UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE KOMBUCHA UTILIZANDO UNA POBLACIÓN MIXTA DE MICROORGANISMOS DENOMINADO FERMENTO DE TÉ

TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL

VERÓNICA ROBLES AEDO

Abancay, Agosto del 2011
PERÚ

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURIMAC

CÓDIGO | MFN

T
IAG
R
2011

BIBLIOTECA CENTRAL

FECHA DE INGRESO: 28 MAR 2012

Nº DE INGRESO: 00243

DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE KOMBUCHA UTILIZANDO UNA POBLACIÓN MIXTA DE MICROORGANISMOS DENOMINADO FERMENTO DE TÉ

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

Jurado calificador integrado por:

Ing. M.C. Fulgencio Vilcanqui Pérez
Presidente

Ing. M.Sc. Guadalupe Chaquilla Quilca
Jurado

Ing. Ricardo Paredes Quiroz
Jurado

Ing. M.Sc. Víctor Hugo Sarmiento Casavilca
Asesor

DEDICATORIA

A Dios, por guiarme y sostenerme durante todo el tiempo que me queda vivir.

A mí querida madre: Dorotea- Aedo Moreano, que con amor y apoyo incondicional que siempre está junto a mí.

A todos aquellos compañeros, amigos y familiares que de una u otra manera hicieron posible este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

- Expreso mi sincero agradecimiento al Ing. Víctor Hugo Sarmiento Casavilca, asesor de la investigación, que ha tenido toda su predisposición para orientar, con sus consejos y compartir sus conocimientos, que tan útiles han sido y seguirán siendo en mi vida profesional.
- A la Dirección de Investigación, de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, por el financiamiento en el III Concurso de Proyectos de Tesis 2010.
- Al Ing. Fulgencio Vilcanqui Pérez, Ing. Guadalupe Chaquilla Quilca y al Ing. Ricardo Paredes Quiroz integrantes del comité de jurados de la tesis, por sus valiosos aportes para la culminación del presente trabajo.
- Ing. Justo Arias por facilitarme algunos equipos del laboratorio de procesamiento.
- A la Ing. Zulema docente del curso de control de calidad y a los estudiantes del curso de la Escuela Académica profesional de Ingeniería Agroindustrial por su colaboración en la evaluación sensorial del producto (Kombucha).
- A los docente: Bióloga Elena, Ing. José Barazorda por sus aportes durante la investigación del presente trabajo.
- Al Mvz. Ludwin Cáceres y a los encargados del laboratorio de Medicina Veterinaria: Mvz.. Delmer y Mvz. Christian por su apoyo en la observación de los microorganismos (levaduras y bacterias acéticas) con el microscopio óptico Motic.
- A mis amigos Wilber, Norma, Isaac, Wilson y compañeros de la Universidad que encontré a lo largo de mi formación profesional. Gracias por brindarme sus ideas, apoyo, consejos y momentos inolvidables.

INDICE DEL CONTENIDO **Pág.**

RESUMEN

ABSTRAC

INTRODUCCIÓN

II. MARCO TEÓRICO **4**

2.1. Fermentación 4

2.1.1 Ventajas de productos fermentados 4

2.1.2. Métodos de fermentación 5

2.1.2.1. Fermentación discontinua 5

2.1.2.2. Fermentación alimentada 5

2.1.2.3. Fermentación continúa 6

2.1.3. Parámetros importantes en la fermentación 6

2.1.3.1. Temperatura 6

2.1.3.2. Aireación 6

2.1.3.3. Presión 7

2.1.3.4. Agitación 7

2.2. Biorreactor 7

2.2.1. Principios de un biorreactor 7

2.2.2. Agitación y mezclado en el biorreactor 8

2.2.3. Aireacion y trasferencia de oxígeno en el biorreactor 9

2.3. Té negro 12

2.3.1. Clasificación taxonómica 12

2.3.2. Especificaciones del té negro 12

2.3.3. Tipos de té 13

2.3.4. Composición química del té 13

2.3.5. Características y propiedades benéficas del té 14

2.4. Kombucha 15

2.4.1. Definición de kombucha 15

2.4.2. Fermento de té 15

2.4.3. Microorganismo que habitan en el fermento de té 18

2.4.4. Metabolismo del fermento de té (actividad simbiótica) 18

2.4.5. Sustrato de cultivo para el fermento de té 20

Pág.

2.4.5.1. Influencia del tipo de té en el sabor de Kombucha 21

2.4.5.2. Otros Sustratos para la producción de Kombucha 21

2.4.6. Fermentación de Kombucha 22

2.4.5.1. Influencia de la temperatura en la producción Kombucha 23

2.4.5.2. Influencia del tiempo en la producción de Kombucha 23

2.4.7. Producción de metabolitos en la Kombucha 24

2.4.7.1. Etanol 25

2.4.7.2. Ácido láctico 25

2.4.7. 3. Ácido acético 25

2.4.7. 4. Vitamina C 26

2.4.7. 5. Ácido glucónico/ ácido glucorónico 26

2.4.8. Importancia de kombucha en la salud humana 26

2.5. Producto nutracéutico 28

2.6. Evaluación sensorial de los alimentos 29

2.6.1.Pruebas afectivas 31

2.6.2. Pruebas discriminativas 32

2.6.3. Pruebas descriptivas 32

2.7. La espectrofotometría 33

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiales, Equipos y Reactivos 35

3.2. Metodología (etapas del proceso de la investigación) 36

3.2.1. Preparación de la solución madre (inóculo) (ETAPA I) 36

3.2.2. Identificación de microorganismos (ETAPA II) 37

a). Identificación de levaduras 37

b). Identificación de bacterias acéticas 40

3.2.3. Cultivo en biorreactor, acondicionamiento del inóculo (fermentación) (ETAPA III) 42

3.2.4. Evaluación de la calidad fisicoquímica y sensorial de la Kombucha (ETAPA IV) 44

a). Análisis fisicoquímico 44

b). Evaluación de análisis sensorial 45

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES **Pág.**

4.1. Características fisicoquímicas de la solución madre (inóculo) 47

4.2. Características morfológicas de las colonias en el fermento de té 48

4.2.1. Características macroscópicas y microscópicas de las levaduras 48

4.2.1.1. Evaluación macroscópica de las levaduras del fermento de té 48

a). Tamaño de la colonia 48

b). Color de la colonia 49

c). Forma de la colonia 49

d). Elevación de la colonia 50

e). Margen de la colonia 50

f). Superficie de la colonia 51

g). Consistencia de la colonia 51

4.2.1.2. Evaluación microscópica de las levaduras del fermento de té 51

a). Forma de la célula 52

b). Reproducción asexual 53

4.2.2. Características macroscópicas y microscópicas de las bacterias acéticas 54

4.2.2.1. Evaluación macroscópica de las bacterias acéticas del fermento de té 54

a). Tamaño 54

b). Color 54

c). Forma de la colonia 55

d). Superficie 55

4.2.2.2. Evaluación microscópica de las bacterias acéticas del fermento de té 55

a). Forma de la célula 55

b). Reacción a la coloración Gram 55

4.3. Evaluación cinética en la fermentación de la Kombucha 56

4.3.1. Acidez 56

4.3.2. pH 58

4.3.3. °Brix 60

4.3.4. Absorbancia 61

4.4. Características sensoriales de la Kombucha 63

4.4.1. Evaluación del grado de satisfacción 64

	Pág.
4.4.1.1. Color: por tipo de muestra	64
4.4.1.2. Olor: por tipo de muestra	65
4.4.1.3. Sabor por tipo de muestra	65
4.4.1.4. Apariencia general por tipo de muestra	66
4.4.2. Análisis descriptivo cuantitativo	67
4.4.2.1. Sabor: "Dulce" por tipo de muestra	67
4.4.2.2. Sabor: "Ácido" por tipo de muestra	67
4.4.2.3. Sabor: "Fermentado" por tipo de muestra	68
4.4.2.4. Sabor: "Acético" por tipo de muestra	68
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
5.1. Conclusiones	72
5.2. Recomendaciones	73
VI. BLIOGRAFÍA UTILIZADA	74
ANEXOS	81

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
01. Velocidades de acuerdo al tamaño del biorreactor	7
02. Composición química de la hoja fresca (té verde) y de la hoja procesada (té negro)	14
03. El análisis bioquímico y elemental del fermento de té seco	17
04. Contenido de aminoácido en el fermento de té desecado	17
05. Cambios del pH y acidez en la fermentación de kombucha de hisopillo	24
06. Escala hedónica verbal de nueve puntos	31
07. Codificación de los tratamientos para la evaluación sensorial	45
08. Cartilla de evaluación sensorial en sus distintos atributos	46
09. Características fisicoquímicas del inóculo.	47
10. Evaluación macroscópica de las levaduras del fermento de té	48
11. Evaluación microscópica de las levaduras del fermento de té	52
12. Evaluación macroscópica y microscópica de las bacterias acéticas	54

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
01. Biorreactor con agitación mecánica	8
02. Agitador de turbina de disco con paletas planas	9
03. Bioxidación de substratos con oxigeno	10
04. Vía de trasporte del oxigeno	10
05. Utilización del oxigeno en un sistema celular	11
06. Estado de equilibrio de OTR y OUR	11
07. *Camellia Sinensis*	12
08. Incremento de la vitamina C, durante el proceso de fermentación	26
09. Relación de los cinco sentidos y las propiedades sensoriales	30
10. Mecanismo de percepción	30
11. Sistema dispersivo del espectrofotómetro	33
12. Esquematización de las etapas en estudio	36
13. Esquematización de la preparación del inóculo	37
14. Esquematización de identificación de levaduras del fermento de té	39
15. Esquematización de la identificación de las bacterias acéticas en el fermento de té.	41
16. Diagrama de bloques de la producción de Kombucha	43
17. Diferenciación de sabores y color	46
18. Producción de ácido acético en función al tiempo (36 horas) de producción de Kombucha.	57
19. Producción de ácido acético en función al tiempo (72 horas) de producción de Kombucha	57
20. Comportamiento del pH en función al tiempo (36 horas) de fermentación	58
21. Comportamiento del pH en función al tiempo (72 horas) de fermentación	59
22. Comportamiento de los grados °Brix en función al tiempo de fermentación (36 horas) de los tratamientos	60
23. Comportamiento de los grados °Brix en función al tiempo de fermentación (72 horas) de los tratamientos	60
24. Comportamiento del color en función al tiempo (36 horas) de fermentación de los tratamientos	61
25. Comportamiento del color en función al tiempo (72 horas) de fermentación de los tratamientos.	62

26. Comportamiento de la Absorbancia en función al tiempo de fermentación, reposo y filtración de las muestras de Kombucha 63
27. Perfil descriptivo del sabor en las muestras de Kombucha 70
28. Perfil de las intensidades de colores de las muestras de Kombucha 71
29. Perfil de las intensidades de colores de las muestras de Kombucha 71

ÍNDICE DEL ANEXO

Tablas en el anexo	Pág.
13. Resumen estadístico para color	84
14. ANOVA para color por tipo de muestra	84
15. Pruebas de múltiple rangos para color por tipo de muestra	84
16. Diferencias significativas del color	85
17. Resumen estadístico para olor	86
18. ANOVA para olor por tipo de muestra	86
19. Pruebas de múltiple rangos para olor por tipo de muestra	86
20. Diferenciación de las muestras del olor	87
21. Resumen estadístico para sabor	88
22. ANOVA para sabor por tipo de muestra	88
23. Pruebas de múltiple rangos para sabor por tipo de muestra	88
24. Diferencias significativas del sabor	89
25. Resumen estadístico para apariencia general	90
26. ANOVA para apariencia general por tipo de muestra	90
27. Pruebas de múltiple rangos para apariencia general por tipo de muestra	90
28. Diferencias significativas del apariencia general	91
29. Resumen estadístico para el sabor dulce	92
30. ANOVA para el sabor: dulce por tipo de muestra	92
31. Pruebas de múltiple rangos para el sabor dulce por tipo de muestra	92
32. Diferencias significativas del sabor dulce	93
33. Resumen estadístico para el sabor: ácido	94
34. ANOVA para el sabor ácido por tipo de muestra	94
35. Pruebas de múltiple rangos para el sabor ácido por tipo de muestra	94
36. Diferencias significativas del sabor ácido	95
37. Resumen estadístico para el sabor: fermentado	96
38. ANOVA para el sabor fermentado por tipo de muestra	96
39. Pruebas de múltiple rangos para el sabor fermentado por tipo de muestra	96
40. Diferencias significativas del sabor fermentado	97
41. Resumen estadístico para el sabor: acético	98
42. ANOVA para el sabor acético por tipo de muestra	98
43. Pruebas de múltiple rangos para el sabor acético	

Pág.

por tipo de muestra 98

44. Diferencias significativas del sabor acético 99

45. Comportamiento del pH, Acidez, °Brix y absorbancia durante la fermentación de la Kombucha 100

FOTOGRAFÍAS

Pág.

01. Características macroscópicas de las levaduras del fermento de té 81

02. Características microscópicas de las levaduras del fermento de té 82

03. Características macroscópicas y microscópicas de las bacterias acéticas del fermento de té 83

04. Formas de la colonias en placas con agar 83

05. Formas de elevación de colonias 83

06. Márgenes de colonias formadas en placas con agar 83

07. Preparación de materiales para la identificación de levaduras y bacterias acéticas en el fermento de té. 102

08. Equipos para la esterilización (autoclave) de los materiales y para la Fermentación (biorreactor) 103

09. Kombucha a distintos tratamientos y su codificación 103

10. Fermento de té y Kombucha 104

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se obtuvo la Kombucha, una bebida fermentada de té azucarado con una cultura simbiótica de levaduras y bacterias acéticas. En la etapa I se preparó la solución madre (inóculo), con fermento de té producto en la ciudad de Abancay; en la etapa II se identificaron los microorganismos que habitan en dicho fermento y en la etapa III y IV se cultivó el inóculo en el biorreactor (fermentación) para obtener el producto final al cual se evaluó los parámetros de fermentación en función a la calidad fisicoquímica y sensorial.

En el inóculo, la identificación de levaduras reportó la presencia de los géneros: *Hanseniaspora, Rhodotorula* y *Saccharomyces*, y una bacteria acética del género *Acetobacter*. Por otro lado, en el producto final (Kombucha), al evaluar el efecto de los parámetros de fermentación (concentración de té, temperatura de fermentación y tiempo de fermentación) sobre las características fisicoquímicas (acidez, pH, °Brix y absorbancia), se observó que la producción de ácido acético en los distintos tratamientos es directamente proporcional con el tiempo y temperatura de fermentación de la Kombucha; mientras que el pH y los grados °Brix tiene una relación inversa con la producción de acidez. La intensidad del color de la Kombucha fue en aumento conforme el tiempo incrementa por la formación de diversas materias que interfieren el paso de la luz pero después de la fermentación disminuye la absorbancia por la eliminación de partículas en el proceso de filtrado.

En cuanto a las características sensoriales (color, olor, sabor, y apariencia general), la muestra M-832 (8 g/l de té negro, a un tiempo de 36 horas y a una temperatura de 18 °C de fermentación) es la que reportó mejores características sensoriales, con parámetros fisicoquímicos de ácido acético de 5.1 g/l, pH de 3.4, °Brix de 8.5 y Absorbancia de 0.735.

ABSTRAC

You got the Kombucha, an alcoholic beverage from tea sugared with a symbiotic culture of yeasts and acetic bacteria in the present research work. In the stage I the mother (I inoculate), with ferment of tea arranged for the solution herself product at Abancay's city; The microorganisms identified II themselves in the stage that they inhabit in the aforementioned ferment and in the stage III and IV grew itself the I inoculate in the biorreactor (fermentation) to obtain the final product to which the parameters of fermentation in show were evaluated to the physicochemical and sensorial quality.

In the I inoculate, the yeasts identification yielded the presence of the textiles: *Hanseniaspora, Rhodotorula*and *Saccharomyces*, and an acetic bacterium of the kind *Acetobacter.* In addition, in the final product (Kombucha), when evaluating the effect of the parameters of fermentation (concentration of tea, temperature of fermentation and time of fermentation) on the physicochemical characteristics (acidity, pH, Brix and absorbance), it was noticed that the production of acetic acid in the several treatments is directly proportional in the course of time and the Kombucha's temperature of fermentation; In the meantime than the pH and grades Brix has an inverse relation with the production of acidity. The intensity of the color of the Kombucha was on the increase in accordance with the time increase in for the formation various matters that interfere in the step of light but you decrease the absorbance for the elimination of particles in the process of masking after fermentation.

As to the sensorial characteristics (color, smell, taste, and general appearance), the sign the M (8 g l of black tea, to a time of 36 hours and to a temperature of 18 C of fermentation) is 832 her that you yielded better sensorial characteristics, with physicochemical parameters of acetic acid of 5,1 g l, pH of 3,4, Brix of 8,5 and Absorbancia of 0,735.

INTRODUCCIÓN

La Kombucha es una bebida consumida artesanalmente en la ciudad de Abancay, producida por fermentación de té negro azucarado, en ésta es formada una película por bacterias acéticas y levaduras denominado "fermento de té", que llevado a escala industrial requiere determinar parámetros de fermentación, y obtener el producto con características fisicoquímicas (acidez, pH, °Brix y absorbancia) y sensoriales aceptables (color, olor, sabor y apariencia general), aceptables por los consumidores de esta bebida.

Los microorganismos más importantes que presentan son una bacteria acética y dos levaduras (Hesseltine, 1965), además de una diversidad de microorganismos no identificados que de un lugar a otro varían y presentan diversas características fisicoquímicas y sensoriales en la elaboración de Kombucha en la región de Apurímac.

Este conjunto de bacterias y levaduras se alimenta de azúcar y té, en sus diversas reacciones produce sustancias valiosas como son ácidos orgánicos, vitaminas, sustancias antibióticas, entre otras por lo tanto siendo el producto con propiedades nutracéuticas en la salud humana (Malbasa y Kolarov, 2002), algunas de estas propiedades están comprobados por investigaciones científicas experimentadas en humanos y animales, por lo tanto el objetivo general del presente trabajo es:

Obtener Kombucha y optimizar los parámetros en la producción utilizando una población mixta de microorganismos denominado fermento de té; y como objetivos específicos son: identificar los microorganismos (géneros) predominantes en el fermento de té; evaluar la influencia de las condiciones de fermentación (concentración té, temperatura y tiempo) en las características fisicoquímicas (acidez, pH, °Brix y absorbancia) de la Kombucha y en las características sensoriales (color, olor, sabor y apariencia general) utilizando una población mixta de microorganismos denominado fermento de té.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Fermentación

La fermentación es un tipo de catabolismo parcial, que se caracteriza por ser un proceso de oxidación incompleta, típico de los organismos anaeróbicos. Se realiza, sin la intervención del oxígeno. Durante la fermentación, la energía obtenida procede, al igual que en la respiración aerobia, de las reacciones de oxido-reducción habidas durante el catabolismo de la glucosa (glucólisis), pero en la fermentación las coenzimas reducidas no ceden sus electrones a una cadena cuyo aceptor final es el oxígeno, sino que los ceden directamente a un compuesto orgánico que se reduce siendo el producto característico de cada fermentación (láctica, alcohólica, etc.) (Galicia, 2010).

La fermentación significa un estado de burbujeo suave, término que se aplicó por primera vez en la producción de vino hace 2000 años. La acción burbujeante es debido a la conversión del azúcar en dióxido de carbono (Ward, 1999), para esto implica el empleo de microorganismos para llevar a cabo trasformaciones de la materia orgánica catalizadas por enzimas.

2.1.1 Ventajas de productos fermentados

- Utilización de pHs y temperaturas que no alteran y mejoran, el valor nutritivo y las características organolépticas
- Obtención de alimentos con aromas y texturas que no pueden ser obtenidas por otras tecnologías
- Conservación de los alimentos

Los medios nutritivos para la producción de una bebida fermentada deben ser optimizados no solo en los ingredientes utilizados si no en la forma en que se prepara el medio (Crueger, 1993).

2.1.2. Métodos de fermentación

2.1.2.1. Fermentación discontinua

Considerada como un "sistema cerrado", a tiempo cero, la solución esterilizada de nutrientes se inocula con microorganismos y se permiten que se lleve a cabo la incubación en condiciones optimas de fermentación con adición de agentes antiespumantes y ácidos o bases para controlar el pH, excepto oxigeno (en forma de aire).

La Composición del medio de cultivo, la concentración de la biomasa y la concentración de metabolitos cambia generalmente en forma continua, como resultado de metabolismo de las células. Después de la inoculación de una solución nutritiva estéril con microorganismos y su cultivo en condiciones fisiológicas se observan cuatro fases típicas de crecimiento: fase de latencia, fase logarítmica, fase estacionaria, y fase de de muerte (Oldshue, 1966).

