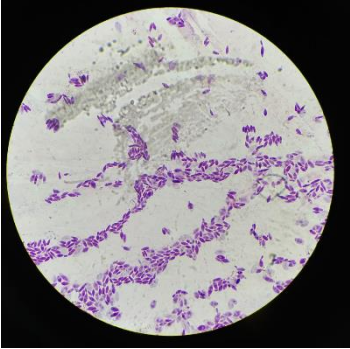
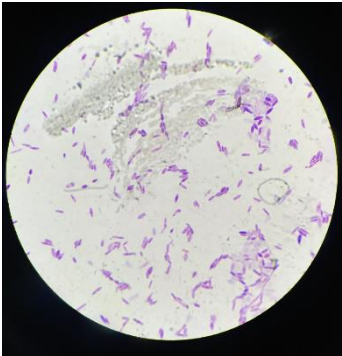
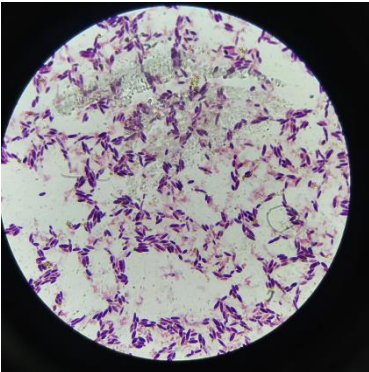
evidenció que también existe diferencia significativa, siendo la interacción de Kombucha tipo 2 con té de guayusa la que presentó un valor de 1800, a su vez también presentó UFC la interacción de Kombucha tipo 1 con té de guayusa con 1111 mientras que en las otras interacciones no generó UFC para mohos levaduras en el día 7.

Caracterización morfológica

Tabla 53

Pruebas microbiológicas e identificación microbiana de los distintos microorganismos

Tratamiento	Características	Tinción Gram
Día 3		
a1b0	Gram positivo Catalasa positiva Oxidasa negativa	
a1bo	Gram positivo Catalasa positiva Oxidasa negativa	

aob1	Gram positivo Catalasa positiva Oxidasa negativa	
Día 5		
a0b0	Gram positivo Catalasa positiva Oxidasa negativa	
Día 7		
a1b1	Gram positivo Catalasa positiva Oxidasa negativa	

En la tabla 53 se evidencio que en el día 3 de la fermentación de la Kombucha existió crecimiento de microorganismo para el tratamiento a1bo (tipo 2 con té negro) y a0b1, así como en el día 5 en el tratamiento a0b0 (tipo 1 con té negro) y para el día 7 en el tratamiento a1b1 (tipo 2 con té de guayusa), obteniendo así microorganismos gram positivos, catalasa positiva y oxidasa negativa.

Capítulo IV

Discusión

Respecto al pH

(Factor A) Tipo de Kombucha

De acuerdo a los resultados obtenidos se pudo evidenciar que no existió diferencia significativa en los valores de pH generados en los días 3, 5 y 7. Puesto que, el “tipo 1” a los 3 días marcó un pH de 3.58 y al finalizar los 7 días logró 3.45; a diferencia del “tipo 2” que registró un pH de 3.51 a los 3 días y culminó con 3.45 a la semana; lo cual se debe a la composición de microbiota que contiene cada tipo de Kombucha, esto está relacionado directamente con el proceso de fermentación y la actividad metabólica de los microorganismos, ya que son diferentes bacterias y levaduras las que se encargan de metabolizar la sacarosa de los diferentes ácidos orgánicos (Vázquez, 2021), por tanto, se puede mencionar que la reducción del pH en los días 3, 5 y 7 en comparación con el pH inicial del día 0, se debe a la dominancia del ácido acético en la fermentación (Jakubczyk et al., 2020). El pH de la Kombucha se genera a partir del ácido acético y glucónico los mismo que se encargan del sabor característico de la bebida a obtener, sin embargo, el pH no debe ser menor que 3 puesto que causaría daño al tracto digestivo ya que poseerían el mismo pH (Granda & Estupiñan, 2019).

(Factor B) Tipo de especie vegetal

Conforme a los resultados que se obtuvieron con respecto al factor B, se logró determinar que no existieron diferencias significativas en los valores de pH que correspondían a los días 3, 5 y 7. Puesto que en el caso del té negro en el día 3 se obtuvo un pH de 3.51 llegando al día 7 con 3.47; mientras que, la guayusa a los 3

días de fermentación poseía un pH de 3.58 pero, al finalizar los 7 días disminuyó a 3.50.

Dichos valores se asemejan a los obtenidos por Moya (2020) quien, con té negro al tercer día registró un pH de 3.6 llegando a 3.3 en el séptimo día. Por otra parte, en el caso de la guayusa se manifestó un pH que se mantuvo en 3.8 del día 3 al 7.

La diferencia de pH determinada en las dos especies vegetales utilizadas, puede ser atribuible a la cantidad de fenolasas que posee el té negro; puesto que, estas enzimas trabajan sobre la oxidación de ciertos polifenoles haciendo que el medio se acidifique más con su actividad (Morales, 2014). Lo que sustentaría la ligera variación entre el pH de la Kombucha con té negro frente al pH de la bebida a base de té de guayusa.

(Factor AXB) Tipo de Kombucha con tipo de especie vegetal

En cuanto a las interacciones del factor A (Tipo de Kombucha) y B (Tipo de especies vegetales), se pudo evidenciar la ausencia de diferencias significativas en los valores de pH correspondientes a los días 3, 5 y 7. Al finalizar las evaluaciones se determinó que las interacciones con Kombucha Tipo 1 obtuvieron un pH entre 3.51 y 3.54. A diferencia de las interacciones con Kombucha tipo 2 que se establecieron entre 3.41 y 3.49.

Sin embargo, es preciso acotar que solamente los tratamientos donde se utilizó Kombucha tipo 1 se encuentran dentro del rango que sugiere Bustillos Ortiz (2011) ya que señala como pH óptimo para la fermentación de Kombucha, a un rango entre 3.5 a 4.5. Livisaca (2021) manifiesta que, cuando la Kombucha alcanza un pH de 3.5 se pueden llevar a cabo dos acciones; embotellarla y refrigerarla o continuar con una segunda fermentación, al añadirle hierbas aromáticas o pulpas, que le agreguen sabor a la bebida.

Respecto a la acidez

(Factor A) Tipo de Kombucha

Con respecto a la acidez, esta no presentó diferencias significativas en el día 3, no obstante, a partir del día 5 hasta el 7 las diferencias significativas se acentuaron entre los tipos de Kombucha que, para el tipo 1 se situó en 0.006317 y para el tipo 2 en 0.008358. Estos resultados pueden estar relacionados con las poblaciones microbianas que poseen los dos tipos de Kombucha utilizados en esta investigación conforme a lo expresado por Guzmán (2021). Puesto que, las levaduras que forman parte del consorcio de microorganismos se encargan de transformar la sacarosa en alcohol para posteriormente procesarla y producir ácido acético debido a la acción de las bacterias (Livisaca, 2021).

(Factor B) Tipo de especie vegetal

Para este factor, las diferencias significativas se presentaron desde el día 3 y se mantuvieron distintas en el día 5 y 7. Por lo cual, al finalizar los registros, en el día 7 el té negro logró una acidez de 0.005989 mientras que la guayusa alcanzó 0.008686 de acidez. Valores que se diferencian de los obtenidos por Moya (2020) que se sitúan entre 0.14 y 0.51 para té negro; mientras que, en el caso de la guayusa, alcanzó 0.09 y 0.32 para los días 3 y 7 respectivamente. Conforme a Suhre (2020) la fermentación debe terminar cuando la acidez total alcanza el ideal de 4 a 5 g/L.

(Factor AXB) Tipo de Kombucha con tipo de especie vegetal

Para las interacciones del factor A (Tipos de Kombucha) y B (Tipo de especie vegetal), existieron diferencias significativas en los días de evaluación 5 y 7. Sin embargo, en el día 7 se determinaron 3 agrupaciones distintas, siendo las

interacciones: Kombucha tipo 2 con Guayusa la menos ácida (0.010051) y Kombucha tipo 1 con Té negro la más ácida (0.005312).