2.1.2.2. Fermentación alimentada

Los elementos críticos de la solución de nutrientes se añaden en pequeñas concentraciones al principio de la fermentación y continúan añadiéndose a pequeñas dosis durante la fase de producción. Esto se hace por que la formación de muchos metabolitos secundarios es sometida a represión catabólica por altas concentraciones de glucosa; o por otros carbohidratos o por compuestos nitrogenados (Lin, 1979), las ventajas de la fermentación alimentada son:

- Permite controlar la inhibición del crecimiento y formación del producto por el sustrato
- Mejora el rendimiento en biomasa cultivado en cultivo discontinuo
- Permite llevar a cabo la producción de metabolitos en la fase estacionaria
- La adición de sustrato reduce la viscosidad del medio de fermentación

- Permite trabajar asépticamente y mejora la estabilidad genética de las cepas, comparado al cultivo continuo

2.1.2.3. Fermentación continúa

En la fermentación continua se establece un sistema abierto. La solución nutritiva estéril se añade continuamente al biorreactor y una cantidad equivalente de solución utilizada de los nutrientes, con los microorganismos, se saca simultáneamente del sistema (Lin, 1979), las ventajas de esta fermentación es:

- Prolonga la fase exponencial adicionando medio fresco al biorreactor
- El crecimiento se encuentra limitado por la concentración de un sustrato limitante entrando al biorreactor
- Elimina los efectos de represión del crecimiento y producción causado por el sustrato
- El suministro constante del medio reduce la viscosidad del medio
- El suministro constante del medio reduce el efecto de constituyentes tóxicos
- Se puede prolongar por el tiempo deseado la etapa de formación de producto

2.1.3. Parámetros durante en la fermentación

2.1.3.1. Temperatura: Las fermentaciones son llevadas a cabo en el rango mesófilo (temperatura óptima 20 – 45 °C) o en termófilo (> 45 °C), en el que debe escogerse la temperatura apropiada para conseguir el máximo crecimiento y la formación óptima de producto (Crueger, 1993).

2.1.3.2. Aireación: La velocidad de aireación es 0.25 – 1.0 vvm (volumen de aire/ volumen de liquido * minuto) y debe ser ajustada a la cantidad de O_2 que se requiera (Crueger, 1993).

2.1.3.3. Presión: A fin de minimizar el riesgo de contaminación se utiliza una sobre presión de 0.2 – 0.5 bar. La presión hidrostática también tiene que ser tenida en cuenta en los fermentadores grandes ya que influye en la solubilidad del O_2 y el CO_2 en la solución de nutrientes (Crueger, 1993).

2.1.3.4. Agitación: Dependiendo de la construcción se utilizan, con impulsores de discos, que se observan en la tabla 01.

Tabla 01. Velocidades de acuerdo al tamaño del biorreactor

Volumen del fermentador (l)	Impulsor (cm)	Velocidad del impulsor (rpm)
20	7.0	400
20	12.2	275
20	21.0	180
250	15.8	175
250	15.8	220
250	23.7	175
15000	76.8	164
15000	90.5	124
15000	118	82

Fuente: Crueger (1993)

2.2. Biorreactor

2.2.1. Principios de un biorreactor

Los biorreactores son los equipos donde se realiza el proceso de cultivo (también comúnmente denominado fermentador), sea en estado sólido o liquido. Su diseño debe ser tal que asegure homogeneidad entre los componentes del sistema y condiciones optimas para el crecimiento microbiano y la obtención del producto deseado. Es importante tomar en cuenta los problemas de trasferencia de calor y oxigeno sobre la cama del sustrato, los

cuales dependen de las características de la matriz que se este utilizando para la fermentación (Ruiz *et al.*, 2007).

Los fermentadores para experimentos de laboratorio se requieren volúmenes de hasta 20 l. se fabrican de vidrio o acero inoxidable, la figura 01 muestra un biorreactor a gran escala.

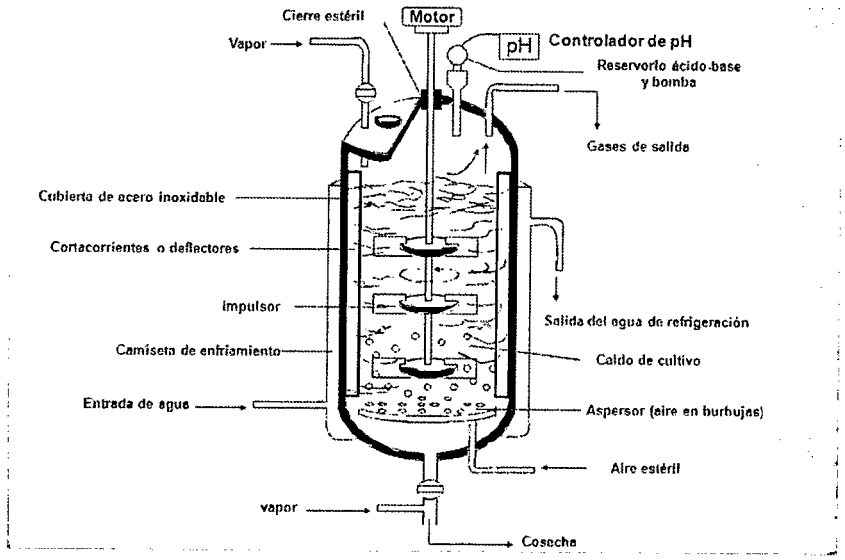


Fig. 01. Biorreactor con agitación mecánica (Crueger, 1993)

2.2.2. Agitación y mezclado en el biorreactor

La energía de trasferencia, el substrato y los metabolitos dentro del biorreactor deben ser puestos en contacto mediante un mecanismo apropiado de mezcla. La eficiencia del trasporte de cualquier substrato puede ser crucial para la eficiencia de toda la fermentación (Crueger, 1993).

La agitación en un birreactor produce los siguientes efectos:

- Dispersión del aire en la solución de nutrientes
- Homogenización, para igualar la temperatura y la concentración de los nutrientes, en el fermentador
- Suspensión de los microorganismos y de los nutrientes sólidos
- Dispersión de líquidos inmiscibles

Para procesos microbiológicos solo se puede utilizar tipos específicos de agitadores desarrollados para la tecnología química. La figura 02 muestra el más importante el agitador de disco.

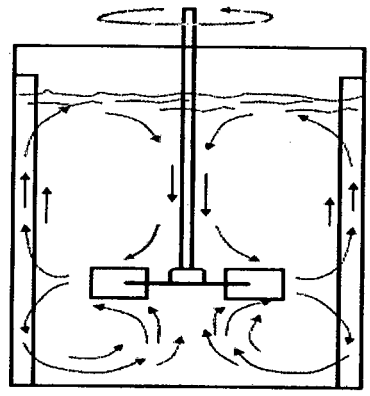


Fig. 02. Agitador de turbina de disco con paletas planas (Crueger, 1993)

La agitación asegura el trasporte de los nutrientes dentro del cultivo liquido. En el flujo turbulento dos moleculas de liquido se mueven una en relacion a la otra.

2.2.3. Aireación y trasferencia de oxígeno en el biorreactor

El factor más crítico en la produccion de proteína de origen celular, es el suministro e intercambio de oxigeno, ya que funciona como aceptor final de electrones en la bioxidacion de substratos (azúcares, grasa, proteinas, etc.) (Crueger, 1993). El oxigeno es poco suluble en suluciones acuosas, es un factor limitante debido a su baja sulubilidad, solo 9.6 mg O_2 se disuelve en un litro de agua a 20 °C. La presión más alta de oxigeno se consigue durante la aireación con oxigeno puro, ya que en agua se disuelve 43 mg O_2/l mucho más comparado con el aire (Crueger, 1993). Los productos de la oxidación por microorganismos son el agua, dióxido de carbono, biomasa y entre otros productos como se muestra en la figura 03.

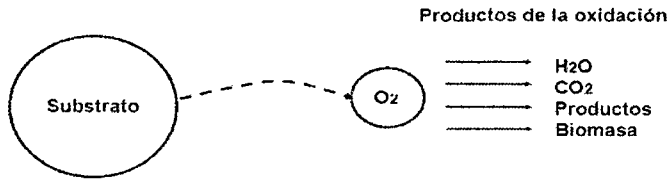


Fig. 03. Bioxidación de substratos con oxigeno (Crueger, 1993)

Para que el oxígeno se trasfiera desde una burbuja de gas a una célula individual debe ser superadas varias resistencias parcialmente independientes como se muestra en la figura 04.

- La resistencia dentro de la película de gas a la interfase
- La penetración de la interfase entre la burbuja de gas y el líquido
- Transferencia de la interfase al líquido
- Movimientos dentro de la solución de nutrientes
- Transferencia a la superficie de la célula

Las fermentaciones que se llevan a cabo con organismos unicelulares, como bacterias y levaduras, el factor más importante que controla la velocidad de trasferencia es la resistencia en la inter-fase entre la burbuja de gas y el líquido.

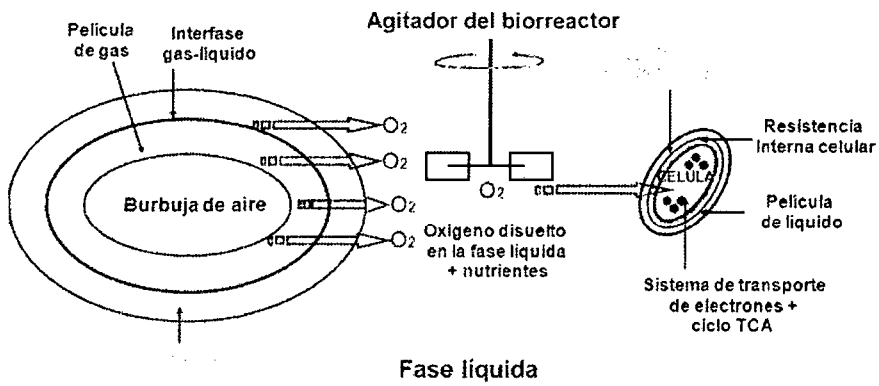


Figura 04. Vía de trasporte del oxígeno (Crueger, 1993)

La velocidad de toma de oxigeno por la célula se da en la mitocondria, el ATP (el trifosfato de adenosina) se encuentra en toda célula viva y es el agente universal de la trasferencia de energía (calor), se genera calor en el ciclo de Krebs y en la ruta de glucólisis; en donde trasfiere calor al caldo de fermentación como se muestra en la figura 05.

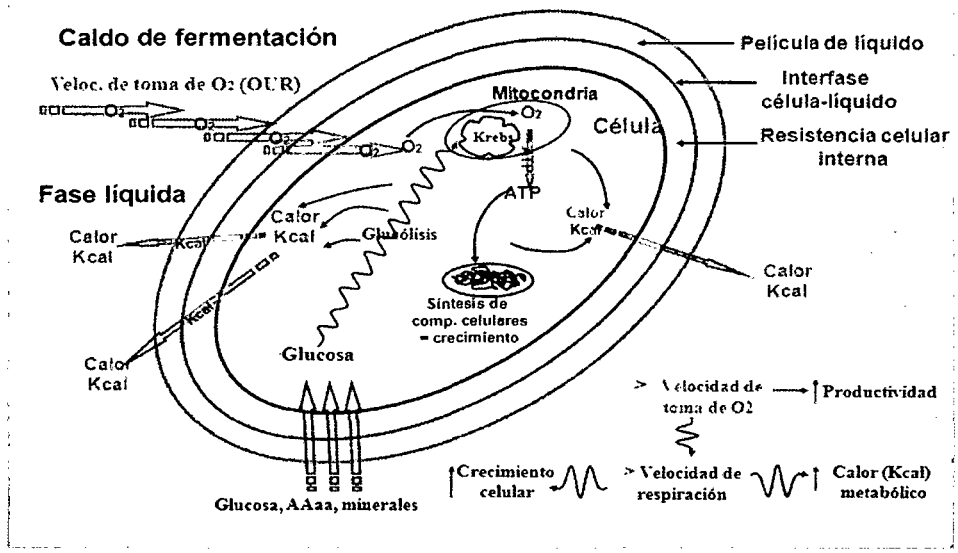


Fig. 05. Utilización del oxigeno en un sistema celular (Crueger, 1993)

Lo que se busca en toda fermentación aireada es que la velocidad de trasferencia de oxígeno, sea igual a la velocidad de toma de oxígeno por las células, con más claridad se detalla en la figura 06, donde no hay acumulación de O_2 en la fase liquida.

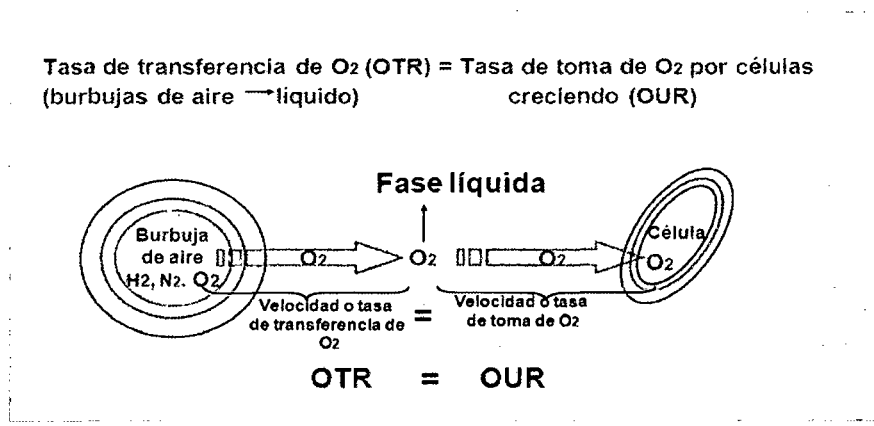


Fig. 06. Estado de equilibrio de OTR y OUR (Crueger, 1993)

2.3. Té negro

El té negro es elaborado mediante el secado de la materia prima, marchitada, enrulada y completamente fermentada. Su infusión es de color naranja rojizo, con un delicado y fragante flavor (Lobsang *et al.*, 2003).

2.3.1. Clasificación taxonómica

REINO : *Vegetal*
SUB-REINO : *Embryobionta*
DIVISIÓN : *Magnoliophyta*
CLASE : *Magnoliopsida*
ORDEN : *Theales*
FAMILIA : *Theacea*
GENERO : *Camellia*
ESPECIE : *Sinensis*

2.3.2. Especificaciones del té

El té proviene de la familia *Camellia sinensis*, que hace unos 5000 años los chinos descubrieron que podía producir una amplia variedad de sabores y características. Esta especie es un árbol pequeño de hojas perennes de un tono verde oscuro, brillante; se cultiva con éxito a diferentes alturas, desde el nivel del mar hasta alturas superiores a los 1200 metros, en que se producen los mejores cultivos. Requiere de suelos ácidos con abundantes lluvias (Harper, 1955). Se originó en los bosques montañosos de las fronteras entre China, India y Birmania (Lobsang *et al.*, 2003).

Fig. 07. ***Camellia sinensis*** (Lobsang *et al.*, 2003)

2.3.3. Tipos de té

Los chinos perfeccionaron las técnicas de procesamiento generando tres tipos de té: "té verde", no fermentado que se asocia con el color del vino blanco; " té Oolong", al que los chinos llamaron "té rojo" debido a la apariencia del licor que se fermenta parcialmente (semi-fermentado) y se asocia con el color del vino rosado; y "té negro", totalmente fermentado, que se asocia con el color del vino tinto (Harper, 1955).

2.3.4. Composición química del té

La composición química del té varía por efecto del procesamiento. Son muchos los compuestos que contiene el té, destacándose la cafeína, taninos (presente en varias formas) y polifenoles tinto (Harper, 1955), la tabla 02 muestra el contenido de nutrientes promedio de la hoja de té y del té negro.

Hasta la fecha se han identificado más de 550 sustancias químicas. La mayoría se forman durante el proceso de elaboración y cada una aporta sus propiedades al sabor del té a través del sentido del olfato de la persona que la toma; sin embargo, el sabor se debe principalmente a los diferentes compuestos polifenólicos (FAO, 1999).

Todos los tipos de té contienen cafeína, pero en diferentes proporciones, el té verde tiene menos que el Oolong y éste menos que el té negro. Cabe notar que el cuerpo absorbe rápidamente la cafeína del café, lo que provoca un inmediato incremento de la actividad cardiovascular. En cambio se cree que los polifenoles del té ralentizan el ritmo de absorción (FAO, 1999). El aroma del té negro es sumamente complejo (Wittig *et al.*, 2005).

Tabla 02. Composición química de la hoja fresca (té verde) y de la hoja procesada (té negro)

Compuestos	Hoja verde (%)	Hoja procesada (%)
Insolubles en agua:		
Celulosa y fibra cruda	7,3	7,9
Proteínas	15,7	16,6
Lignina	6,0	6,1
Almidón	1,9	0,6
Solubles en agua:		
Catequinas y catequin-taninos	26,0	18,9
Cafeína	2,7	2,7
Aminoácidos	8,7	10,2
Azúcares	4,1	4,6
Pectinas	12,7	11,9
Cenizas	4,9	5,2
Inositol	0,8	-

Fuente: Hart y Fisher (1991)

2.3.5. Características y propiedades benéficas del té

El té es una bebida de gran consumo y muchos de sus componentes se asocian con beneficios para la salud. Los efectos del té se asocian principalmente a la acción antioxidante de sus componentes, los que al actuar como atrapadores de especies reactivas del oxígeno protegen la estructura de los ácidos nucleicos, de las proteínas y de los lípidos. Los polifenoles del té producen in vitro efectos inhibitorios en la iniciación, promoción y progresión del cáncer al actuar sobre diferentes enzimas involucradas en cada una de estas etapas (Valenzuela, 2004), lo que impediría la formación de substancias cancerígenas en las células del cuerpo humano, principalmente de piel, de pulmón y de colón (Lobsang *et al.,* 2003). Además activa la movilización de grasa en el tejido adiposo, estimulando la termogénesis y promoviendo una mejor mantención de la masa ósea debido a su contenido de flúor.

El sabor del té puede ser intenso o suave casi imperceptible, su aroma es sutil y delicado, igual que el café es un estimulante por que contiene cafeína, (Lobsang *et al.,* 2003), efectos de la cafeína sobre el sistema nervioso central: corteza cerebral, el sistema nervioso central incrementa su actividad, elevando el ánimo y produciendo un mayor desarrollo del pensamiento y una mayor capacidad de rendimiento laboral. Otros de sus efectos, por su contenido en flúor, permite prevenir las caries reforzando también el esmalte de los dientes y evitando el depósito de la placa dental (Urrea, 2003).

2.4. Kombucha

2.4.1. Definición de Kombucha

Es una bebida refrescante obtenida por la fermentación de té negro azucarado con una cultura simbiótica de bacterias acéticas y levaduras llamado fermento de té, que tiene efectos beneficiosos en la salud humana (Gunther, 1996).

La Kombucha tiene varios nombres, en China, Japón e India es conocida como Kombucha (palabra japonesa que significa esponja de té u hongo de té), es el nombre utilizada internacionalmente para este producto, en otros países como en Brasil se le conoce como Alga marina, en Rusia como Té kvass y té Kargasok, en Bohemia y Moravia como Olinka, en Manchuria como Hongo de manchuria (Gunther, 1996).

2.4.2. Fermento de té

El fermento de té es una colonia simbiótica de bacterias acéticas y levaduras, colonia crecida en una solución azucarada de té negro, esta solución es el mejor sustrato para la producción de kombucha (Hernández, 1988). Este cultivo simbiótico tiene por lo menos tres microorganismos: una bacteria acética y dos levaduras (Hesseltine, 1965). El hongo morfológicamente está conformado por una membrana gelatinosa en forma de un disco

aplanado (Gunther, 1996), de esta se sabe que sólo una porción de su membrana sirve para realizar más fermentaciones (Dufresne *et al.,* 2001 y Blanc, 1996).

La membrana tiene como componentes principales: agua 95 % y celulosa de 3-4 % (Hesseltine, 1965), esta celulosa de origen microbiano (fermento de té), tiene varias implicaciones prácticas en la biotecnología y otros campos de ciencias biomédicas. Es producida comparativamente en cantidades mayores a diferencia de otras celulosas microbianos (Rasu *et al.,* 2010). Se le atribuye a esta celulosa la propiedad de fermentar una infusión de té glucosada, la cual cumple la función de ser el sustrato fermentable.

El cultivo de la membrana celulósica denominado fermento de té se realiza en forma estática y en un medio líquido, la cual al producir su metabolismo desprende CO_2 y flota en el medio de cultivo (Guías de trabajos prácticos, 1999).

El estudio reciente de Rasu *et al.* (2010), analizó las características bioquímicas del fermento de té con el efecto de tiempo de fermentación, Ver tabla 03, haciendo desecar al fermento de té.

Los aminoácidos del fermento de té que se produce durante la fermentación de Kombucha fueron estudiados y los resultados indicaron que el fermento de té es sustancialmente valiosa en proteína cruda y en lisina, el cual es el aminoácido con mayor cantidad siendo su valor de 39.5±0.50 mg/g materia seca para 7 días de fermentación y tiene un valor de 53.1±0.40 mg/g materia seca para 21 días de fermentación, del estudio también se desprende que el crecimiento físico de fermento de té es directamente proporcional con tiempo de fermentación.