La mayoría de los beneficios para la salud asociados a Kombucha se refiere a una proporción adecuada entre el ácido acético y ácido glucónico de estos componentes en la bebida. Sin embargo, la presencia de ácido acético puede estimular la producción de etanol por levaduras y un sabor más ácido y astringente a diferencia del ácido glucónico que desarrolla un sabor más leve (Suhre, 2020).

Respecto a los grados Brix

(Factor A) Tipo de Kombucha

Con respecto a este factor, sí se presentaron diferencias significativas en los días 3 y 7. Por lo cual, al finalizar los registros en el día 7, se logró una cantidad más baja de grados Brix para el tipo 2 (14) y una mayor cantidad para la Kombucha tipo 1 (14.63). Conforme a los grados Brix, se definen como los sólidos disueltos, es decir; ácidos orgánicos, alcoholes y sales presentes en el medio (Solis & Zambrano, 2021). Por lo cual, al poseer las levaduras una especial especificidad por la sacarosa (Livisaca, 2021), se considera que la Kombucha tipo 1 poseía una menor población de levaduras a diferencia de la Kombucha tipo 2 en el séptimo día de la fermentación, lo que se sustenta por lo expresado por quienes aseguran que en el séptimo día se produce un cambio de dominio de las levaduras a las BAL (Jakubczyk et al., 2020).

(Factor B) Tipo de especie vegetal

En este factor las diferencias significativas no se mostraron sino hasta el séptimo día, donde se obtuvo una menor cantidad de grados Brix en guayusa (13.98) frente al té negro (14.65). Valores que se diferencian de los obtenidos por Moya (2020) ya que evidenció 16.6 grados Brix con guayusa; sin embargo, en el té negro, el valor para esta variable si se relaciona al obtenido en este estudio, ya que

se situó en 13.60. Cabe destacar, que a medida que se produce la hidrólisis de la molécula de sacarosa, se generan productos y es posible que exista también una fracción de la misma que no se ha hidrolizado por lo cual, el azúcar en la disolución es mayor, ocurriendo así el incremento del pH (Novillo, 2021).

(Factor AXB) Tipo de Kombucha con tipo de especie vegetal

Aunque al inicio para las interacciones del factor A (Tipos de Kombucha) y B (Tipo de especie vegetal), no se presentaron diferencias significativas, no fue sino a partir del quinto día que se empezó a notar diferencias estadísticas entre las interacciones, logrando a los 7 días la menor cantidad de grados Brix en la Kombucha tipo 2 con Guayusa (13) y mayor cantidad en Kombucha tipo 2 con Té negro (15). Las diferencias demuestran que la disminución de los sólidos solubles en grados Brix, además del tipo de sustrato utilizado depende del tipo de Kombucha. No obstante, conforme a la norma INEN 2304:2017:-04 el máximo valor para este tipo de bebidas abarca hasta los 15° Brix para el consumo humano (INEN, 2017), por lo cual se considera que los dos tipos de bebidas se encuentran dentro del rango aceptado.

Respecto a los tipos de petrifilm usados

Respecto a bacterias aerobias

(Factor A) Tipo de Kombucha

Con Respecto a las UFC de las bacterias aerobias, Morales (2014), ha reportado un recuento de 960 UFC/ml, resultado que se asemeja a lo obtenido en el presente estudio; puesto que, solo con el tipo 2, se logró 910 UFC/mL. La reducción de las poblaciones de microorganismo aeróbicos, puede estar relacionado con el nivel de acidez del medio debido a que, bajo estas condiciones los nutrientes se

agotan; según Watawana et al. (2015), el incremento de la acidez es algo común durante el almacenamiento de las bebidas fermentadas, así como también la reducción de oxígeno y el número de células viables de las bacterias aerobias.

(Factor B) Tipo de especie vegetal

Morales (2014) en su estudio realizado en Kombucha a base de té negro determinó 960 UFC/ml de aerobios mesófilos, datos que no se diferencian demasiado a los obtenidos con el té negro en este estudio, que se situó en 910 UFC/ml al finalizar el ensayo. Según el Instituto Danone (2020) explica que la fermentación a través de las bacterias ácido lácticas por ejemplo, modifican la composición nutricional y físico-química de los sustratos.

(Interacción AXB) Tipo de Kombucha con tipo de especie vegetal

Conforme al Instituto Danone (2020) por lo general entre los 8 a 10 días de fermentación del té, la concentración entre bacterias y levaduras alcanza un total entre 10^4 y 10^6 UFC/ml, donde las bacterias poseen una menor concentración. Rango en el cual, no se encuentran los tratamientos, sin embargo, se explicarían los resultados obtenidos en A0B0, A0B1 y A1B1.

Respecto a mohos y levaduras

(Factor A) Tipo de Kombucha

El resultado obtenido para los mohos y levaduras en esta experimentación alcanzó una cantidad de 556 UFC/mL (Tipo 1) y 900 UFC (Tipo 2), rango dentro del que se encuentra el valor obtenido por Morales (2014) con 720 UFC/ml. Este hecho puede ser atribuido a la reducción de la concentración de azúcar de la que naturalmente requieren las levaduras para su crecimiento y propagación conforme a lo manifestado por Tan et al. (2020).

(Factor B) Tipo de especie vegetal

En cuanto a este parámetro, Granda & Estupiñan (2019) lograron determinar 3270000 UFC/ml de mohos y levaduras en una Kombucha a base de guayusa; mientras que, Morales (2014) halló 700 UFC/ml de mohos y levaduras en té negro. Las levaduras en conjunto con las bacterias ácido lácticas, generan aminoácidos de cadena ramificada, y otros metabolitos como los ácidos orgánicos, alcoholes superiores, ésteres y diacetilo (Instituto Danone, 2020).

(Interacción AXB) Tipo de Kombucha con tipo de especie vegetal

Conforme a Tan et al. (2020) el Reglamento 39 sobre el Estándar Microbiológico perteneciente al Reglamento de Alimentos de 1985, el nivel máximo de recuento total en placa de microorganismos debe ser igual o inferior a 10^5 UFC/ml para alimentos y bebidas listos para el consumo por lo cual se considera que todos los tratamientos están dentro el rango sugerido.

Discusión de pruebas microbiológicas e identificación microbiana de los distintos microorganismos

Como se pudo apreciar en la tabla 53, los microorganismos encontrados fueron levaduras, en su mayoría a manera de agrupación cocoidea u ovoideas en forma de cadenas. Conforme al estudio de Villarreal et al. (2018) algunas de las especies que poseen estas características son las especies *Brettanomyces bruxellensis* (cocoides) y *Schizoaccharomyces pombe* (ovoidales en forma de cadena), la primera, poseen alta resistencia al estrés osmótico y etanólico, son más eficientes para utilizar las fuentes de nitrógeno disponibles, tendencia para fermentar los azúcares a etanol y elevar las concentraciones de ácido acético sin presencia de oxígeno; mientras que la segunda, se caracterizan por poseer un alto poder fermentativo y la habilidad de convertir el ácido málico en etanol, así como también la liberación alta de polisacáridos. Aunque también se han identificado géneros

como *Zygosaccharomces*, *Candida*, *Kloeckera*, *Torulaspota*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Lachancea*, *Saccharomycoies*, *Schizosaccharmyces* y *Kluyveromyces* (Chakravorty et al., 2016).

Otros microorganismos existentes en este tipo de fermento son, las bacterias ácido acéticas, entre las cuales se han destacado los géneros: *Acetobacter*, *Gluconobacter* y *Bacterium*. Sin embargo, la especie *A. xylinum* es una de las más importantes ya que permite mejorar la asociación entre bacterias y hongos mediante la síntesis de una capa de red celulósica (Morales, 2014). Tran et al. (2020) expresan que, las bacterias ácido acéticas pueden estimular la producción de etanol a través de las levaduras, aunque no tienen una relación de parasitismo estrictamente necesaria, e incluso su composición produce un impacto secundario en el perfil de los ácidos orgánicos.

Conclusiones

Se logró evidenciar que no hay desarrollo de bacterias ácido lácticas en los SCOBY de Kombucha en los días analizados, de acuerdo a la identificación que se realizó a nivel bioquímico y microbiológico, por ello, no se pudo llevar a cabo el proceso de actividad microbiana frente a otros microorganismos, pero se observó a su vez que, si existe la presencia de otras bacterias y levaduras, lo cual se corroboró con el empleo de petrifilm para cada tipo en específico, dicho crecimiento de microorganismos se debe a que la Kombucha es un consorcio de microorganismos muy amplio.