Tabla 03. El análisis bioquímico y elemental del fermento de té seco

	Contenido (g/kg materia seca)		
Componentes	**7 días**	**14 días**	**21 días**
Materia seca (%)	96.39±1.04	97.38±0.91	97.35±0.87
Proteína cruda	121.50±1.15	184.10±1.63	31.10±0.98
Fibra cruda	63.30±0.85	24.50±1.22	47.90±0.65
Lípido crudo	18.10±0.56	47.10±0.49	54.30±0.61
Ceniza	8.50±0.51	29.20±0.66	39.70±1.21
Nitrógeno	78.80±0.65	61.60±0.58	52.70±0.84
Fibra ácida	329.0±1.23	404.70±1.52	463.30±1.52
Fibra neutra	389.0±1.52	471.20±1.04	531.30±1.55
Hemicelulosa	60.0±0.65	66.50±0.85	68.00±0.74
	Contenido (g/100 g de materia seca)		
Carbono	42.86±0.50	45.40±0.84	48.13±0.56
Oxígeno	43.85±0.72	46.40±1.00	49.49±0.85
Sodio	0.28±0.01	0.30±0.01	0.33±0.01
Potasio	0.20±0.00	0.17±0.02	0.21±0.01
Fosfórico	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02± 0.00
Calcio	0.02±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00
Cloro	0.03±0.00	0.04±0.00	0.04± 0.00
Magnesio	0.37±0.01	0.40±0.01	0.45±0.00
Hierro	0.05±0.00	0.05±0.00	0.06±0.00
Manganeso	0.07±0.00	0.07±0.00	0.08±0.00
Cinc	0.08±0.00	0.09±0.06	0.09±0.03
Azufre	0.11±0.01	0.12±0.04	0.12±0.02

Fuente: Rasu *et al.* (2010)

Tabla 04. Contenido de aminoácido en el fermento de té desecado

Aminoácidos	**Contenido (mg/g materia seca)**		
esenciales	**7 días**	**14 días**	**21 días**
Isoleucina	28.1±0.51	35.2±0.40	44.2±0.36
Leucina	27.2±0.75	35.9±0.64	45.1±0.60
Lisina	39.5±0.50	48.0±0.36	53.1±0.40
Metionina	6.3±0.55	11.3±0.80	20.2±0.50
Fenilalanina	13.6±0.55	22.3±0.70	30.2±0.60
Treonina	7.7±0.20	13.2±0.58	20.1±0.65
Valina	15.1±0.26	22.3±0.45	30.2±0.61
Triptófano	7.4±0.26	12.3±0.51	21.1±0.45

Fuente: Rasu *et al.* (2010)

2.4.3. Microorganismo que habitan en el fermento de té

En la colonia del fermento de té habitan levaduras y bacterias en crecimiento simbiótico, estos microorganismos incluye a las bacterias: *Acetobacter xylinum, Acetobacter xylinoides, Acetobacter ketogenum, Bacterium gluconicum,* y a las levaduras: *Saccharomycodes ludwigii, Saccharomycodes apiculatus, Schizosaccharomyces pombe, Zygosaccharomyces, Saccharomyces cerevisiae Torula varieties, Pichia fermantans* y otras levaduras (Mitsuoka, 1992) y (Instituto bacteriológico de Moscu, 1950), el número y la diversidad de especies de bacterias y levaduras presentes en los fermentos, varían entre ellos de acuerdo a zonas geográficas. Entonces se puede desprender que el fermento de té no es un sólo microorganismo si no por el contrario, es una colonia simbiótica de varias bacterias y de varias levaduras, con vías metabólicas altamente complejas (Mitsuoka, 1992).

Sin embargo Hernández (1988) y Byun *et al.* (1978), aislaron e identificaron las siguientes levaduras y bacterias: *Brettanomyces, Zygosaccharomyces, Saccharomyces, Apiculatus, Candida Krusei, Candida kifir, Candida albican, Saccharomyces cerevisiae, Brettanomyces bruxelensis* y *gluconoacetobacter xylinus.*

Por otro lado, en una elaboración de bebidas agrias del suero de queso utilizarón el fermento de té, de donde aislaron e identificaron dos tipos de levaduras, el (*Saccharomyces cerevisiae,* y *Brettanomyces bruxelensis*) y dos bacterias (*Gluconoacetobacter xylinus y Gluconoacetobacter aceti*) (Hernandez, 2003).

2.4.4. Metabolismo del fermento de té (actividad simbiótica)

Cuando la glucosa está presente en el sustrato es metabolizada por los microorganismos del fermento del té, una parte de ellas es convertida en CO_2 y en ácidos orgánicos, mientras

que la otra parte de esa glucosa es asimilada para la producción de biomasa. Este comportamiento esta expresada en la siguiente ecuación (Azrad, 1997).

$$C_6H_{12}O_6 + a\,(\text{nitrógeno}) + bO_2 = c\,CO_2 + d\,C_2H_4O_2 + e\,(\text{biomasa}) \ldots (1)$$

Donde:

$C_6H_{12}O_6$: Glucosa
O_2: Oxígeno
CO_2: Dióxido de carbono
a, b, c, d: son coeficientes que dependen de las condiciones fermentables como son la temperatura, el tiempo, la aireación y la agitación (Azrad, 1997).

Para el caso de la producción de Kombucha la fuente de nitrógeno proviene del té.
Las levaduras hidrolizan sacarosa para glucosa y fructosa, este segundo monosacárido es metabolizada en etanol y dióxido de carbono por levaduras Greenwalt *et al.* (1998), mientras que el acetobacter sintetiza celulosa a partir de glucosa en presencia de oxígeno, de ahí la consistencia de la capa que se forma durante la fermentación, el acetobacter también oxida el etanol con una velocidad de reacción alta produciendo gluconato y dioxiacetona, para ello utiliza como sal principal al sulfato de amonio (Hernández, 1988).

Pero la actividad fisiológica principal del acetobacter en la fermentación de la Kombucha, es la conversión del etanol producido por las levaduras en ácido acético en condiciones aeróbicas, este mecanismo se da cuando la fuerza de difusión del medio fermentable mueve el etanol producido para el estrato superior y este se convierte en substrato para las bacterias acéticas ya si se convierte el etanol en acido acético (Dragoljub, 2005), esta producción de ácido acético es muy importante en la formación de los compuestos que le confieren el sabor característico al producto, como los ácidos orgánicos, las vitaminas, los aminoácidos, elementos antibióticos, antitóxicos y más.

De esta manera la producción de Kombucha es verdaderamente complejo a nivel bioquímico (Gunther, 1996 y Irion, 1944).

En la producción de Kombucha, el ácido acético es el ácido orgánico predominante producido por bacterias acéticas. Las levaduras se encargan de producir aminoácidos de las fuentes de nitrógeno disponibles en el té negro (Rasu *et al.,* 2010).

2.4.5. Sustrato de cultivo para el fermento de té

El sustrato más usado en la elaboración de Kombucha es la sacarosa pura, la cual produce un sabor a sidra de manzana, el uso de sacarosa morena conlleva a producir una Kombucha muy agrio, con sabor fuerte a vinagre de sidra (Gunther, 1996).

Las pruebas realizadas Gunther (1996), sobre el uso de diferentes azucares en la fermentación de la Kombucha, llegaron a establecer que cuando se usa azúcar blanca, el producto tiene una buena composición química y buena característica sensorial en cuanto al atributo de sabor; cuando se usa miel de abeja se reporto la presencia de una gran cantidad de sedimentos, esto debido que la miel proporciona factores inhibitorios a las bacterias y levaduras del fermento y estas no se desarrollan adecuadamente (Mitsuoka, 1992).

Las concentraciones de sacarosa a usarse para preparar el medio de cultivo pueden variar de acuerdo a lo que se quiere obtener como producto, es así que puede variarse desde 0, 50, 70, 100 g/l como lo indica Blanc (1996); por otra parte Malbasa *et al.* (2001), recomienda una concentración de sacarosa en el intervalo de 50-100 g/l.

En una comparación de los productos de fermentación (acido láctico) de Kombucha elaborada con sacarosa y con melaza, se concluyo de acuerdo a una prueba de Duncan

múltiple, que la kombucha producida con melaza presenta mayor contenido de ácido láctico a diferencia del preparado con la sacarosa (Malbasa, 2007).

2.4.5.1. Influencia del tipo de té en el sabor de la Kombucha

Los estudios realizados sobre el grado de influencia del tipo de té en el sabor de la Kombucha, es así que cuando se usó té negro lipton se obtuvo una Kombucha con características organolépticas de buen sabor, cuando se uso el té verde lipton se mantuvieron las características de aceptación en cuanto a sabor; mientras que cuando se usó el té de frambuesa celestial el producto Kombucha presentó un sabor a coctel de frutas, para el caso del uso de té de zarzamora celestial la Kombucha resultante presento un sabor parecido al jugo con débil sabor a frutas (Roussin, 1996).

Existen estudios donde se manifiesta que el té verde por su estructura química y efectos positivos en el proceso de bio-transformación puede ser un buen sustrato para la producción de kombucha, pudiendo así reemplazar té verde en lugar de negro (Greenwalt, 2000). Pero Hernández (1988), manifiesta que el té negro azucarado es el mejor substrato donde se desarrolla adecuadamente el fermento de té y produce una Kombucha con características organolépticas muy similares a la sidra.

2.4.5.2. Otros sustratos para la producción de Kombucha

El cultivo del fermento de té es posible realizarse con otros substratos (Eva *et al.,* 2007); es así que existen estudios que evidencian la actividad metabólica del fermento de té con otros substratos como: la glucosa, la fructosa, la maltosa, la dextrina (Reiss, 1994), la melaza (Lonkar *et al.,* 2001). Debe mencionarse que se ha estudiado un substrato muy interesante para la fermentación de Kombucha este es el extracto de Ajipa (Malbasa y Kolarov, 2002), en este estudio el fermento de té metaboliza intensivamente los azucares

presentes, observándose cambios en el pH parecidos a la fermentación en substrato tradicional (té negro endulzado con sacarosa) (Eva *et al.,* 2007).

Dragoljub (2005), preparó Kombucha de hisopillo (*L. satureja montana*) en un laboratorio y llega a la conclusión, que aplicando al medio de fermento un inóculo de 10 % (v/v) en un biorreactor se logra producir Kombucha de hisopillo pero presenta una debilidad en cuanto a sus características organolépticas, sin embargo aplicando una cultura definida como arrancador (fermento de té) y ácido acético o vinagre, se logra obtener Kombucha de hisopillo con características de olor y sabor aceptables.

2.4.6. Fermentación de Kombucha

Kombucha pueda volverse tóxico, esto debido a una contaminación con moho (*Penicillum notatum*) o con una bacteria (*Clostridium botulinum),* ante esta posibilidad debe acidificarse adecuadamente el medio hasta un pH inferior a 4.5, para lo cual puede utilizarse ácido acético proveniente de vinagre blanco, o de una solución de Kombucha fermentada, esto evita que cualquier tipo de moho lo contamine. Existen evidencias de que el *Penicillum notatum* y también el *Clostridium botulinum* no se desarrollan a un pH inferior a 4.5 (Gunther, 1996).

El fermento de té se desarrolla tradicionalmente en un sustrato compuesto por té negro con sacarosa bajo condiciones aeróbicas (Reiss, 1994 y Pereyra *et al.,* 2006). En una producción artesanal la fermentación se lleva a cabo en vasijas, donde el único lugar para transmitir el oxígeno del aire es en el espacio de cabeza del recipiente, para el desarrollo metabólico de las bacterias acéticas presentes es necesario la presencia de oxigeno, por tanto la forma de producción artesanal presenta inconvenientes para generar un adecuado nivel de ácido acético, el cual es característico en este producto (Dragolijub *et al.,* 2006).

En el producto Kombucha en forma artesanal, la fermentación se lleva a cabo en un medio sin agitación, por lo que el nivel de oxigenación del medio es reducido, esta característica dificulta la oxidación de los alcoholes producidos para generar aldehídos y cetonas, que son los que le confieren el flavor característico al producto (Fontana *et al.,* 1991).

2.4.6.1. Influencia de la temperatura en la producción Kombucha

La temperatura juega un papel muy importante en la fermentación, manteniéndose una relación directamente proporcional con la velocidad de fermentación, existen recomendaciones sobre la temperatura de fermentación Roussin (1996), recomienda que esta sea 21.1 °C; otros autores como Dragolijub *et al.* (2006), menciona que las temperaturas de fermentación sean con rangos de 22 - 28°C; sin embargo Gunther (1996), recomienda un temperatura de fermentación a condiciones de medio ambiente con rangos de 15 °C-20 °C que dependan de las condiciones geográficas del lugar.

2.4.6.2. Influencia del tiempo en la producción de Kombucha

El tiempo de fermentación condiciona algunas características fisicoquímicas del producto como la acidez, el pH, los metabolitos (ácidos orgánicos, etanol, etc.) vitaminas, entre otros. Estas características fisicoquímicas presentan una relación directamente proporcional con el tiempo a excepción del pH, en cambio esta presenta una relación inversamente proporcional con el tiempo, ver tabla 05 en ella se observa que a mayor cantidad de días de fermentación el pH baja por la generación de ácidos orgánicos (Pereyra *et al.,* 2006), entonces se establece que a mayor tiempo de fermentación se produce un sabor claramente ácido como vinagre como consecuencia de la generación de ácido acético a partir de las moléculas de monosacáridos presentes en el medio de sustrato (Reiss, 1994); por otro lado Pereyra *et al.* (2006) en su investigación determinó el pH cada tres días en

una fermentación casera y se observo que para un día de fermentación el pH es de 6.34, para 3 días el pH es 5.70, para 9 días es de 2.55 finalmente para 20 días es 1.32.

Tabla 05. Cambios del pH y acidez en la fermentación de Kombucha de hisopillo

Tiempo de fermentación (días)	Evaluación del pH	Acidez total (g/l)
3	5.0	0.77
6	4.13	1.72
7	3.99	2.08
8	3.92	2.16
9	3.80	2.43
10	3.70	2.70
11	3.68	2.84

Fuente: Dragolijub *et al.* (2006)

Un cultivo por lo general debe fermentarse aproximadamente 3 semanas con el fin de consumir la totalidad del azúcar (Azrad, 1997), es claro que este tiempo va a depender de la concentración de azúcar que se use al inicio de la fermentación.

Hasta ahora no hay estudios claros para revelar el efecto de tiempo de fermentación en la síntesis de componentes bioquímicos del fermento de té. Por lo tanto, el comportamiento del incremento de los metabolitos depende del tiempo (Rasu *et al.,* 2010).

2.4.7. Producción de metabolitos en la Kombucha

En una simulación de escalamiento industrial de la producción de Kombucha, mediante un método de algoritmo, se observó que los metabolitos tienen una relación directamente proporcional con el tiempo de fermentación, sin embargo al analizar de acuerdo al volumen de fermentación esta relación no se cumple, ya que los metabolitos decrecen ligeramente a medida que aumenta el volumen del fermentador (Radomir *et al.,* 2005).

En la fermentación de la Kombucha se produce diversos metabolitos, los más importantes son:

2.4.7.1. Etanol

El comportamiento del etanol dentro del proceso de fermentación de la Kombucha, se puede describir en dos fases, la primera es la de generación a partir de los azucares fermentables, hasta alcanzar un máximo de valor, hay reportes que este valor de etanol en la Kombucha alcanza el 1.34 g/l (Blanc, 1996). La segunda fase se caracteriza por la reducción de esa concentración del alcohol, debido a que este se oxida y pasa a formar ácido acético hasta estabilizarse en valores de 0.5-1% de etanol (Minden, 1995).

Usando una concentración de 150 g de fructuosa en un litro de solución se genera 8.11 g etanol/l; utilizando 50 gr de sacarosa por litro de solución se obtiene 6.3 g etanol/l; para azucares monosacáridos como la lactosa y la glucosa los valores de generación de etanol son menores (Reiss, 1994).

2.4.7.2. Ácido láctico

Respecto a la producción de acido láctico, se ha demostrado que con una concentración inicial de sacarosa de 100 g/l, se puede generar hasta 0.6 g/l, esta producción experimentalmente se maximizó hasta 1.15 g/l después de 96 horas de fermentación (Hernández, 1988). Otros autores como Blanc (1996) y Reiss (1994), indican que a generación de ácido láctico está entre los rangos de 0.6 - 0.9 g/l.

2.4.7.3. Ácido acético

Con respecto al comportamiento del ácido acético, se sabe que este es generado por el acetobacter presente a partir del etanol, por medio de la oxidación del alcohol, las concentraciones que se hallaron después de 15 días de fermentación tienen un rango de 4.5 - 5.6 g/l, este nivel de ácido acético generado tiende a disminuir posteriormente, debido a que continua la oxidación, generándose CO_2 y agua; es así que hay reportes que indican que luego de 5 días se obtiene ácido acético en una concentración de 5 g/l, mientras que en

la fermentación de 10 días la concentración de acido acético se reduce hasta 2.1 g/l (Blanc, 1996 y Reiss, 1994).

2.4.7.4. Vitamina C

Con respecto a vitamina C, que es uno de los compuestos más valiosos de este producto, se ha determinado que su generación no depende del volumen del fermentador, la variable que lo condiciona es el tiempo de fermentación (ver figura 08)

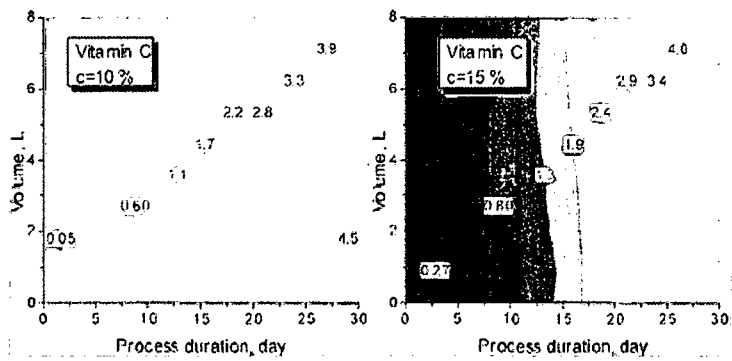


Fig. 08. Incremento de la vitamina C en la fermentación (Malbasa *et al.*, 2001).

2.4.7.5. Ácido glucónico / ácido glucorónico

En lo que respecta a la producción de ácido glucónico, se debe mencionar que el comportamiento que presenta es en forma creciente, alcanzando altas concentraciones mayores a 30 g/l, mientras que para el ácido glucorónico su producción es de 5.8 g/l, este valor es alcanzado con una concentración inicial de sacarosa de 100 g/l (Blanc, 1996). El ácido glucorónico es el metabolito principal de la bebida refrescante Kombucha, este tipo de ácido es muy beneficioso para la salud (Hemmat, 2009).

2.4.8. Importancia de Kombucha en la salud

Se han realizado ensayos para determinar el grado de influencia de la Kombucha en la salud; es así que en ratas se han efectuado pruebas de adhesiones peritoneales, donde se concluyó que administrándoles Kombucha a las unidades experimentales, se logra

disminuir las adhesiones peritoneales, estas adhesiones son la causa más frecuente de reoperaciones por obstrucción del tubo digestivo, entonces un remedio puede ser la bebida fermentada denominada "Kombucha (Hemmat, 2009). También utilizando ratas se hizo una comparación del efecto de té negro y Kombucha en el nivel de glucosa en la sangre de ratas diabéticas, donde los resultados muestran que la bebida es realmente diferente al té negro en cuanto al nivel de glucosa que estos trasmiten a la sangre, brindando la Kombucha un efecto anti-diabético, este efecto puede ser debido a los componentes de polifenoles del té negro que quedan en el producto fermentado (Jancovic y Stojanovic, 1994).

La Universidad Nipona de Ciencias Veterinarias y Animales en Kyonancho Japón afirma que a medida que uno envejece la flora intestinal cambia sus proporciones relativas. Las *Bifidobacterias* disminuyen, mientras que las *Clostridias* aumentan de manera significativa. El metabolismo de la bacteria parece desempeñar un papel más importante en la salud humana que lo que se creía anteriormente, y por este motivo, el cambio que generan las bacterias en la salud puede proporcionar indicaciones presuntas sobre la estabilidad.

Los polifenoles del té parecen incrementar de manera moderada el crecimiento de las *Bifidobacterias* e inhiben de manera selectiva las diferentes especies del género *Clostridia* (Azrad, 1997). En cualquier caso, esta información proporciona por lo menos una razón para investigar posteriormente el efecto particular del Kombucha en la salud. Además, Kombucha produce el biofilm microbiano como un material biológico potente para aplicaciones diversas en muchos campos (Dufresne *et al.,* 2001).