Factor A

Se concluye que el nivel de pH no varió en los dos tipos de Kombucha, debido a la composición microbiana que contienen las mismas puesto que al ser los primeros días de fermentación no existe una cantidad elevada de microorganismos

para que degraden con rapidez los sustratos empleados, por tanto, se atribuye que al no haber una transformación rápida de dichos sustratos no habrá gran presencia de ácidos orgánicos característicos de la bebida fermentada que influyen en los niveles de pH de la misma.

Por otra parte, respecto a la acidez se concluye que los tipos de composición microbiana no fue tan distinta en los dos tipos de Kombucha, debido a que en los primeros días de fermentación no existe un desarrollo total del recuento microbiano.

Y de acuerdo a los grados Brix se pudo determinar que la Kombucha tipo 1 es la más apta para el desarrollo bacteriano, ya que al tener una mejor síntesis del sustrato se decae el desarrollo de otro tipo de microorganismo, lo cual conduce a tener una mejor acidez.

Factor B

Se concluye que los tipos de té denominados “tipo de especie vegetal” empleados para las fermentaciones con los tipos de Kombucha no presentaron mayor variación de pH en los días de fermentación, ya que en este período no se dio una transformación total de los componentes químicos que contienen las especies vegetales de los tés como es ejemplo de ello las fenolasas a las cuales se atribuyen la disminución de los niveles de pH en el té negro.

Además, se determinó que los niveles de acidez variaron en los días fermentación analizados debido a que este parámetro es inversamente proporcional a la reducción de pH y a su vez el tiempo de fermentación y las condiciones ambientales son factores cruciales en el proceso de fermentación.

En cuanto a los grados Brix, se concluye que se dio menor cantidad en el té de guayusa, lo cual se pudo evidenciar que si existe variaciones al momento de emplear una especie vegetal de la otra, por tanto, se puede mencionar a su vez, que en este tipo de té existió menos cantidad de sacarosa y componentes disueltos por el proceso de fermentación.

Interacción A*B

Se evidencia que las combinaciones de té negro y té de guayusa con Kombucha tipo 1 son las más apropiadas para el consumo humano, ya que presentaron niveles de pH acordes a la normativa.

Por otra parte, se indentificó que la Kombucha tipo 1 en combinación con té negro proporciona un valor de acidez más bajo en comparación a la Kombucha tipo 2 con té de guayusa, esto debido a que en estos días de fermentación a más de la síntesis de los compuestos del té se da la formación de celulosa donde se establecen la mayoría de microorganismos, siendo los que más destacan a partir del día 5, las levaduras, las cuales influyen el sabor, la producción de etanol y ácidos orgánicos.

A su vez, referente a los grados Brix se determinó que las combinaciones de Kombucha tipo 2 tanto con té negro como con guayusa son las mezclas apropiadas para el consumo humano por los valores obtenidos en el último día de fermentación, debido a que en este día el consumo de sacarosa por parte de los microorganismos es casi completo y a su vez, se da la formación de ácidos que contribuyen en las propiedades organolépticas.

Unidades formadoras de colonias en Petrifilm

Se concluye que, si se evidenció crecimiento de bacterias aerobias a mayor cantidad en los primeros días y esto se relaciona con el consumo de los sustratos presentes en la bebida, ya que es a gracias a este tipo de microorganismos que se da la transformación de los componentes químicos de la bebida a diversos ácidos orgánicos y otro tipo de sustancias.

Se evidenció que hubo mayor desarrolló de microorganismos en los petrifilm de mohos y levaduras a partir del día 5 en adelante en el proceso de fermentación de Kombucha y esto se produjo porque mientras transcurre más tiempo de la

fermentación se da la transformación a productos como el etanol y es gracias a la presencia de levaduras que tienden a sintetizar las cantidades restantes de sacarosa para posterior ser transformados en otro tipo de compuestos como el ácido acético.