Kombucha es una bebida adecuadamente conocida con un valor alimenticio alto y con efectos curativos (Malbasa y Kolarov, 2002), sus complejos procesos y creación de

elementos valiosos, cuando son absorbidos a través de la ingesta (la bebida), producen en el organismo un bienestar general, no produce efectos colaterales ni secundarios, sus propiedades agradan al metabolismo, y la función de las membranas celulares se estabiliza y se regula (Jose *et al.,* 2005); mejora cuadros de hemorroides., reumatismo, artritis, logra regenerar las paredes celulares y coadyuva a prevenir la arteriosclerosis, también normaliza la presión alta, disminuye la irritabilidad, el dolor de cabeza y hasta el mareo, etc. Pero estas manifestaciones son productos de juicios populares, por lo que se requiere de investigaciones y experimentos científicos (Pereyra *et al.,* 2006),

2.5. Producto nutracéutico

Nutracéutico se refiere a substancias que pueden ser consideradas como un alimento o parte de un alimento las cuales pueden proporcionar beneficios médicos para la salud (Judge, 2010, Astiasarán *et al.,* 1999 y Boucher, 1999), es decir que se trata del componente que le otorga funcionalidad al alimento (Alderete, 2010), entonces está a medio camino entre los fármacos, que se obtienen en su mayoría por síntesis química, y los productos de herbolario (Cacabelos, 2004), otro concepto de alimento nutracéutico ha sido recientemente reconocido como "Aquel suplemento dietético que proporciona una forma concentrada de un agente presumiblemente bioactivo de un alimento, presentado en una matriz no alimenticia y utilizado para incrementar la salud en dosis que exceden aquellas que pudieran ser obtenidas del alimento normal" (Zeisel, 1999).

En el mercado se ofrecen como nutracéuticos sustancias que poseen una propiedad funcional comprobada, pero cuyo consumo dentro de la dieta normal no alcanzaría los niveles que permiten constatar sus efectos (Alderete, 2010). De algún modo, podría definirse como el "uso del alimento como medicamento" (Cacabelos, 2004).

La población piensa que los suplementos dietéticos les ayudarán a sentirse más fuertes y saludables, serán más energéticas y prevendrán enfermedades. Algunas personas tratan estos productos cuando sienten que los tratamientos estándares no han dado resultado (Judge, 2010).

2.6. Evaluación sensorial de los alimentos

La evaluación sensorial es una técnica de medición y análisis tan importante como los métodos químicos, físicos, microbiológicos, etc. (Anzaldúa, 1994), se constituyen en la actualidad una de las más importantes herramientas para el logro del mejor desenvolvimiento de las actividades de industria alimentaria. Así pues por su aplicación en el control de calidad y de procesos, en el diseño y desarrollo de nuevos productos y en la estrategia del lanzamiento de los mismos al comercio, la hace, sin duda alguna, el coparticipe del desarrollo y avance mundial de la alimentación (Ureña y Arrigo, 1999).

La evaluación esta constituida por dos procesos definidos según su función: el análisis sensorial y el análisis estadístico. Mediante el primero se obtienen las apreciaciones de los jueces a manera de datos que serán posteriormente trasformados y valorados por el segundo, dándoles con ello la objetividad deseada. Los diseños experimentales están referidos sólo a la secuencia particular en la cual un conjunto de muestras es presentada a una población especifica de jueces, mientras que el análisis estadístico lo esta a las operaciones matemáticas especificas aplicadas a los datos obtenidos del análisis sensorial (Ureña y Arrigo, 1999). Mediante los sentidos se pueden evaluar diferentes atributos sensoriales como los que se muestran en la figura.09.

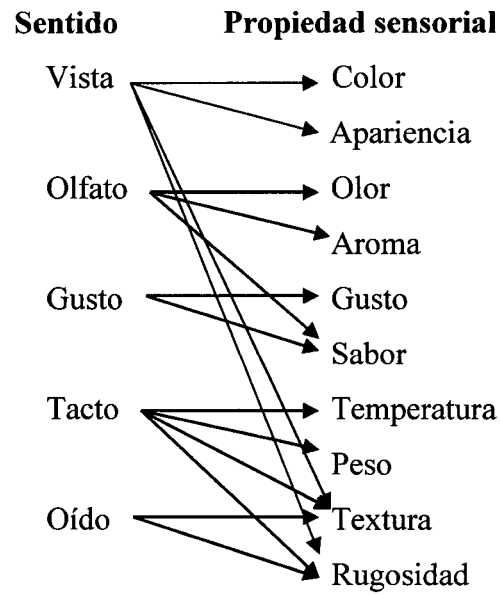


Fig. 09. Relación de los sentidos y las propiedades sensoriales (Anzaldúa, 1994)

Para hacer uso de los sentidos arriba descritos, es necesario saber cual es el mecanismo de percepción del cerebro para valorar las características sensoriales de una muestra, este mecanismo de percepción puede observarse en la siguiente figura.

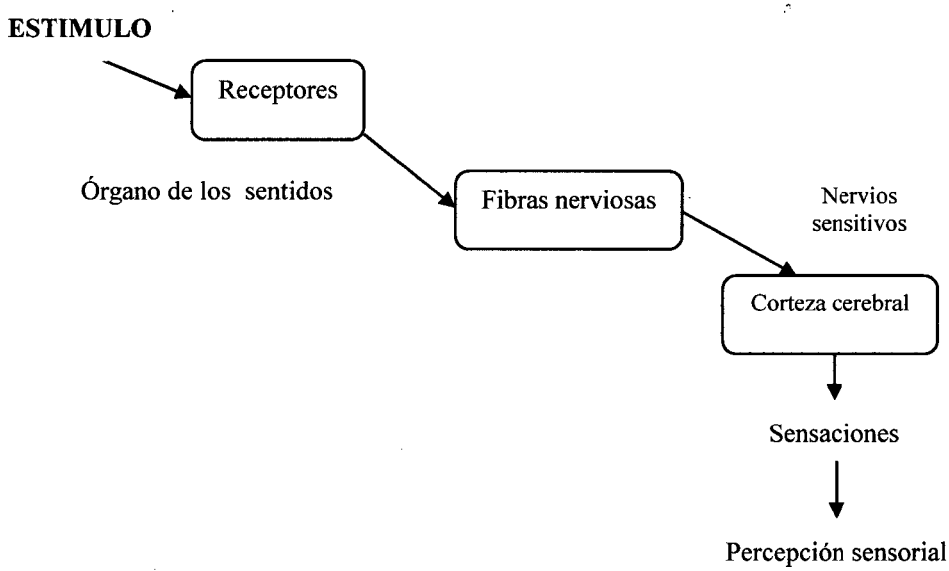


Fig. 10. Mecanismo de percepción (Espinoza, 2007)

El análisis sensorial de los alimentos se lleva a cabo de acuerdo con diferentes pruebas, según sea la finalidad para la que se efectué. Existen tres tipos principales de pruebas:

2.6.1. Pruebas afectivas

Las pruebas afectivas son aquellas en las cuales el juez expresa su reacción subjetiva ante el producto, indicando si le gusta o le disgusta (Larmond, 1973), para esta prueba es necesario contar con un mínimo de 30 jueces no entrenados estos deben ser consumidores habituales y/o compradores del tipo alimento en cuestión.

Es necesario utilizar escalas de más de tres puntos. Así, la escala puede ampliarse a cinco, siete, o nueve puntos, simplemente añadiendo diversos grados de gusto o disgusto (Anzaldúa, 1982).

Tabla 06. Escala hedónica verbal de nueve puntos

Descripción	Valor
Me gusta muchísimo	+4
Me gusta mucho	+3
Me gusta bastante	+2
Me gusta ligeramente	+1
Ni me gusta ni me disgusta	0
Me disgusta ligeramente	-1
Me disgusta bastante	-2
Me disgusta mucho	-3
Me disgusta muchísimo	-4

Fuente: Anzaldúa (1982)

El que un alimento le guste a alguien no quiere decir que esa persona vaya a querer comprarlo. El deseo de una persona para adquirir un producto es lo que se llama ***aceptación,*** y no solo depende de la impresión agradable o desagradable que el juez reciba

al probar un alimento sino también de aspectos culturales, socioeconómicos, de hábitos, etc (Anzaldúa, 1994).

2.6.2. Pruebas discriminativas

Las pruebas discriminativas son aquellas en las que no se requiere conocer la sensación subjetiva que produce un alimento a una persona, no que se desea establecer si hay diferencia o no entre dos o más muestras (Larmond, 1973).

2.6.3. Pruebas descriptivas

En las pruebas descriptivas se trata de definir las propiedades del alimento y medirlas de la manera más objetiva posible. Aquí no son importantes las preferencias o aversiones de los jueces, y no es tan importante saber si las diferencias entre las muestras son detectadas, sino cual es la magnitud o intensidad de los atributos del aliento (Amerine *et al.,* 1965), por lo tanto, proporcionan mucha más información acerca del producto que las otras pruebas; sin embargo, son más difíciles de realizar (Anzaldúa, 1982). Las pruebas descriptivas más comúnmente empleadas son las siguientes:

- **Análisis del perfil del sabor:** Consiste en describir el olor y sabor integral de un producto, así como sus atributos individuales.

- **Análisis del perfil de textura:** En términos de sus características mecánicas, geométricas y de contenido de grasa y humedad, así como del orden en que estas se presentan desde la primera mordida del producto hasta su consumo (Ureña y Arrigo, 1999).

- **Análisis descriptivo cuantitativo:** El método tiene como objetivo identificar y cuantificar todas las características sensoriales de un producto y la información generada

sirve para construir un modelo multidimensional que describe los parámetros que definen a uno o varios productos (Espinoza, 2007).

2.7. La espectrofotometría

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma (Abril *et. al.,* 2010).

Los aparatos de medida de la absorción de la radiación electromagnética se denominan espectrofotómetros y pueden representarse de forma sencilla mediante la siguiente figura:

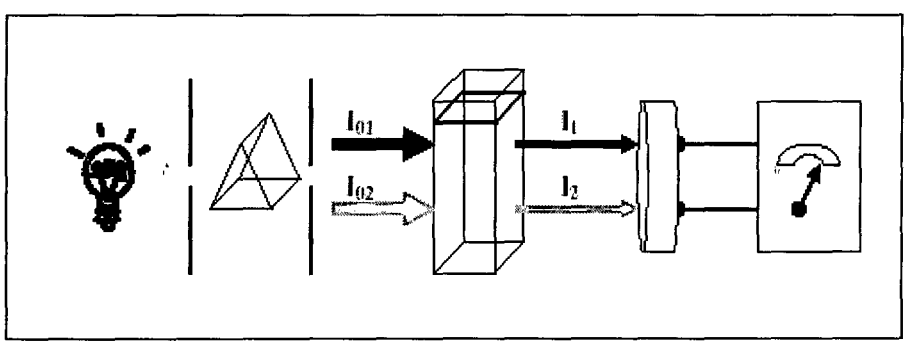


Fig. 11. Sistema dispersivo del espectrofotómetro (Baeza, 2007)

La luz procedente de la fuente se hace pasar a través del monocromador, que la desdobla en haces monocromáticos. El colimador tiene una rendija de ajuste variable, y según su abertura se obtiene luz de una determinada longitud de onda. La longitud de onda que se desee utilizar se selecciona variando la posición del monocromador. La luz que sale del colimador se hace pasar por la solución y luego incide sobre el fototubo, donde se detecta. La señal se envía a un registrador, a la fotocelda llegan sendos haces de luz no absorbidos I1 y I2 (Baeza, 2007).

La absorbancia (A), es un concepto más relacionado con la muestra puesto que indica la cantidad de luz absorbida por la misma, y se define como el logaritmo de 1/T, en consecuencia:

$$A = \log\frac{1}{T} = -\log T = -\log\frac{It}{Io} \quad \text{.....} (2)$$

Cuando la intensidad incidente y transmitida son iguales (Io = It), la transmitancia es del 100% e indica que la muestra no absorbe a una determinada longitud de onda, y entonces A vale log 1 = 0 (Hamilton, 1981).

La absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración –a mayor número de moléculas mayor interacción de la luz con ellas; también depende de la distancia que recorre la luz por la solución a igual concentración, cuanto mayor distancia recorre la luz por la muestra más moléculas se encontrará (Abril *et al.*, 2010).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Equipos, materiales, medios de cultivo, reactivos e insumos

A continuación se detallan todos los materiales, equipos, reactivos y otros, que se utilizaron en la investigación de la tesis.

3.1.1. Equipos

- **Balanza:** CITIZEN CT 602 capacidad 600g * 0.01g
- **Incubadora:** YAMATO scientific., Ltd.
- **Autoclave:** FIMET, unidad de medida de presión (psi y bar)
- **Biorreactor:** Acero inoxidable estándar sin marca capacidad de 24 l con agitador de 120 rpm.
- **Microscopio:** Óptico MOTIC LISTED potencia: 12 v
- **Bomba de vacio:** GS; 68 l/m, HP = 0.07 psi=45
- **Potenciómetro:** SCHOTT
- **Espectrofotómetro**

3.1.2. Materiales

- Matraces Erlenmeyer de 250ml y de 100ml, Matraz kitazato
- Probeta
- Termómetro
- Pipetas
- Lunas porta y cubre objeto, espátula de Drigalski
- Tubos de ensayo

3.1.3. Medios de cultivo y reactivos

- **Agar Sabuoraud - 4% de glucosa**
- **Solución Raulin:** Composición (Peptona, NaCl, $Na_2HPO_4.12H_2O$, KH_2PO_4, Agua destilada)
- **Agar Manitol:** Composición (Extracto de levadura, manitol, agar, peptona y agua destilada)
- **Kits de colorantes para la coloración Gram**

- Disolución de hidróxido sódico 0.1 N
- Solución indicadora de fenolftaleína

3.1.4. Insumos

- Fermento de té, azúcar y té negro

3.2. Metodología (etapas del proceso de la investigación)

La investigación es de tipo aplicativo y de nivel experimental, esto implica el empleo de instrumentos, equipos y reactivos de laboratorio para la manipulación de las variables independientes, para observar los efectos que ocurre en las variables dependientes.

La investigación consiste en cuatro etapas las cuales la metodología se detalla a continuación para cada una de ellas.

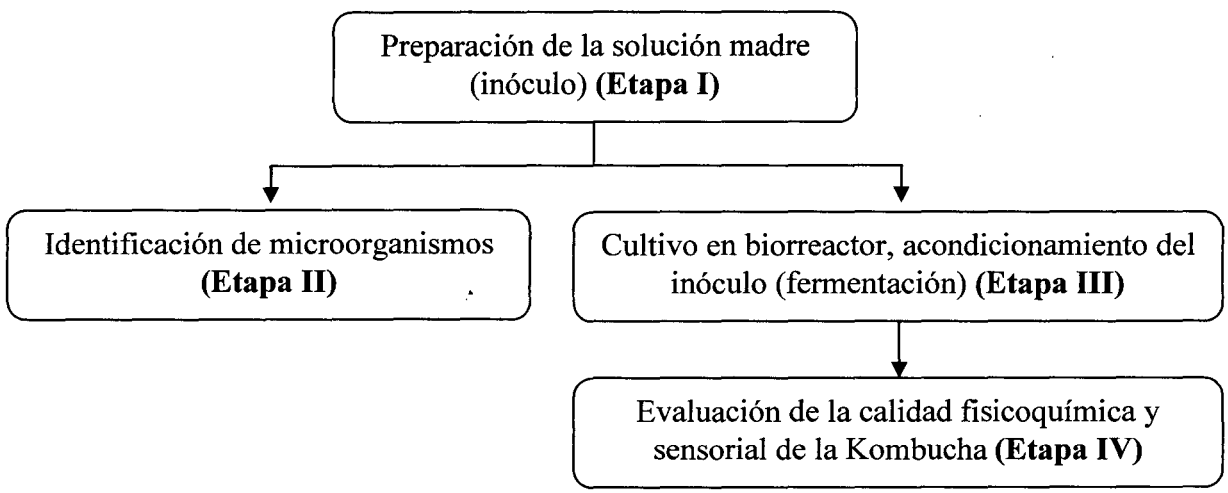


Fig. 12. Esquematización de las etapas en estudio

3.2.1. Preparación de la solución madre (inóculo) (ETAPA I)

Para la preparación del inóculo se utilizó el método propuesto por Soto (1961), la finalidad es producir muestras para la identificación de microorganismos (bacterias acéticas y levaduras) y la obtención de inóculo para la fermentación; que consta en hacer hervir 2 l de agua durante 3 minutos, seguido de un reposo de 4.5 g/l. de té negro por un tiempo de 20 minutos, se filtró con tamiz, a este se agregó azúcar 80 g/l, al filtrado se dejó enfriar hasta una temperatura ambiente, a éste medio se adicionó el fermento de té 400 g/l

cultivado en esta localidad, y se hizo incubar durante 7 días a 28 °C±2, el líquido incubado y el fermento de té juntos se licuó, a este inóculo se determinó su característica fisicoquímica (pH, acidez y °Brix) y finalmente se refrigeró a 4 °C para su utilización en las etapas II y III, en la fig. 13 se muestra el diagrama de flujo para la preparación del inóculo.

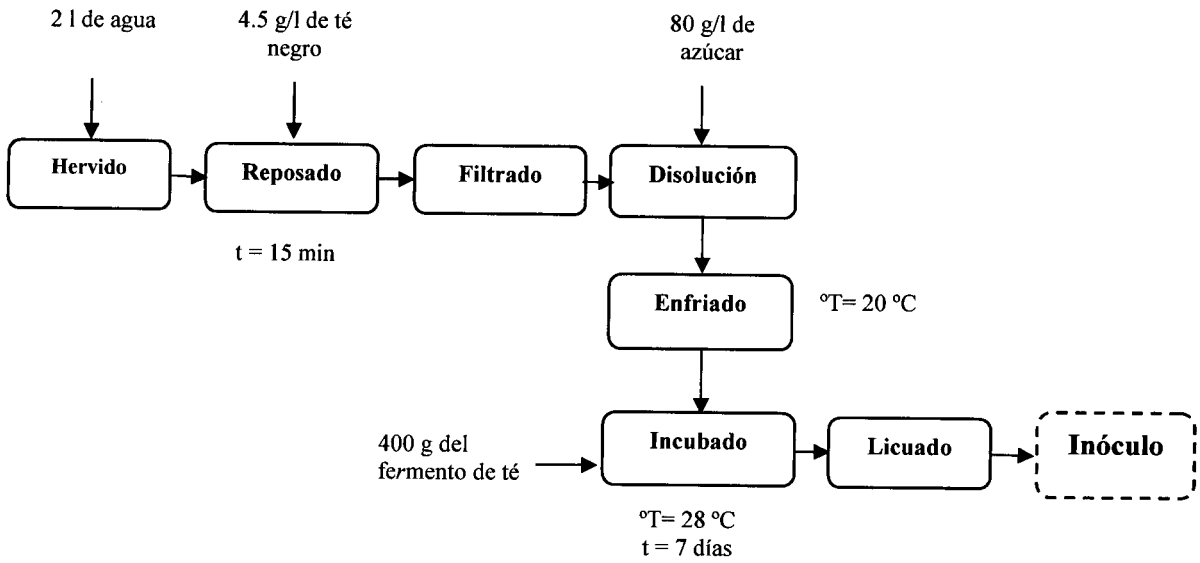


Fig. 13. Esquematización de la preparación del inóculo

3.2.2. Identificación de microorganismos (ETAPA II)

Para la identificación de bacterias acéticas y levaduras se trabajó con las muestras del inóculo producidas en la etapa I.

a). Identificación de levaduras

Para la identificación de levaduras se utilizó el método siembra por superficie, propuesto por Estela (2007), que consiste en:

- Transferir un volumen de la muestra de (3 ml) a una solución de Raulin (7 ml) esta solución tiene el poder inhibitorio ante las bacterias y se hizo incubar por 24 h a la temperatura 28°C±2, entonces con esto se consigue la muerte de las bacterias.
- Se realizó seis diluciones de la muestra en los tubos de ensayo conteniendo 9 ml de agua peptonada previamente esterilizada.
- Se adicionó el agar Saboraud a las placas petri y se dejó que solidifique; se tomó 1 ml de cada dilución con una pipeta estéril y se vertió a las respectivas placas y en seguida se expandió con una espátula de Drigalski.
- Finalmente se llevó a incubar a 4 días a una temperatura de 28°C±2.
- Se verificó macroscópicamente (tamaño, color, forma, elevación, margen, superficie y consistencia de las colonias) con un lente de aumento de las tres últimas placas esto por que en las primeras las colonias se encuentran muy aglomeradas, donde se escogió minuciosamente una colonia bien aislada y definida, y de esta colonia se hizo un preparado microscópico (tinción en fresco) y se evaluó. Si la colonia tiene células de un solo tipo, entonces se tomó el restante de la colonia y se transfirió a los tres tubos con agar Saboraud inclinado y se incubó a temperatura entre 28 °C±2.
- Después de 48 h de incubar la colonia en agar Saboraud inclinado se controló microscópicamente (forma de la célula y reproducción asexual) haciendo una tinción en fresco de la pureza de la colonia que se obtuvo.

Identificación de levaduras por método siembra por superficie se esquematiza en la siguiente figura.