Recomendaciones

Se recomienda realizar las fermentaciones de Kombucha en biorreactores o áreas más controladas donde no exista la interacción de vapores o gases de componentes químicos, ya que esto tiende a afectar la microbiota del SCOBY de Kombucha y por tanto genera la disminución tanto de bacterias o levaduras benéficas e induce a una proliferación de microorganismos patógenos.

Se recomienda realizar análisis a futuro a partir del día de 2 de fermentación para evidenciar si hay mayor crecimiento de bacterias ácido lácticas y bacterias en general.

Se sugiere emplear otros medios de cultivo con el fin de poder evidenciar de acuerdo a los componentes nutricionales el crecimiento de los microorganismos que tiene la Kombucha, ya que al ser un consorcio microbiano se dará la presencia de diversas bacterias y levaduras.

Se recomienda la combinación de Kombucha tipo 1 con té negro, debido a que fue el té con cualidades más óptimas para consumo humano lo cual se relaciona con la normativa legal.

Capítulo V

Bibliografía

- Abaci, N., Senol Deniz, F. S., & Orhan, I. E. (2022). Kombucha – An ancient fermented beverage with desired bioactivities: A narrowed review. *Food Chemistry: X*, 14, 100302. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100302>
- Aguilar, M., García, N., Gómez, J., Sosa, M., & Cerón, A. (2019). Atributos de calidad en

diferentes bebidas a base de té: caracterización fisicoquímica y colorimétrica.

Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos, 4(26), 919–924.

- Alasalvar, C., Pelvan, E., Özdemir, K. S., Kocadagılı, T., Mogol, B. A., Pasli, A. A., Özcan, N., Özçelik, B., & Gökmen, V. (2013). Compositional, nutritional, and functional characteristics of instant teas produced from low- and high-quality black teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(31), 7529–7536. <https://doi.org/10.1021/jf4015137>
- 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. <https://doi.org/10.1002/fsn3.605>
- Andreson, M., Kazantseva, J., Kuldjärv, R., Malv, E., Vaikma, H., Kaleda, A., Kütt, M.-L., & Vilu, R. (2022). Characterisation of chemical, microbial and sensory profiles of commercial kombuchas. *International Journal of Food Microbiology*, 373, 109715. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109715>
- Batista, P., Penas, M. R., Pintado, M., & Oliveira-Silva, P. (2022). Kombucha: Perceptions and Future Prospects. *Foods 2022, Vol. 11, Page 1977, 11(13)*, 1977. <https://doi.org/10.3390/FOODS11131977>
- Cardoso, R. R., Neto, R. O., dos Santos D’Almeida, C. T., do Nascimento, T. P., Presiona, C. G., Azevedo, L., Martín, H. S., Cameron, L. C., Ferreira, M. S., & Barros, F. A. (2020). Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food Research International*, 128. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108782>
- Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D., & Gachhui, R. (2016). Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology*, 220, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015>
- Coelho, R. M. D., Almeida, A. L. de, Amaral, R. Q. G. do, Mota, R. N. da, & Sousa, P. H. M. d. (2020). Kombucha. In *International Journal of Gastronomy and Food Science* (Vol.

- 22, p. 100272). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100272>
- Cuamatzin, L., Rodríguez, P., El-Kassis, E. G., Galicia, G., Meza, M. de L., Baños, M. del R., Zaragoza, D. S., & Pérez, B. (2022). Traditional Fermented Foods and Beverages from around the World and Their Health Benefits. *Microorganisms*, 10(6), 1151. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061151>
- Dufresne, C., & Farnworth, E. (2000). Tea, Kombucha, and health: A review. *Food Research International*, 33(6), 409–421. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00067-3](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00067-3)
- Fiallos, V. (2021). *Actividad antifúngica del té verde (Camellia sinensis) y tomillo (Thymus vulgaris) frente a candida albicans*. <http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/7646/1/06678.pdf>
- Gorbach, S. L. (1990). Lactic acid bacteria and human health. *Annals of Medicine*, 22(1), 37–41. <https://doi.org/10.3109/07853899009147239>
- Granda, B., & Estupiñan, L. (2019). *Estudio de factibilidad para la elaboración de una bebida tipo kombucha a base de té de guayusa (Ilex guayusa)*. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/46806>
- Guzmán, M. (2021). "Resistencia de microorganismos aislados de kombucha a condiciones del tracto gastrointestinal".
- INEN. (2017). NTE INEN 2304. In *Annual book of INEN*. http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2016/03/nte_inen_2304_1r.pdf
- Instituto Danone. (2020). Alimentos fermentados: microbiología, nutrición, salud y cultura. In A. Ferrari, G. Vinderola, & R. Weill (Eds.), *Instituto Danone*. https://www.researchgate.net/publication/269107473_What_is_governance/link/548173090cf22525dcb61443/download%0Ahttp://www.econ.upf.edu/~reynal/Civilwars_12December2010.pdf%0Ahttps://think-asia.org/handle/11540/8282%0Ahttps://www.jstor.org/stable/41857625
- Jakubczyk, K., Kałduńska, J., Kochman, J., & Janda, K. (2020). Chemical profile and antioxidant activity of the kombucha beverage derived from white, green, black and red

- tea. *Antioxidants*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/antiox9050447>
- Laavanya, D., Shirkole, S., & Balasubramanian, P. (2021). Current challenges, applications and future perspectives of SCOBY cellulose of Kombucha fermentation. *Journal of Cleaner Production*, 295, 126454. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126454>
- Livisaca, P. (2021). “Elaboración de recetas de cocina experimental con base en kombucha de : ajo negro (*Allium cepa*), cacao (*Theobroma cacao*), hoja de higo (*Ficus carica*) y suero de leche .” In *Universidad de Cuenca*.
- López, M. (2002). El té verde. *Elsevier*, 21, 123–132. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-el-te-verde-13032231>
- Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., & Čanadanović-Brunet, J. M. (2011). Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food Chemistry*, 127(4), 1727–1731. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.048>
- Merchan, S., & Tigre, J. C. (2019). Obtención de celulosa bacteriana a base de kombucha por sustitución de té negro por té de cáscara de café. *Universidad de Guayaquil*, 3, 1–9.
- Mo, H., Zhu, Y., & Chen, Z. (2008). Microbial fermented tea - a potential source of natural food preservatives. *Trends in Food Science and Technology*, 19(3), 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.10.001>
- Mokoena, M. P. (2017). *Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review* (Vol. 22, Issue 8). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/molecules22081255>
- Montero, L., Irazabal, J., Cardenas, P., Graham, J. P., & Trueba, G. (2021). Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing-Escherichia coli Isolated From Irrigation Waters and Produce in Ecuador. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.709418>
- Morales, L. (2014). *Desarrollo, elaboración y optimización bromatológica de una bebida de té negro fermentada a base de Manchuria fungus (Kombucha) y evaluación de su*

actividad como potencial alimento funcional (Vol. 31, Issue sup 3.2). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Moya, E. (2020). *Concentración de cafeína a partir de té negro, hoja de guayusa y café con ganoderma, durante la fermentación del Hongo Kombucha.*

Muñoz, J. C. (2021). *La cerveza artesanal en Bélgica.*

<https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/129465/2021-22-179-77138009->

[MUÑOZ_CARMONA_JC.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/129465/2021-22-179-77138009-)

Novillo, J. (2021). *Elaboración de una bebida fermentada con tres variedades de té de pulpa de café (Typica, sarchymor y bourbón sydra), utilizando niveles del 1, 1.5 y 2%.*

Parra, R. A. (2010). Review. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos.

REVIEW LACTIC ACID BACTERIA: FUNCTIONAL ROLE IN THE FOODS. (English),

8(1), 93–105.

[http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=54616134&lang=es&](http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=54616134&lang=es&site=ehost-live)

[site=ehost-live](http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=54616134&lang=es&site=ehost-live)

Pinto, G., Illiano, A., Carpentieri, A., Spinelli, M., Melchiorre, C., Fontanarosa, C., Serio, M.

Di, & Amoresano, A. (2020). Quantification of Polyphenols and Metals in Chinese Tea

Infusions by Mass Spectrometry. *Foods*, *9(6)*, 835.

<https://doi.org/10.3390/foods9060835>

Prado, A. (2018, November). *La kombucha es una bebida exótica y saludable.* FAMILIA.