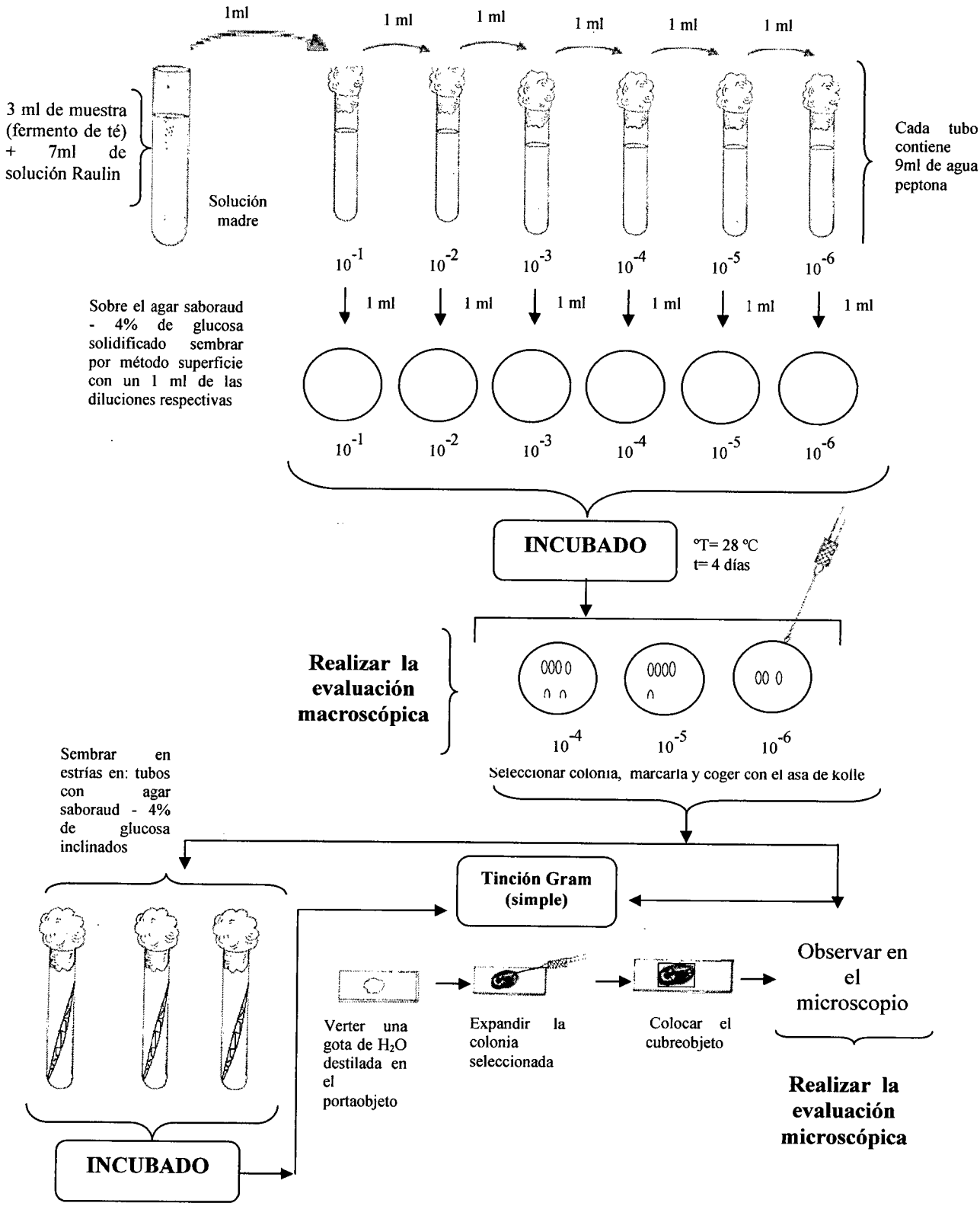


Fig. 14. Esquematización de identificación de levaduras del fermento de té

b). Identificación de bacterias acéticas

Se utilizó un medio estándar para la identificación de bacterias acéticas, este método es siembra por superficie y es propuesto por Quillama (2007), que consiste en:

- Preparar el agar manitol y llenarlas a las placas petri estériles y dejar que solidifique
- Se sembró en las placas con 2 gotas de muestra (fermento de té) y se expandió inmediatamente con una espátula de drigalski en toda la superficie
- Se hizo incubar las placas a 28°C±2 por 3 días
- Luego se realizó una evaluación macroscópica (tamaño, color, forma, elevación, margen, superficie y consistencia de la colonia) con un lente de aumento
- Finalmente se realizó una tinción Gram y se observó en el microscopio la forma de la célula y la reacción a la coloración Gram

La identificación de bacterias acéticas por método siembra por superficie se esquematiza detalladamente en la figura 15.

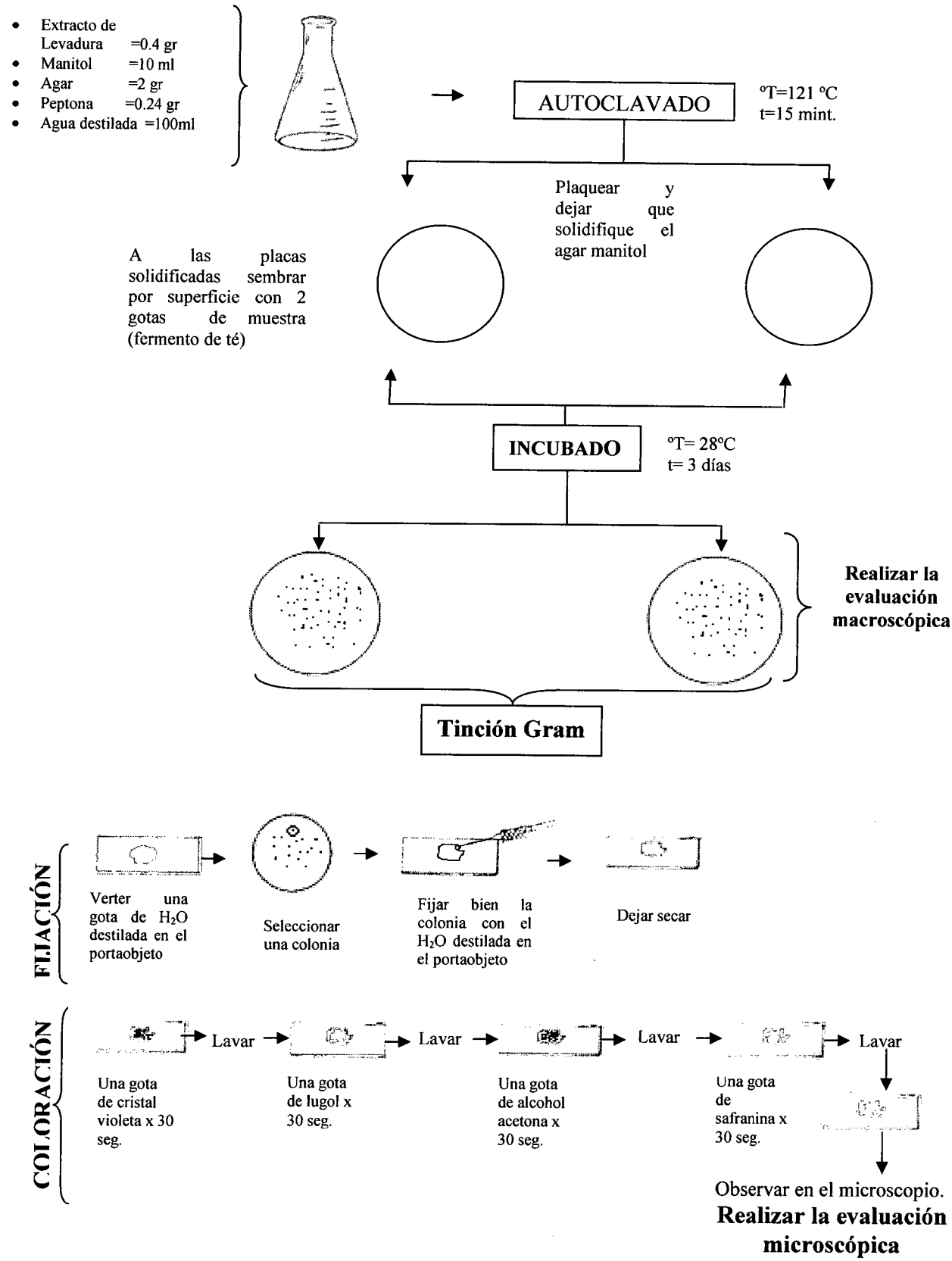


Fig. 15. Esquematización de identificación de bacterias acéticas en el fermento de té

3.2.3. Cultivo en biorreactor, acondicionamiento del inóculo (fermentación) (ETAPA III)

Para la producción de Kombucha se utilizó el método propuesto por Gunther (1996) y Dragoljub *et al.* (2005), cuyo proceso se detalla en la fig. 16 y que consiste en:

- Hervir 5 L de agua durante 5 minutos, en éste se reposó una concentración de té negro que es una variable fija de 4 g/l y 8 g/l durante 30 minutos, después se filtró con un tamiz.
- A este filtrado se agregó 100 g/l de azúcar (constante) a los ocho tratamientos. Se dejó enfriar hasta temperatura ambiente.
- Este medio se hizo fermentar en un biorreactor controlado, para esto se inoculó 250 ml de inóculo proveniente de la etapa I por un tiempo que es una variable fija de 36 horas y 72 horas y una temperatura también variable fija de 18°C y 28°C.
- Durante la fermentación de Kombucha se midió la variación de las características fisicoquímicas como: pH, acidez, °Brix y absorbancia, siendo estas variables de respuesta.
- Terminada la fermentación, se realizó un filtrado al vacio, este filtrado se hizo reposar en refrigeración por un tiempo de 4 días a 4 °C, luego se trasegó.
- Al producto se le envasó en botellas de vidrio de 300 ml de capacidad, seguidamente al producto embotellado se pasteurizó a 75 °C durante 20 minutos y finalmente se almacenó en refrigeración; al que se evaluó las características sensoriales los atributos de color, olor, sabor y apariencia general estas son variables de respuesta en estudio.

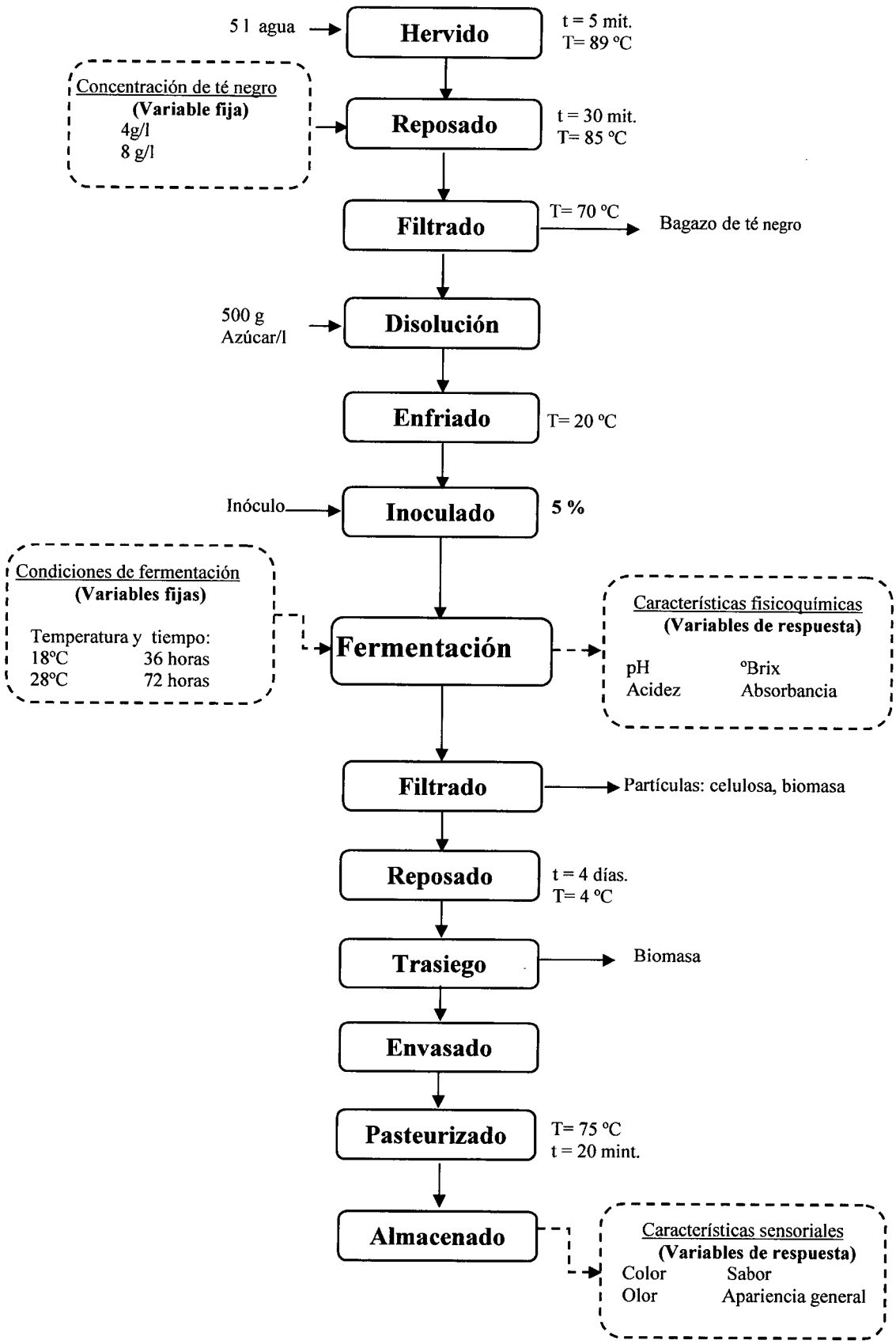


Fig. 16. Diagrama de bloques de la producción de Kombucha

3.2.4. Evaluación de la calidad fisicoquímica y sensorial de la Kombucha (ETAPA IV)

a). Análisis fisicoquímico: En la investigación se consideró los siguientes análisis fisicoquímicos:

- **Determinación de acidez:** Se determinó cada 3 - 5 horas durante su tiempo de fermentación (36 y 72 horas) por triplicado, esto de acuerdo al método propuesto por A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemist. 11ª Ed., página 520, 30.068.

La determinación se efectuó mediante volumetría de neutralización en presencia de solución alcohólica de fenolftaleína como indicador. Que consta en conocer la totalidad de los ácidos volátiles y fijos que contiene la Kombucha expresada en gramos de acido acético por Litro de Kombucha.

- **Determinación del pH:** Se determinó cada 3 - 5 horas durante la fermentación por triplicado utilizando un equipo denominado pH-metro; primero la temperatura de control se ajusta a la temperatura de la solución que se esta midiendo en este caso es la Kombucha, luego se introduce el electrodo del potenciómetro y se esperara unos minutos hasta que se estabilice, el valor de pH determinado aparecerá digitalmente en el pH-metro (Pereyra *et al.*, 2006).

- **Determinación de °Brix:** Para medir se utilizó un aparato llamado refractómetro, en el cual se coloca la muestra y a través de una lente se observa la medida, donde mide el cociente total de sacarosa disuelta en la Kombucha esta medida se realizó cada 3- 5 horas durante la fermentación del producto.

- **Determinación de la absorbancia:** Para hacer este tipo de medida se empleó un espectrofotómetro; La espectrofotometría UV-visible que es una técnica analítica que permitió determinar la concentración de partículas que tiene la Kombucha fermentada. Las

moléculas del medio fermentativo absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración que tiene este. En el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la Kombucha en su etapa de fermentación con esta medición se busca la intensidad del color de la misma (Baeza, 2007).

Por lo tanto se estudió la cinética de fermentación de la Kombucha, en este estudio el medio de fermentación ha sido sometida a distintos tratamientos, para ello se evaluó la formación de ácido acético, el comportamiento de pH, el cambio de la absorbancia y los °Brix en los diferentes tratamientos en la producción de Kombucha.

b). Evaluación de análisis sensorial

La degustación de las muestras se realizó con 22 jueces, la técnica a emplearse en la evaluación sensorial como la diferenciación de sabores. Los jueces fueron los estudiantes del curso de control de calidad de la Escuela Académica profesional de Ingeniería Agroindustrial.

Para efectos del análisis sensorial se le asignó códigos a cada uno de los tratamientos, tal como se detalla en la tabla 07.

Tabla 07. Codificación de los tratamientos para la evaluación sensorial

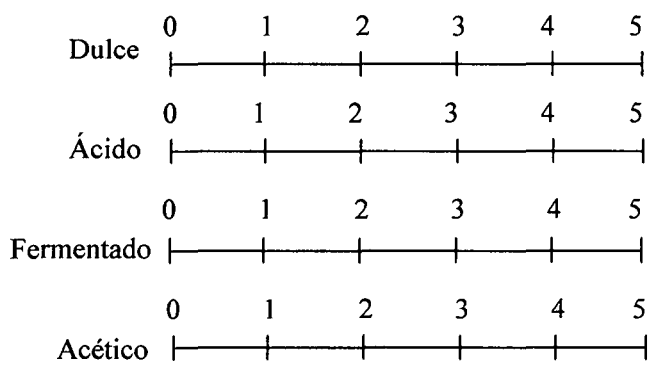
N° de Tratamientos	Concentración de té negro	Tiempo de fermentación	Temperatura de fermentación
Tratamiento1= (M-465)	4 g/l	36 horas	18 °C
Tratamiento2 = (M-789)	8 g/l	36 horas	18 °C
Tratamiento3 = (M-654)	4 g/l	72 horas	18 °C
Tratamiento4 = (M-832)	8 g/l	72 horas	18 °C
Tratamiento5 = (M-423)	4 g/l	36 horas	28 °C
Tratamiento6 = (M-796)	8 g/l	36 horas	28 °C
Tratamiento7 = (M-649)	4 g/l	72 horas	28 °C
Tratamiento8 = (M-571)	8 g/l	72 horas	28 °C

Este tipo de evaluación sensorial los datos numéricos que representan nombres posicionados según una escala dimensionada, se presentan a los jueces una cartilla para la evaluación del producto y su calificación ver (tabla 08 y figura 17), a través de los cuales se obtienen nuevos datos para realizar su tratamiento estadístico, el cual facilita la evaluación de determinados respuestas que se desea obtener. La cartilla contenía las siguientes evaluaciones:

Tabla 08. Cartilla de evaluación sensorial en sus distintos atributos

		Muestra			
Puntajes	**Escala**	**Color**	**Olor**	**Sabor**	**AG**
7	Me gusta mucho				
6	Me gusta bastante				
5	Me gusta ligeramente				
4	Ni me gusta ni me disgusta				
3	Me disgusta ligeramente				
2	Me disgusta bastante				
1	Me disgusta mucho				

Test de control para diferenciar sabores



Test de control para diferenciar color

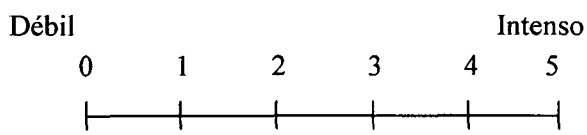


Fig. 17. Diferenciación de sabores y color

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Características fisicoquímicas de la solución madre (inóculo)

El inóculo preparado en la etapa I presenta las características fisicoquímicas que se observa en la tabla 9. Este inóculo se utilizó para la fermentación de los ocho tratamientos diseñados para la presente investigación.

Tabla 9. Características fisicoquímicas del inóculo

Características	Valor
pH	3.45 ± 0.005
Acidez (g. de ácido acético/l de muestra)	5.2 ± 0.05
°Brix	5.79 ± 0.00

Si la producción se inicia con bajas concentraciones de inóculo; existe un retraso en la velocidad de formar el producto, por tanto puede ser insatisfactoria. En el estudio la fermentación de kombucha se realizó con un 5% de inóculo y en general se requiere las siguientes concentraciones, para bacterias: 0.1-3.0%, actinomicetos: 5-10%, hongos: 5-10%, suspensión de esporas: $1\text{-}5.10^5$/L solución de cultivo (Crueger, 1993).

Dragoljub (2005), para la inoculación del preparado de Kombucha tradicional utilizó un 10 % v/v (volumen del medio/ volumen del inóculo), mientras que Radomir *et al.* (2005), en su investigación de aumento de escala en la producción de Kombucha por un algoritmo, el medio fue inoculado con 10-15 % (v/v) de caldo de fermentación del fermento de té; por otro lado Estela (2007), indica que la concentración de inóculo es de 3-5 % (v/v) esto en caso de levaduras.

Como en el fermento de té habitan levaduras y bacterias, dio por conveniente utilizar una concentración de inóculo de un 5% (v/v) para las fermentaciones de Kombucha en el biorreactor.

4.2. Características morfológicas de las colonias en el fermento de té

4.2.1. Características macroscópicas y microscópicas de las levaduras

En el fermento de té de la localidad de Abancay, utilizado en la fermentación de la presente investigación se encontró características morfológicas con respecto a las levaduras que permitirán diferenciar los géneros presentes, las que se observan en la tabla 10.

4.2.1.1. Evaluación macroscópica de las levaduras del fermento de té

Tienen las siguientes características ver la tabla 10.

Tabla 10. Evaluación macroscópica de las levaduras del fermento de té

Características macroscópica						
Tamaño de la colonia	**Color de la colonia**	**Forma de la colonia**	**Elevación de la colonia**	**Margen de la colonia**	**Superficie de la colonia**	**Consistencia de la colonia**
Grande	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Lisa y brillante	Mantecosa
Mediana	Rojo	Circular	Cúpula	Entero	Lisa y brillante	Mantecosa
Pequeña	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Lisa y brillante	Mantecosa

Donde: Grande: Diámetro > a 1 mm.

Mediana: Diámetro = a 1 mm.

Pequeña: Diámetro < a 1 mm.

a). Tamaño de la colonia

En cuanto al tamaño de colonias, según Mendo (2003), clasifica el tamaño de las colonias de la siguiente forma: colonia pequeña de diámetro menor a 1mm, colonia mediana de

diámetro aproximadamente igual a 1 mm y colonia grande con un diámetro mayor a 1 mm. Estos tres tipos de colonias de levaduras coinciden con lo citado de Mendo esto en el agar saboraud de 4 % de glucosa como se muestra en el anexo fotografía 01.

b). Color de la colonia

Según la tabla 10 el color predominante de las colonias formadas en el cultivo fue blanco, este color caracteriza al género de levaduras *Saccharomyces, kloeckera, Cándida albicans y Hansenula anomala* como lo menciona Quintana (1993); la presencia de colonias coloreadas como rojo-anaranjado son características de otras especies como es el caso del género *Rhodotorula,* color que manifiesta esta levadura por su riqueza en carotenoides (Linares *et al.*, 2001); por otro lado Bowman *et al.* (1975), manifiesta que el color de una colonia roja rosa caracteriza al género *Sporobolomyces y Rhodotorula*; sin embargo Pitt & Hocking (1997), comenta que las colonias rosadas o rojas pertenecen a las levaduras: *Rhodotorula mucilaginosa, Rhodotorula glutinis.*

El color plomo oscuro es característica del género de levaduras *Endomycopsis spp.* (Quintana, 1993), como no se observo en el cultivo efectuado en la investigación el color plomo en las colonias formadas, se puede asumir que solo existen levaduras que se caracterizan por color blanco y rojo.

c). Forma de la colonia

La forma predominante de las colonias que se desarrollaron en el cultivo de la investigación fueron circulares, que caracteriza a los géneros de levadura, *Saccharomyces, Brettanomyces, Cándida stellata, y Pichia* como lo indica Estela (2007), por otro lado Linares *et al.* (2001), menciona que si se observa un micelio aéreo definido debe considerarse la posibilidad de que se trate de ciertas especies de levaduras que puedan formar micelio como *Geotrichum* y *Trichosporon o Blastoschizomyces* que se caracteriza

por tener la forma filamentosa; y la forma irregular (tipo coliflor) es característica de las levaduras *Candida parapsitosis* y *Kloeckera apiculata* (Estela, 2007 y Linares *et al.*, 2001); en la investigación realizada sólo se encontró la forma circular (ver figura 30 en anexo) de todas las colonias, entonces se puede proponer que sólo hay levaduras que desarrollan las formas circulares.

d). Elevación de la colonia

La elevación de las colonias pueden darse de distintas maneras, es así que existen elevaciones de colonia tipo chata o plana, elevada, convexa, cúpula, umbonada y umbilicada, ver figura 31 en anexos (Moreno *et al.*, 2000), estos tipos de elevación van a depender del género que exista y/o predomine en el cultivo, en la investigación realizada el tipo de elevación que más predomina es la de tipo convexa, este tipo de elevación de la colonia es una característica de los géneros de levadura, *Saccharomyces*, *Brettanomyces, Hansenula y Pichia* así lo indica Fleming III (1977), por otro lado Linares *et al.* (2001), comenta que las colonias del genero *Rhodotorula y Cándida* es la de tipo cúpula. Por tanto de la observación efectuada se desprende que sólo existen levaduras con la elevación de tipo convexa y cúpula.

e). Margen de la colonia

El margen de las colonias se refiere al borde que puede visualizarse macroscópicamente de las colonias desarrolladas en un cultivo, en levaduras se pueden encontrar colonias de bordes enteros, ondulado, lobulado, aserrado, filamentoso y rizoide, ver figura 32 en anexo (Campos, 2005), el borde entero caracteriza al género de *Saccharomyces*, de bordes ondulados en las colonias de *Candida parapsitosis* y de bordes filamentosos como es el caso de colonias de *Geotrichum candidum,* entre otros; en la tabla 10 se puede visualizar que el margen que predomina en el cultivo efectuado del fermento de té, es la de bordes

enteros, este tipo de borde formado es típico de levaduras de los siguientes géneros: *Saccharomyces*, zygosaccharomyces *Brettanomyces, Hansenula, Cryptococcus y Pichia* (Estela, 2007 y Linares *et al.*, 2001); entonces se puede proponer que existen levaduras que forman margen entero.

f). Superficie de la colonia

La superficie de las colonias que se desarrollaron a partir del fermento de té, presentan una predominancia de ser de naturaleza *lisa y brillante*, como se puede ver en la fotografía 01. Esta característica macroscópica observada, caracteriza al género de levaduras *Saccharomyces*, *Brettanomyces, Cándida albicans, Hansenula* y *Pichia* (Estela, 2007), la presencia de las colonias de superficie rugosa son características de las especies del género *Candida parapsitosis* (Linares *et al.,* 2001), en el cultivo del fermento de té que se efectuó, no se observo otra superficie que la lisa y brillante por lo que se asume que solo existen levaduras que forman este tipo de superficie.

g). Consistencia de la colonia

La consistencia de las colonias que se han desarrollado a partir del fermento de té, presentaron una características mantecosa, esta consistencia de las colonias son características casi de todas las levaduras, debe mencionarse que a medida que envejecen las células de las levaduras, las colonias se vuelven más pastosas (Linares *et al.*, 2001).
Una consistencia mucoide sugiere la formación de capsulas y puede ser el paso inicial para la identificación de *Cryptococcus neoforman* (Fleming III, 1977).

4.2.1.2. Evaluación microscópica de las levaduras del fermento de té

Para la observación de la morfologia de las celulas de levaduras, se utilizó el microscopio motic y una camara digital los resultados se tienen en la tabla 11.

Tabla 11. Evaluación microscópica de las levaduras del fermento de té

Características microscópica	
Forma de la célula	**Reproducción asexual**
Apiculatas	Gemación bipolar
Ovaladas	Gemación polar
Elipsoidales	Gemación multilateral

a). Forma de la célula

Las células de las distintas levaduras pueden ser esféricas, ovoides, alargadas, elípticas, apiculatas en forma de botella, triangulares, etc. A veces es característica de un género, por ejemplo, las células en forma de botella pertenecen al genero *Malasseziao* la forma triangular al género *Trigonopsis* (Leveau y Bouix, 2000).

La forma de la célula ovalada, elipsoidal y cilindrico es característico de las *Saccharomyces y Schizosaccharomyces* y la forma elipsoidal y ojival es característico de los géneros *Brettanomyces* y *Dekkera*, al igual la forma apiculatas (como limón) pertenece a *Hanseniaspora y Kloeckera* esto según kocková-kratochvilová (1982).

Quintana (1993), aisló e identificó las levaduras con las siguientes formas: esféricas que es característico del genero *Torula, Saccharomyces y Candida, la* forma de salchicha que la caracteriza a *Endomycopsis y* ovaladas a *Candida, Pichia, Saccharomyces.*

En el cultivo realizado se observó las siguientes formas de células: Apiculatas, ovaladas y elipsoidales como se muestra en el anexo fotografía 02, entonces se puede decir que existen levaduras de géneros que cumplen con esta forma de célula. Pero también que cumplan las características anteriores ya descritas.

b). Reproducción asexual

La reproducción vegetativa puede hacerse por gemación y fisión binaria; la gemación puede ser polar (únicamente en el extremo de la célula), bipolar (en los dos extremos) o multilateral (cuando las yemas se localizan en todo el perímetro de la célula madre) (Leveau y Bouix 2000) y la fisión binaria es la partición de una célula a dos nuevas células esta forma de reproducción es únicamente de la levadura *Schizosaccharomyces pombe* (Pitt & Hocking, 1997). La formación de la yema comienza con una evaginación de la célula, después la yema aumenta de tamaño antes de separarse de la célula madre.

El tipo de reproducción de levaduras según Kocková-Kratochvilová (1982), indica que la gemación multilateral es para los géneros: *Saccharomyces*, *Brettanomyces, Dekkera, Trigonopsis, Criptococcus*, mientras que la gemación bipolar pertenece a los géneros: como *Hanseniaspora y Kloeckera*; en el cultivo efectuado de la investigación se puede asumir que solo existen las levaduras indicadas con el tipo de reproducción multilateral.

Por la evaluación morfológica (macroscópica y microscópica) de las levaduras se puede decir que se identificó en el fermento de té tres levaduras diferentes de los géneros: *Hanseniaspora, Rhodotorula* y *Saccharomyces*, sin embargo Hesseltine (1965), identificó en el fermento de té dos géneros de levaduras: *Zygosaccharomyces y Cándida,* mientras que Humberto (2003), determinó que hay *Saccharomyces cerevisiae* y *Brettanomyces* en el fermento de té. Por otro lado en un hongo (fermento de té) japonés Kozaki *et al.* (1972), dice que existen las siguiente levaduras: *Saccharomyces s.p, Torulopsis famata, Pichia menbranaefaciens, y Cándida guillermondii.* Esto indica que las levaduras son variables que dependen del medio geográfico de donde provienen.

4.2.2. Características macroscópicas y microscópicas de las bacterias acéticas

Para la identificación de bacterias acéticas presentes en el fermento de té se trabajo con el agar manitol, que es el medio estándar para el aislamiento de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*.

Tabla 12. Características macroscópica y microscópica de las bacterias acéticas

Características	Calificación
Tamaño	0.5mm
Color	Crema
Forma de la colonia	Circular
Elevación	Convexa
Margen	Entero
Superficie	Lisa
Consistencia	Mantecosa
Forma de la célula	Cilíndricas (bacilos)
Reacción a la coloración Gram	G^- (negativas)

4.2.2.1. Evaluación macroscópica de las bacterias acéticas del fermento de té

a). Tamaño

Según la tabla 12, el tamaño promedio en el cultivo fue de 0.5mm esto se midió con la cuenta colonias de cada uno de las colonias y se saco el promedio, este tamaño esta entre los rangos de lo que señala Quillama (2007), que es menor a 3mm, este diámetro de colonia es para el género de bacteria acética *Acetobacter,* entonces se puede asumir que existe esta bacteria acética en el fermento de té.

b). Color de la colonia

El color predominante en el cultivo fue crema, este color caracteriza al genero *Acetobacter* y sus especies a excepción del *Acetobacter hansenii* que presenta la colonia de un color

rosado según Quillama (2007), entonces se puede decir que en el cultivo realizado que solo existen las bacterias *Acetobacter* y sus especies indicadas de color crema.

c). Forma de la colonia

En cuanto al la forma de la colonia se hace una comparación con la figura 30 en anexo de cual hace que sea circular, también Quillama (2007), menciona para el género acetobacter es circular o regular y en el estudio de la presente investigación la forma de la colonia formada en el agar manitol son también regulares, entonces se puede decir estas colonias pertenecen al género acetobacter.

d). Superficie de la colonia

La superficie de la colonia del género *Acetobacter aceti Acetobacter pasteurianos* son lisas esto define Quillama (2007), por lo tanto se puede decir que estas colonias al igual que la forma de la colonia también la superficie es característica del genero *Acetobacter*.

4.2.2.2. Evaluación microscópica de las bacterias acéticas del fermento de té

a). Forma de la célula

Owen (1989), define la forma de la célula de la bacteria *Acetobacter* que tiene la forma y disposición: Elipsoidales y bastoncitos rectos y moderadamente curvados, individuales, en pareja o cadenas, pero Quillama (2007), indica que *Acetobacter liquefancis* y *Acetobacter aceti* tiene la morfología celular de bacilos en pareja o cadenas, al igual que en la fotografía 03.

b). Reacción a la coloración Gram

Las Gram (+) se colorean de color violeta , las Gram (-) se colorean de color rasado o rojo y las Gram variables son de color rojo y violeta simultáneamente, ello puede ser debido a una mala técnica de tinción o que sean por naturaleza Gram variables (Agurdo, 2004), la

reacción a la coloración de la célula de la bacteria *Acetobacter* es Gram negativos (Owen, 1989 y Quillama, 2007), en el estudio realizado las células se colorearon de rosado (Gram negativas) las bacterias *Acetobacter aceti, Acetobacter liquefancis y Acetobacter hansenii*, en la investigación resultaron Gram (-) de color rojo como se puede observar en la fotografía 03.

Dado la evaluación macroscópica y microscópica de las bacterias acéticas se puede asumir que se identificó en el fermento de té de la localidad de Abancay al género *Acetobacter* a excepción de la especie *hansenii*. Esto coincidiendo con Hesseltine (1965) y el instituto bacteriológico de Moscú en 1950, que identificaron en el fermento de té la bacteria acética del género *Acetobacter (xylinum, xylinoides, guconicum),* pero otro lado Humberto (2003), aisló la bacteria *gluconoacetobacter* en el fermento de té.

4.3. Evaluación cinética en la fermentación de la Kombucha

En esta etapa de investigación, se estudió la cinética en la fermentación, porque el medio de fermentación ha sido sometida a distintos tratamientos, para ello se evaluó la formación de ácido acético, el comportamiento de pH, absorbancia y °Brix en los diferentes ocho tratamientos que tiene la investigación.

4.3.1. Acidez

Para el estudio de cinética de la acidez en la producción de Kombucha se determinó la acidez titulable, llevando a cabo una valoración acido-base, los resultados que se obtienen están expresados en función al acido orgánico predominante en la Kombucha que es el acido acético, los valores exactos de la acidez de los ocho tratamientos se encuentran en anexo tabla 45. A continuación se muestra, en las figuras 18 y 19, la cinética de la acidez en la producción de Kombucha a 36 horas de fermentación y a 72 horas de fermentación.

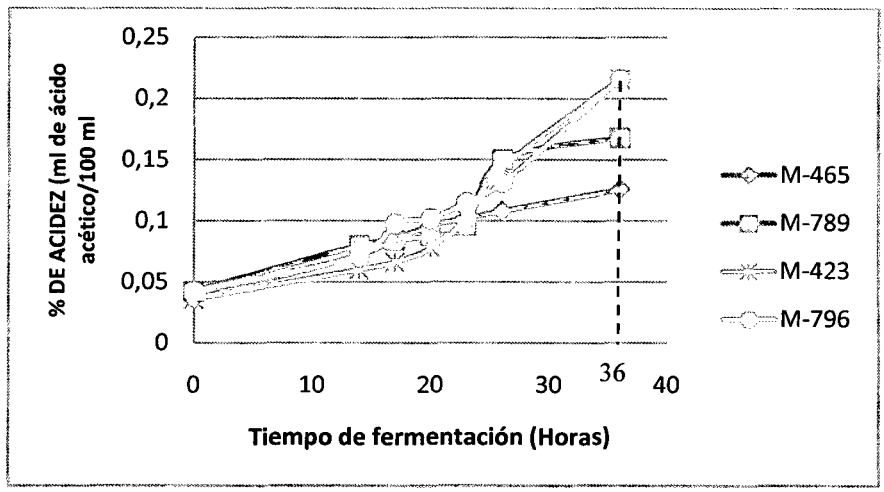


Fig. 18. Producción de ácido acético en función al tiempo (36 horas) de producción de Kombucha

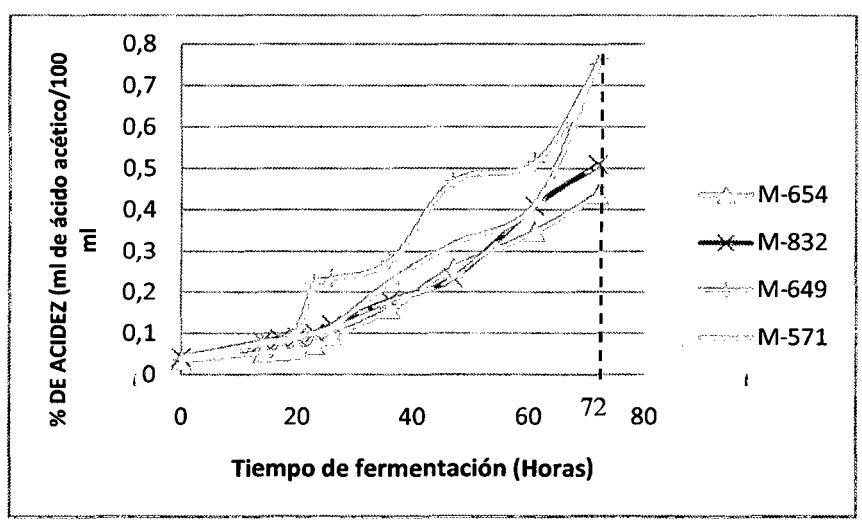


Fig. 19. Producción de ácido acético en función al tiempo (72 horas) de producción de Kombucha

Se puede observar en las figuras anteriores que la producción de ácido acético en los ocho tratamientos en estudio va en aumento en relación al tiempo de fermentación. La mayor acidez que reportó las muestras con 36 horas de fermentación es la muestra M-796 con 2.16 g/l, mientras que de las muestras con 72 horas de fermentación la mayor acidez fue de la muestra M-571 con 7.6 g/l.

Respecto a estos resultados se encontró que (Blanc, 1996 y Reiss, 1994), hallaron las concentraciones después de 15 días de fermentación un rango de 4.5 – 5.6 g/l, también hay

reportes que indican que luego de 5 días se obtiene ácido acético en una concentración de 5 g/l, mientras que en una fermentación de 10 días la concentración de acido acético se reduce hasta 2.1 g/l. Estos datos son en procesos de elaboración artesanal y a temperatura ambiente, pero en la presente investigación se obtuvo una Kombucha con una acidez máxima de 7.6 g/l. a 72 horas (3 días) de fermentación, esta elevación rápida se explica por varios factores; siendo el tiempo y la temperatura de fermentación lo que permite que la velocidad de fermentación sea rápida, llegando a producir acido acético en su mayor parte y otros ácidos orgánicos en trazas, como son el acido glucónico, el cítrico, el tartárico entre otros. Los resultados coinciden con los obtenidos por los autores antes mencionados.

4.3.2. pH

Las medidas de pH realizadas durante el tiempo de fermentación representa el grado de acidez-basicidad en la Kombucha fermentada, los valores numéricos del pH se encuentran en la tabla 45. A continuación se muestran en las figuras 20 y 21 la cinética del pH durante la producción de Kombucha.

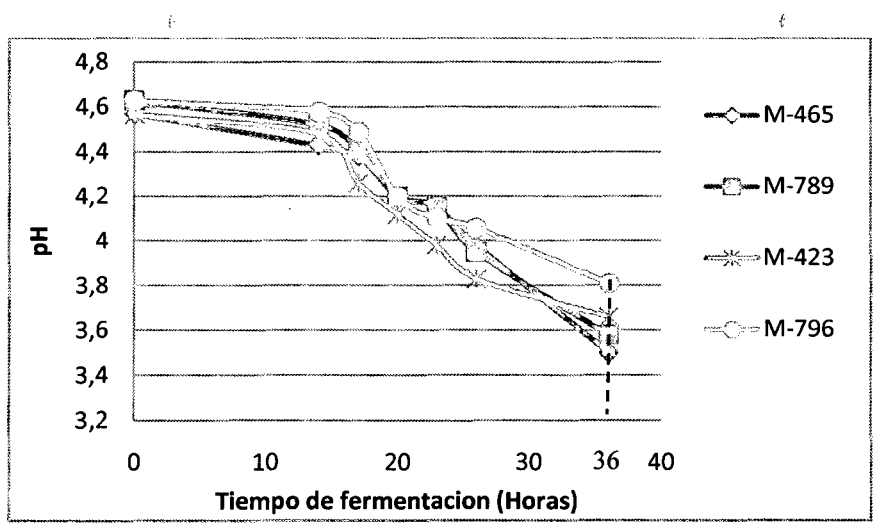


Fig. 20. Comportamiento del pH en función al tiempo (36 horas) de fermentación

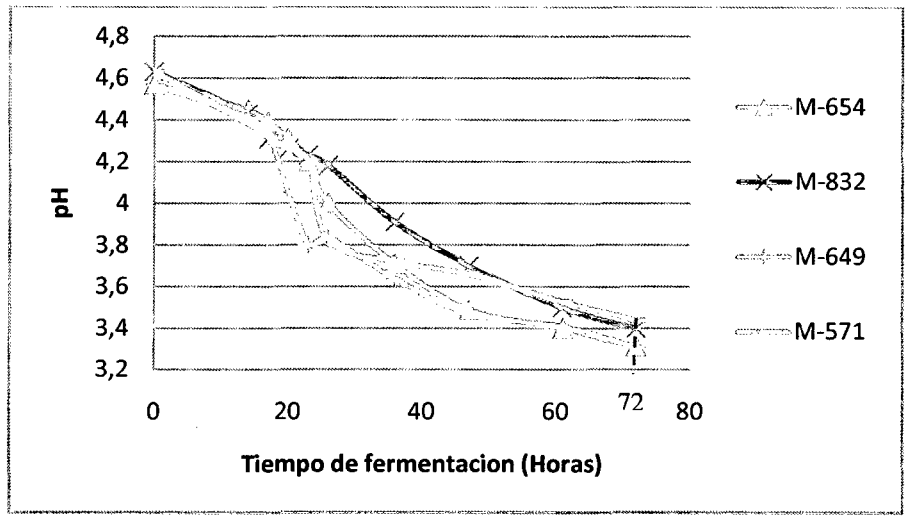


Fig. 21. Comportamiento del pH en función al tiempo (72 horas) de fermentación

El pH más bajo que reportó de las cuatro muestras con 36 horas de fermentación es la muestra M-465 con 3.50, ver figura 20, mientras que de las muestras con 72 horas de fermentación el pH mas bajo fue de la muestra M-654 con 3.31. El comportamiento del pH en las ocho muestras en estudio como se aprecia en la figuras anteriores, desciende en relación al tiempo de fermentación de la Kombucha, en esta fermentación se producen ácidos que disminuyen progresivamente el pH es entonces que en las primeras 36 horas de fermentación hay un descenso rápido de pH esto es por que a las primeras horas de fermentación las bacterias acéticas producen ácidos orgánicos y luego se desdobla a CO_2 y agua. Entonces hay una cantidad de iones de hidrógeno, esto hace que la Kombucha sea de pH ácido.