Reyes, P. (2021). *“Desarrollo de una barra energética con guayusa, quinua y stevia como*

f fuente energética, proteica y edulcorante natural.”

Rocha, M. (2018). *Determinación del contenido de cafeína en un cultivo comercial de*

guayusa (Ilex guayusa). 70. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/14259>

Rodrigo, M. E. (2019). *Actividad antioxidante del té verde nacional como prototipo de*

análisis para otros cultivos de clima tropical húmedo del Perú.

Solis, L., & Zambrano, J. (2021). *Diseño de proceso biorrefinería para la producción de té de*

Kombucha y cartón reforzado con nanocelulosa bacterial.

Suhre, T. (2020). *Kombuchas produzidas e commmercializadas no Brasil: características*

físico-químicas e composição microbiana.

Supliguicha, M. (2017). *Aplicación de la técnica de deshidratación en hierbas, flores y frutas, para la elaboración de blends con té negro, té verde y té blanco.*

Tamayo, E. (2017). Estudio de la capacidad antioxidante y contenido de polifenoles en la extracción etanólica del polvo de hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes) deshidratada. In *Journal of Chemical Information and Modeling*.

Tan, W. C., Muhialdin, B. J., & Meor, A. S. (2020). Influence of Storage Conditions on the Quality, Metabolites, and Biological Activity of Soursop (*Annona muricata*. L.) Kombucha. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2982.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.603481>

Todorov, S. D. (2009). Bacteriocinas de *Lactobacillus plantarum* - produção, organização genética e modo de ação. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(2), 209–221.

<https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000200001>

Torán-Pereg, P., del Noval, B., Valenzuela, S., Martínez, J., Prado, D., Perisé, R., & Arboleya, J. C. (2021). Microbiological and sensory characterization of kombucha SCOBY for culinary applications. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 23, 100314. <https://doi.org/10.1016/J.IJGFS.2021.100314>

Tran, T., Grandvalet, C., Verdier, F., Martin, A., Alexandre, H., & Tourdot-Maréchal, R. (2020). Microbial Dynamics between Yeasts and Acetic Acid Bacteria in Kombucha: Impacts on the Chemical Composition of the Beverage. *Foods*, 9(7).

<https://doi.org/10.3390/foods9070963>

Valladares, E., & Villa, P. (2021). *Caracterización de las materias primas *Vernonanthura Patens*, *Ilex Guayusa* y residuos de cáscara de cacao en un simulador comercial para la elaboración de una bebida con propiedades nutraceuticas.*

Vargas, J. (2013). “Elaboración de una bebida refrescante fermentando la simbiosis *Kombucha* con el objeto de mejorar la calidad de vida de los consumidores de bebidas no alcohólicas.” 15–17.

https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/1759/1/SBQ5_Ref3399.pdf

- Vargas Mora, F. J. (2011). "ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA REFRESCANTE FERMENTANDO LA SIMBIOSIS KOMBUCHA CON EL OBJETO DE MEJORAR LA CALIDAD DE VIDA DE LOS CONSUMIDORES DE BEBIDAS NO ALCOHÓLICAS". *Universidad Técnica de Ambato*, 15–17.
- Vázquez, M. (2021). *Estandarización del proceso de fermentación y evaluación sensorial de una bebida tipo kombucha utilizando infusiones herbales* (p. 89).
- Villarreal, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J. P., & Taillandier, P. (2018). Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. In *Journal of Food Science* (Vol. 83, Issue 3, pp. 580–588). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>
- Watawana, M. I., Jayawardena, N., & Waisundara, V. Y. (2015). Enhancement of the Functional Properties of Coffee Through Fermentation by "Tea Fungus" (Kombucha). *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 2596–2603. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12509>
- Yang, Z., Zhou, F., Ji, B., Li, B., Luo, Y., Yang, L., & Li, T. (2010). *Symbiosis between microorganisms from kombucha and kefir: Potential significance to the enhancement of kombucha function* (Vol. 160, Issue 2, pp. 446–455). <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8361-6>
- Zúñiga, M., Pardo, I., & Ferrer, S. (1993). An improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 18(1), 37–42. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(93\)90005-2](https://doi.org/10.1016/0168-1605(93)90005-2)