Pereyra *et al.* (2006), menciona que la disminución del pH tiene una relación inversa con producción de la acidez, estos autores en el estudio de un hongo ficticio encontraron que el pH a un día de fermentación obtiene un valor de 6.34 de pH, a 3 días de fermentación es 5.70 y a 20 días de fermentación un valor de 1.32. Siendo el tiempo de reacción el principal parámetro que define la cantidad total de ácidos producidos para cada valor de pH (Pérez, 2002).

4.3.3. °Brix

Este parámetro mide el cociente total de sacarosa disuelta en la Kombucha que al inicio de la fermentación se le añadió 100 g/l de azúcar y esto va disminuyendo durante la fermentación de la bebida Kombucha como muestra las figuras 22 y 23.

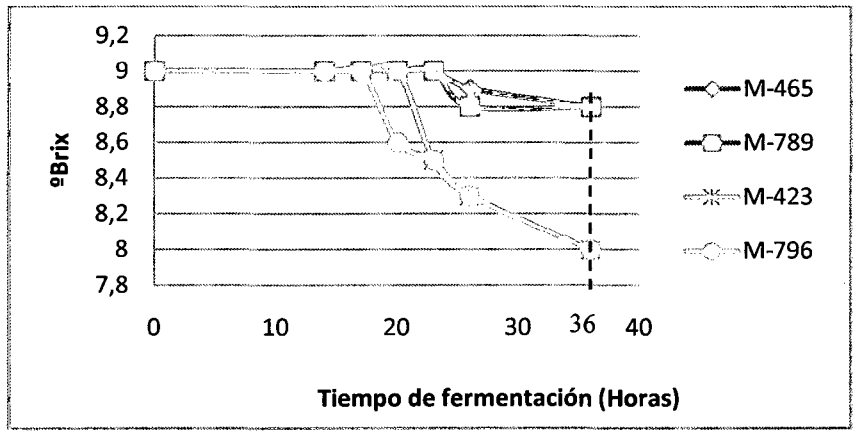


Fig. 22. Comportamiento de los grados °Brix en función al tiempo de fermentación (36 horas) de los tratamientos

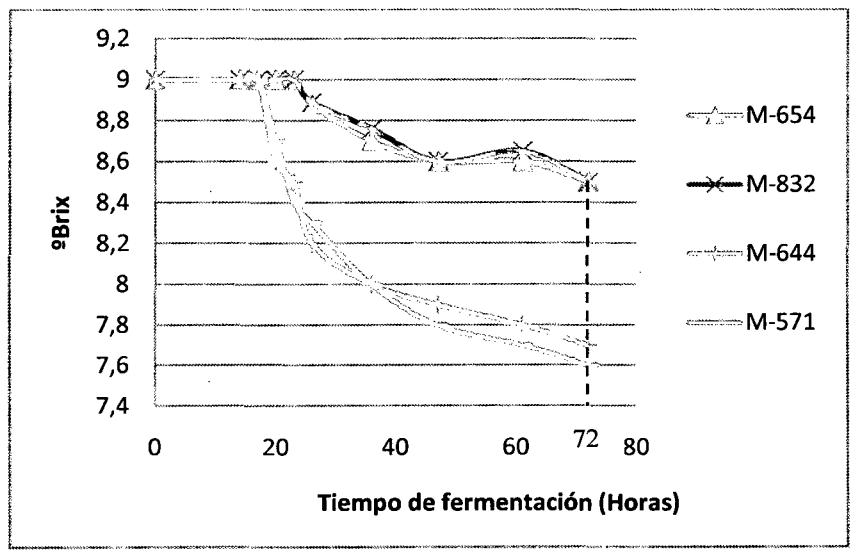


Fig. 23. Comportamiento de los grados °Brix en función al tiempo de fermentación (72 horas) de los tratamientos

Los ocho tratamientos en el tiempo cero tienen 9 °Bx esto permanece constante hasta un tiempo aproximado de 15 horas, de ahí en adelante como las muestras son sometidas a distintos tratamientos que tienden a variar como se muestra en la figura 22. A 36 horas de fermentación los °Bx disminuyó hasta los 8 °Bx, en las muestras M-423 y M-796, mientras

que en las muestras con 72 horas de fermentación disminuyó hasta los 7.6 °Bx la muestra M-571, este es el más bajo de todos los tratamientos y es debido a que a este tratamiento se le sometió a un temperatura de 28 °C y eso hace que haya mayor metabolismo por los microorganismos y se consuma parte del azúcar.

4.3.4. Absorbancia

Esta nos indica el grado de intensidad de color del producto instrumentalmente y como este valor ha ido evolucionando en el proceso de obtención de la Kombucha, para el análisis de la absorbancia se trabajó a una longitud de onda de 445 nm longitud de onda máxima para la teína y cafeína,

a). Cinética de la absorbancia durante la fermentación de Kombucha

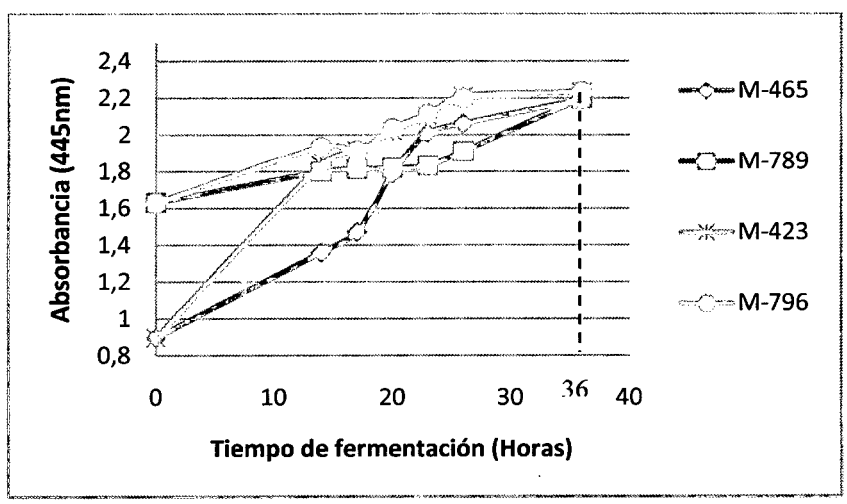


Fig. 24. Comportamiento del color en función al tiempo (36 horas) de fermentación de los tratamientos

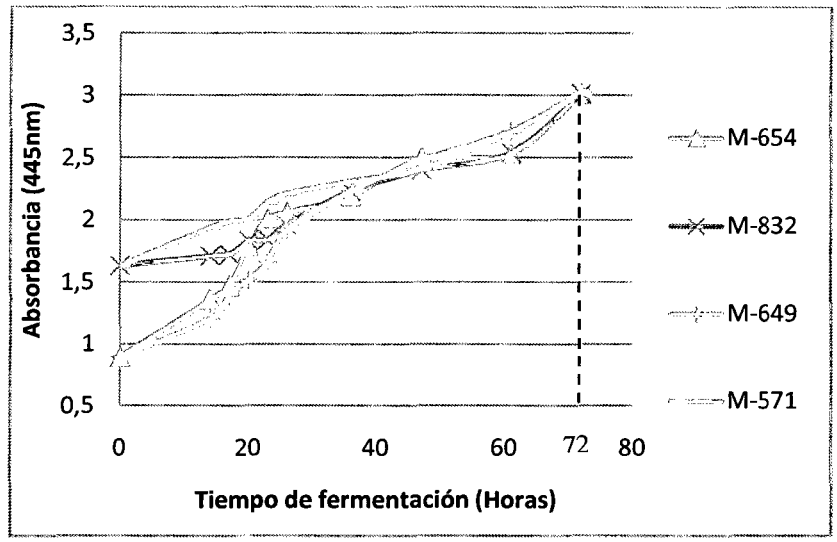


Fig. 25. Comportamiento del color en función al tiempo (72 horas) de fermentación de los tratamientos

El comportamiento de la absorbancia en las ocho muestras en estudio va en aumento en relación al tiempo de fermentación de la Kombucha como se muestra en las figuras anteriores. Los tratamientos que contienen 4 g/l de té negro tienen una absorbancia inicial de 0.898 y al final de la fermentación esta absorbancia aumentó a 3,023 la muestra M-649 con 72 horas de fermentación; mientras que los tratamientos con 8 g/l de té negro tienen una absorbancia inicial de 1.632 y al final de la fermentación ascendió a una absorbancia de 3.031 la muestra M-571 y de igual manera es el único tratamiento esto también a 72 horas de fermentación. Este aumento de la absorbancia durante la fermentación de la Kombucha es debido a que se forman diversos tipos de partículas como la biomasa, la celulosa del fermento de té que hace variar la viscosidad del producto, esto por el hongo adicionado, son estas los que absorben la mayor cantidad de luz y por ende aumenta la absorbancia durante la fermentación.

b). Cinética de la absorbancia durante la fermentación, reposo y filtración hasta obtener el producto Kombucha

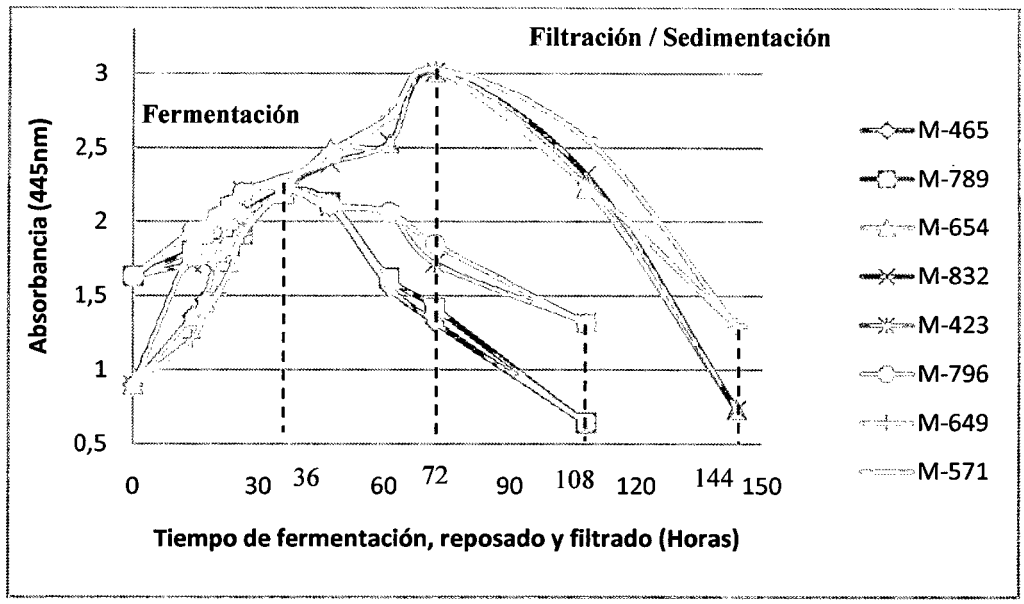


Fig. 26. Comportamiento de la Absorbancia en función al tiempo de fermentación, reposo y filtración de las muestras de Kombucha

Durante la fermentación de la Kombucha aumenta la absorbancia como se indicó anteriormente, pero cuando termina la fermentación comienza a descender la absorbancia por que el producto es sometido a un proceso de filtración y sedimentación en estas etapas se eliminan toda clase de partículas, biomasa y así aclarándose la bebida Kombucha que al medir la absorbancia deja pasar mayor cantidad de luz y por ende disminuye la absorbancia. Estos valores hacen notar el cambio en la intensidad del color del producto.

4.4. Características sensoriales de la Kombucha

Se realizó en dos etapas, la primera se utilizó una cartilla de evaluación del grado de satisfacción y la segunda es una cartilla de análisis descriptivo cuantitativo de diferenciación de sabores.

4.4.1. Evaluación del grado de satisfacción

Se utilizo una escala hedónica de 7 puntos para su respectiva calificación del color, olor, sabor y apariencia general (ver tabla 09). De los datos obtenidos se tiene que en cuanto a:

4.4.1.1. "Color": por tipo de muestra

Al analizar muestra por muestra de manera independiente se observa en la tabla 15, las agrupaciones de tratamientos muestran dos grupos parejos, la muestra M-649 y la muestra M-832 en un grupo y en el segundo los demás.

Al hacer una comparación pareada se observa según la tabla que las muestras M-649 y la muestra M-832 poseen características distintas respecto a las otras seis muestras.

Aplicando un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Se ha colocado un asterisco junto a 1 par (M-649 – M-832) tabla16, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza.

Los tratamientos M-649 y M-832, corresponden ambos a 72 horas de fermentación, a 4 y 8 g/l de té y a 28 y 18 °C de temperatura, efectuando un análisis de estos factores, podemos indicar que es el factor de temperatura y concentración de té son los parámetros importantes para causar diferencias significativas en cuanto al color.

Debe mencionarse que en cuanto a la intensidad de color brindada por las diferentes concentraciones de té, esta no influye tanto en el color final del producto ya que como se reporto en el item 4.3.4 las absorbancias iníciales varían de 0.8 a 1,6, pero en el producto al final de la fermentación los valores son 3.01 y 3.03, lo que indican que la intensidad de color es muy parecida, coincidiendo con la medida instrumental efectuada.

De los resultados obtenidos podemos concluir en cuanto al color que la muestra M-832 es la que mejor satisface a los jueces obteniendo un valor medio según la tabla 13 es 5.272 ± 0.935 y la que menos satisfacción en el color fue el tratamiento M-649 un valor medio 4.409 ± 1.501.

4.4.1.2. "Olor": por tipo de muestra

En este se han identificado 3 grupos (tabla 19) según la alineación de las X's en columnas, las muestras M-465 y M-832 son distintas al grupo conformado por M-649, M-789 y M-423 las que también difieren a los tratamientos M-654, M-796 y M-571.

El asterisco que se encuentra al lado de los 4 pares tabla 20 (M-423 – M-465, M-465 – M-832, M-465 – M-789 y M-649 – M-832) indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza.

Por lo que analizando los resultados el factor en común que más influenciado en el olor del producto para los 22 jueces es el parámetro de la concentración, seguida por la temperatura y tiempo de fermentación.

Concluyendo el análisis de olor el tratamiento M-832 es la que más satisface a los jueces obteniendo una puntuación media de 5.136 ± 0.99. Y la que menos gusto en el olor fue el tratamiento M-465 una puntuación media de 4.045±0.998

4.4.1.3. "Sabor" por tipo de muestra

En las pruebas de Múltiple Rangos para sabor por tipo de muestra se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. Según la tabla 23 las muestras 571, 465, 649, 796, 654, 789 son distintas de la 832, para determinar su diferencia significativa entre ellos se realiza la comparación pareada.

En cuanto a los pares que se observan existen diferencias significativas se realizo una análisis para determinar que parámetro es el que mas influye en estas diferencias, del respectivo análisis podemos mencionar que el parámetro de tiempo y concentración de té son las que más influyen en la percepción distinta del sabor seguida del parámetro de temperatura.

Concluyendo el análisis se encontró que el tratamiento M-832, es el que posee mejor calificativo por parte de los jueces en cuanto a sabor con un valor medio de 5.863±0.833 y la que poseo el menor calificativo fueron los tratamientos M-465 y M-571 con un promedio de 3.227.

4.4.1.4. "Apariencia general": por tipo de muestra

En esta prueba múltiple (tabla 27), se han identificado 3 grupos según la alineación de las X's en columnas, las muestras M-465, 649 y 832 son distintas al grupo conformado por M-796, M-654, M-789 las que también difieren a los tratamientos M-423 y M-571.

En cuanto a los pares que se observan existen diferencias significativas se realizo una análisis para determinar que parámetro es el que más influye en estas diferencias, del respectivo análisis podemos mencionar que el parámetro de concentración de té es el que mas influye en la apariencia general seguida de los parámetros de tiempo y temperatura de fermentación.

Debe indicarse que el tratamiento M-832, es el que posee mejor calificativo por parte de los jueces en cuanto a apariencia general con un valor promedio de 5.454±1.011, y el que posee el menor calificación fue el tratamiento M-465 con un valor promedio de 4.136±1.698 que corresponde a una temperatura de 18°C de fermentación, 4 g/l de té y 36 horas de fermentación.

4.4.2. Análisis descriptivo cuantitativo

Se utilizo una escala de 5 puntos para su respectiva calificación de los diferentes sabores: dulce, ácido, fermentado y acético (ver figura 17). De los datos obtenidos se tiene que en cuanto a:

4.4.2.1. Sabor: "Dulce" por tipo de muestra

En esta prueba se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. Las muestras M-571, M-465, M-423, M-789 y M-832 son distintas al grupo conformado por M-796, M-654 y M-649.

Para los 21 pares podemos mencionar que el parámetro de concentración de té es el que ha incidido en la diferenciación de las muestras en cuanto al sabor dulce, seguido por la temperatura de fermentación y tiempo de fermentación.

De los ocho tratamientos los jueces calificaron al tratamiento M-832 con el sabor más dulce, obteniendo una puntuación con un promedio de 3.745 ± 0.554 y con el sabor menos dulce resultó ser el tratamiento M-571 con un promedio de 1.65 ± 0.934.

4.4.2.2. Sabor: "Ácido" por tipo de muestra

Al analizar las interacciones entre muestras o hacer una comparación pareada se observa según el cuadro todas las muestras poseen características distintas así formando un solo grupo.

Para los 20 pares podemos mencionar que el parámetro tiempo de fermentación y concentración de té son los que más han incidido en la diferencia de las muestras en cuanto al sabor ácido seguida por la temperatura de fermentación. Los jueces calificaron al tratamiento M-649 con el sabor más ácido, obteniendo una puntuación con un promedio

de 2.940 ± 0.451, y con el sabor menos ácido fueron los tratamientos M-832 y M-423 con un promedio de 0.686 ± 0.628.

4.4.2.3. Sabor: "Fermentado" por tipo de muestra

Según la alineación de las X's se han identificado 2 grupos homogéneos, las muestras M-832, M-423, M-465 y M-571 son distintas al grupo conformado por M-789, M-654, M-796 y M-649.

Analizando las diferencias (tabla 40) que existen entre tratamientos los resultados son que los factor en común que más influenciado en el sabor fermentado del producto para los 22 jueces son los parámetros de la concentración de té, temperatura de fermentación, y tiempo de fermentación equitativamente.

El tratamiento M-571 es el muestra con sabor más fermentada para los jueces obteniendo una puntuación media de 2.822 ± 0.764 y la muestra con sabor menos fermentado fue el tratamiento M-832 con una puntuación media de 0.913± 0.557.

4.4.2.4. Sabor: "Acético" por tipo de muestra

Según la alineación de las X's en columnas se han identificado 2 grupos homogéneos, las muestras: M-832, M-789, M-654, M-649 y M-571 son distintas al grupo conformado por M-423, M-796 y M-465.

Para los 22 pares (tabla 44) podemos mencionar que el parámetro de tiempo de fermentación es el que ha incidido en la diferenciación de las muestras en cuanto al sabor acético, seguido por la concentración de té y temperatura de fermentación.

De los ocho tratamientos los jueces calificaron al tratamiento M-571 con el sabor más acido, obteniendo una puntuación con un promedio de 2.613 ± 0.584 y con el sabor menos acético resultó ser el tratamiento M-832 con un promedio de 0.331 ± 0.598.

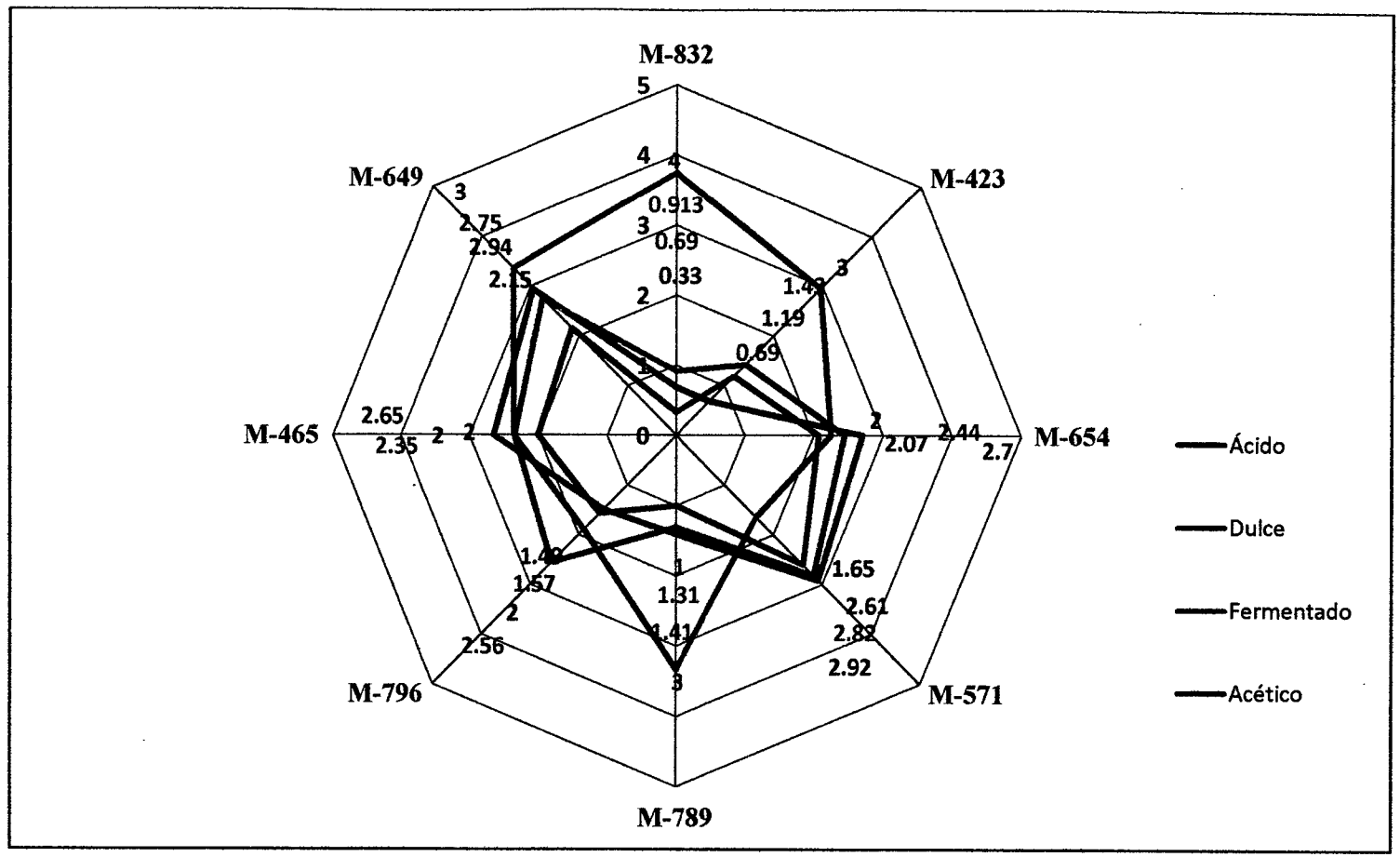


Fig. 27. Perfil descriptivo del sabor en las muestras de Kombucha

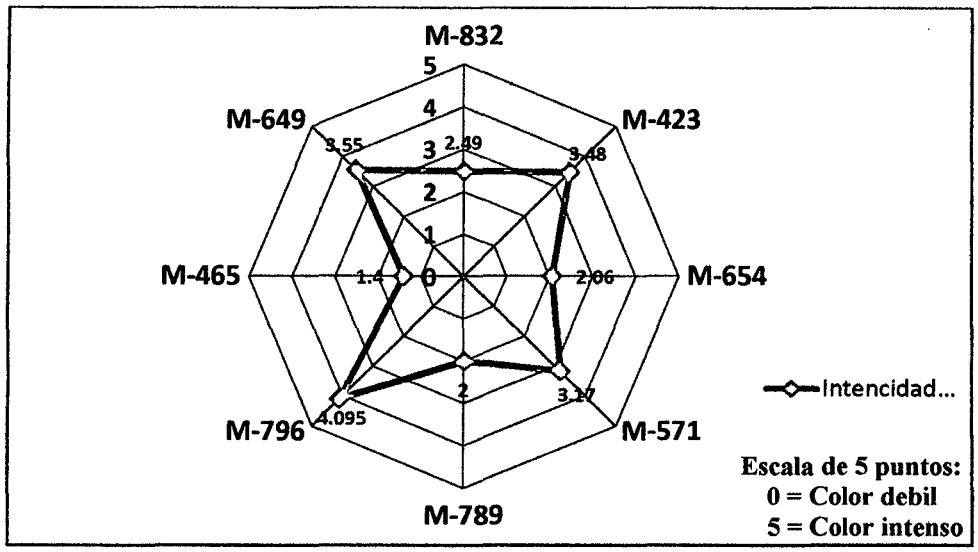


Fig. 28. Perfil de las intensidades de colores de las muestras de Kombucha

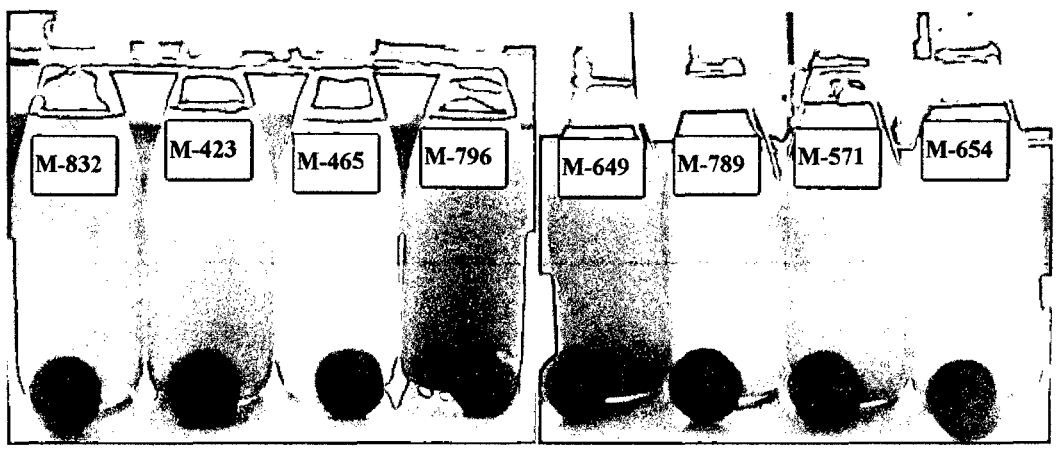


Fig. 29. Perfil de las intensidades de colores de las muestras de Kombucha

Para la intensidad del color se utilizo un test de control para diferenciar los colores de los ocho tratamientos, el que presento mas intensidad fue el tratamiento M-796 con un promedio de 4.095, y la que tuvo un color menos intenso fue el tratamiento M-465 con un promedio de 1.4.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- En el fermento del té, se identificaron tres levaduras el género H*anseniaspora* con las siguiente características con tamaño: grande, color: blanco, forma: circular, elevación: convexa, margen: entero, superficie: lisa y brillante, consistencia: mantecosa, forma de la célula : apiculatas y reproducción asexual: gemación bipolar ;el género *Rhodotorula* con tamaño: mediana, color: rojo, forma: circular, elevación: cúpula, margen: entero, superficie: lisa y brillante, consistencia: mantecosa, forma de la célula : ovaladas y reproducción asexual: gemación polar; y el género *Saccharomyces* con tamaño: pequeño, color: blanco, forma: circular, elevación: convexa, margen: entero, superficie: lisa y brillante, consistencia: mantecosa, forma de la célula: elipsoidales, reproducción asexual: gemación multilateral; y una bacteria acética del género *Acetobacter* con tamaño: 0.5mm, color: crema, forma: circular, elevación: convexa, margen: entero, superficie: lisa, consistencia: mantecosa, forma de la célula: cilíndricas y reacción a la coloración Gram: G^-.

- Al evaluar las condiciones de fermentación sobre las *características fisicoquímicas* de la Kombucha; se observa al valor de 7.6 g/l de acidez, el pH llega a un nivel de 3.31 después de 72 horas y 28°C: mientras que los °Brix llega a 7.6 °Bx. Y la intensidad del color de las muestras con 4 g/l de té, tiene 0.898 de abs. mientras que las muestras con 8 g/l de té es de 1.632 y al finalizar la fermentación los resultados varían moderadamente de acuerdo al tiempo donde la concentración del té no influye en la misma.

- La influencia de los parámetros de fermentación sobre las *características sensoriales de la Kombucha* se tiene que en cuanto al color, olor, sabor y apariencia general la muestra M-832 (8 g/l de té negro, a un tiempo de 36 horas y a una temperatura de 18 °C de fermentación) es la que mejor satisface a los 22 jueces. Y en la calificación de los sabores resultaron con el más dulce la M-832, con el sabor más ácido la M-649 (4 g/l de té negro, 72 horas y 28°C de fermentación) y con el sabor más acético y fermentado la M-571 (8 g/l de té negro, 72 horas y 28°C de fermentación).

5.2. Recomendaciones

- Identificar las especies de las levaduras y de las bacterias acéticas que habitan en el fermento de té para tener conocimiento qué especies habitan en dicha colonia.
- Determinar cromatograficamente los ácidos orgánicos que están presentes en la Kombucha
- Hacer el escalamiento industrial de estos datos de laboratorio para obtener un producto industrial.
- Realizar campañas de sensibilización de las bondades nutracéuticas de este producto.

VI. BLIOGRAFÍA UTILIZADA

1) Abril D, *et al.* (2010), Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba, Facultad de Medicina, Avda. Menéndez Pidal s/n, 14004-Córdoba.

2) Agurdo (2004), Microbiología Básica "Coloración de las bacterias y la bioquímica en los medios de cultivo" U.R.P Lima-Perú.

3) Alderete (2010), Alimentos funcionales, Dirección de Promoción de la Calidad Dirección Nacional de Alimentos Ministerio de Economía y Producción - Buenos Aires, Republica Argentina.

4) Anzaldúa (1982), The texture of fibrous fruits and vegetables. Tesis doctoral. University of Reading, National College of Food Technology. Weybridge, surrey, Inglaterra.

5) Anzaldúa (1994), La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la practica, Facultad de ciencias químicas Universidad Autónoma de Chihuahua México Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza, España.

6) Amerine *et al.* (1965). Principles of sensory evaluation of foods. Academic press. New York.

7) A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemist. 11ª ed., página 520, 30.068.

8) Azrad (1997), Preguntas frecuentes de kombucha traducción hecha del ingles al español D.F. México.

9) Baeza (2007), Precisión en espectrofotometría, Química Analítica Instrumental I Facultad de Química. UNAM.

10) Blanc (1996), Characterization of Tea Fungus Metabolites. Biotechnology Letters 18 139 -142.

11) Boucher (1999), Los Productos Nutracéuticos Oportunidades para los Recursos Naturales Autóctonos El Papel de los Investigadores, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura Centro Regional Andino, Director Ejecutivo Programa de Desarrollo Para la Agroindustria Rural para América Latina y el Caribe.

12) Bowman *et al.* (1975), Evaluation of the Uni-Yeast-Tek Kit for the identification of medically important yeasts. J. Clin. Microbiol. 2:354-357.

13) Byun and Nahm (1978), Production of fructose from jerusalen artichoke by enzymatic hydrolysis. Journal of food science 1871-1873.

14) Cacabelos (2004), «No queremos que los nutracéuticos sean considerados fármacos», director del Centro de Investigación Biomédica EuroEspes.

15) Campos (2005), Microbiología General Guía de practicas Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Andahuaylas _Perú.

16) Crueger (1993), Biotecnología, Manual de Microbiología Industrial 3ª edición editorial Acribia, S.A. Zaragoza España.

17) Dufresne (2001), Review of latest research findings on the health promotion properties of tea. J. Nutr. Biochem. 12: 404-421.

18) Dufrersne and famworth (2000), Tea, Kombucha and health: A review. Food research international 409-421.

19) Dragoljub (2005), Preparación de Kombucha con extracto de hisopillo (L. satureja montana) en el laboratorio utilizando un biorreactor, University of Novi Sad facultad de tecnología APTEFF, 36,1-266. 36, 187-196.

20) Dragoljub *et al.* (2006), Producción de bebida Kombucha de hisopillo (L satureja montana) por inoculación de Te por pellicle. 37, 119-130.

21) Emma *et al.* (2005), Caracterización sensorial y química de la calidad de tés *(Thea sinensis)* consumidos en Chile.Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

Universidad de Chile, Santiago, Chile, Universidad Vicente Pérez Rosales. Santiago. Chile.

22) Estela (2007), Diseño de biorreactores para la producción de proteína de origen celular (SCP), VIII Congreso Nacional de estudiantes de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Nacional Micaela Bastidas De Apurímac - Perú.

23) Eva *et al.* (2007), Fermentación de Kombucha en extractos crudos de ajipa de diferentes cultivares University of Novi Sad facultad de tecnología 21000 Novi Sad, bulevar Cara Lazara1, vojvodina, Servia. 38, 37-44.

24) Fleming III (1977), New cultura médium for the presumtive identification of *Candida albicans and Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol, 236-243.

25) Fontana *et al.* (1991) nature of plant stimutor.

26) Guías de trabajos prácticos (1999), control de procesos biotecnológicos, producción de probióticos (Kombucha), Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas cátedra de química analítica I.

27) Gunther (1996), Bebida saludable y remedio natural del lejano oriente.

28) Greenwalt (2000), Steinkraus and R. A. Ledford: Kombucha, the Fermented Tea, Microbiology, Composition, and Claimed Health Effects. J. Food Protect. 976-981.

29) Hamilton (1981), Cálculos de Química analítica. Ed.Mc Graw Hill. Séptima edición, México.

30) Harper (1955), The cultura and marketing of tea. Oxford University Press. Londres, Inglaterra.

31) Hart y Fisher (1991), Análisis Moderno de los Alimentos. Editorial Acribia, España p. 118-120

32) Hemmat Maghsoudi (2009), Efecto de Kombucha en la formación postoperatoria de adhesión de intra-abdominal en ratas University of Medical al Sciences.

33) Hernández (1988), Proyecto inicial, caracterización del proceso de fermentación de té fungus. Universidad Autonoma Metropolitana Istapalapa.

34) Hernandez (2003), Manufacture of a beverage from cheese whey using a "tea fungus" Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional Carpio y Plan de Ayala, 11340 Mexico, D.F, Mexico.

35) Hesseltine (1965), A millenium of fungi, food and fermentation, Mycologia 57 149-197.

36) Instituto Bacteriológico de Moscu (1950).

37) Irion Hans (1944), Curso para escuelas especializadas en medicamentos. vol. 2 pág. 405 Braunschweig.

38) Jancovic y Stojanovic (1994), Microbial and chemical composition, growth, therapeutical and antimicrobial characteristics of tea fungus. Mikrobiologija 35-43.

39) José *et al.* (2005), Proyecto de inversión para la introducción de la bebida Kombucha en la ciudad de Guayaquil. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Barcelona-España.

40) Jayabalan (2008), Preservation of Kombucha tea-Effect of temperature on tea components and free radical scavenging properties. J. Agr. Food Chem. 56: 9064-9071.

41) Judge (2010), Lo que usted debe saber sobre los Nutracéuticos. Centro Nacional de Medicina Complementaria y Alternativa, Institutos Nacionales de la Salud (Manual "Merck", Segunda Edición).

42) Kurtsman, *et al.* (2001), Zygosaccharomyces Kombuchaensis, a new ascorporogenous yeast from "Kombucha tea". FEMS Yeast research. 133-138.

43) Larmond (1973), physical requirements for sensory testing. Food Technol, 27, 28.

44) Leveau y Bouix (2000), Microbiología Industrial, los microorganismos de interés industrial Editorial Acribia S.A. Zaragosa (España) 10.

45) Lin (1979), Residence time distribution of flow is a continuous sterilisation process. Processbiochem july 23-27.

46) Linares *et al.* (2001), Identificación de levaduras, Revista Iberoamericana de Micología, Asociación Española de Micología. España.

47) Lobsang *et al.* (2003), "Proyecto de producción de té negro como una nueva alternativa de exportación para el Ecuador", Escuela Superior Politécnica del Litoral Instituto de Ciencias Humanísticas y Económicas Economía y Gestión Empresarial, Guayaquil – Ecuador.

48) Lonar *et al.* (2001), Metabolika aktivnost ajne alijive u mleku Prehrambena industrija mleko I m leni proizvodi 13-17.

49) Lonkar *et al.* (2001), Metabolic activity of tea fungus on molasses as a source of carbon. Acta periodica techonologyca 21 - 26.

50) Malbasa (2007), Comparación de los productos de fermentación.

51) Malbasa *et al.* (2001), Sucrose and inulin balance during tea fungus fermentation. Romanian biotecnologycal letters 7,1 573-576.

52) Minden (1995), Composición de la kombucha. Revista Esmeralda.

53) Mitsuoka (1992), Flora intestinal y envejecimiento, análisis nutricionales Universidad Nipona de Ciencias Veterinarias y Animales Kyonancho Japon.50:438-446.

54) Moreno *et al.* (2000), Microbiología guía de laboratorio departamento de biología facultad de ciencia UNALM-Puno-Perú.

55) Oldshue (1966), Fermentation mixing scale- up techniques, biotechnol. Bioeng. 8.3-24.

56) Owen (1989), Biotecnología de la Fermentación: Principios, Procesos y Productos, Editorial Acribia S.A. Zaragosa-España.

57) Pitt & Hocking, (1997), Food and Food Spoilage. 2° ed. Blackie Academic & Professional, London.

58) Pereyra *et al.* (2006), Investigación sobre un hongo ficticio, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.

59) Pérez (2002), Efecto del pH en la fermentación anaerobia de aguas residuales durante un ciclo de operación de un SBR, Universidad Nacional de Ingeniería (UNI), Managua-Nicaragua.

60) Quillama (2007), Manual de Prácticas de Microbiología Industrial; Métodos para el aislamiento y selección de microorganismos de importancia económica, U.N.M.S.M Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento Académico de Microbiología y Parasitología Lima- Perú.

61) Quintana (1993), Aislamiento e Identificación de Levaduras durante el Procesamiento del "TOCOSH" UNCP - Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias Ciudad Universitaria - El Tambo – Huancayo - Perú.

62) Radomir *et al.* (2005), Fermentación de Kombucha en té negro: una contribución para un aumento progresivo University of Novi Sad facultad de tecnología.36221-229.

63) Rasu *et al.* (2010), Biochemical Characteristics of Tea Fungus Produced During Kombucha Fermentation, Division of Biotechnology, Department of Food Science and Technology, Institute of Agricultural Science and Technology, Chonbuk National, University, Jeonju, Jeonbuk 561-756, Korea.

64) Reiss (1994), Influence of Different Sugars on the Metabolism of the Tea Fungus. Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und Forschung 198 258-261.

65) Roussin (1996) Out on the Kombucha range. Post to kombucha dission list.

66) Ruiz *et al.* (2007), Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido. departamento de investigación en alimentos, facultad de ciencais químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Unidad Saltillo, Blvd. V. Carranza e Ing. José cardenas valdés, Saltillo, Coahuila C.P.25001, México.

67) Sievers (1995), Microbiology and Fermentation Balance in a Kombucha Beverage Obtained from a Tea Fungus Fermentation. Syst. Appl. Microbiol. 590 - 594.

68) Skoog (1994), Análisis instrumental, Ed.Mc Graw Hill . cuarta edición. México.

69) Soto (1961), Estandarización y características del proceso de producción de tea fungus. Trabajo de servicio social U.A.M-I, México, DF.

70) Sreeramulu (2000), Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. J. Agr. Food Chem. 48: 2589-2594.

71) Valenzuela (2004), El consumo te y la salud: características y propiedades benéficas de esta bebida milenaria. Laboratorio de lípidos y antioxidantes, Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos, Universidad de Chile. Santiago, Chile.

72) Ureña y D arrigo (1999), La evaluación sensorial de los alimentos *aplicación didáctica*, Facultad de industrias alimentarias, Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima Perú, Editorial agraria.

73) Urrea (2003), Estudio sobre el efecto inhibitorio de la infusión de te negro (*Camellia sinensis*), sobre el crecimiento de microorganismos cariogenios, (Estreptococcus mutans y Lactobacillus acidophillus), in vitro. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Odontología.

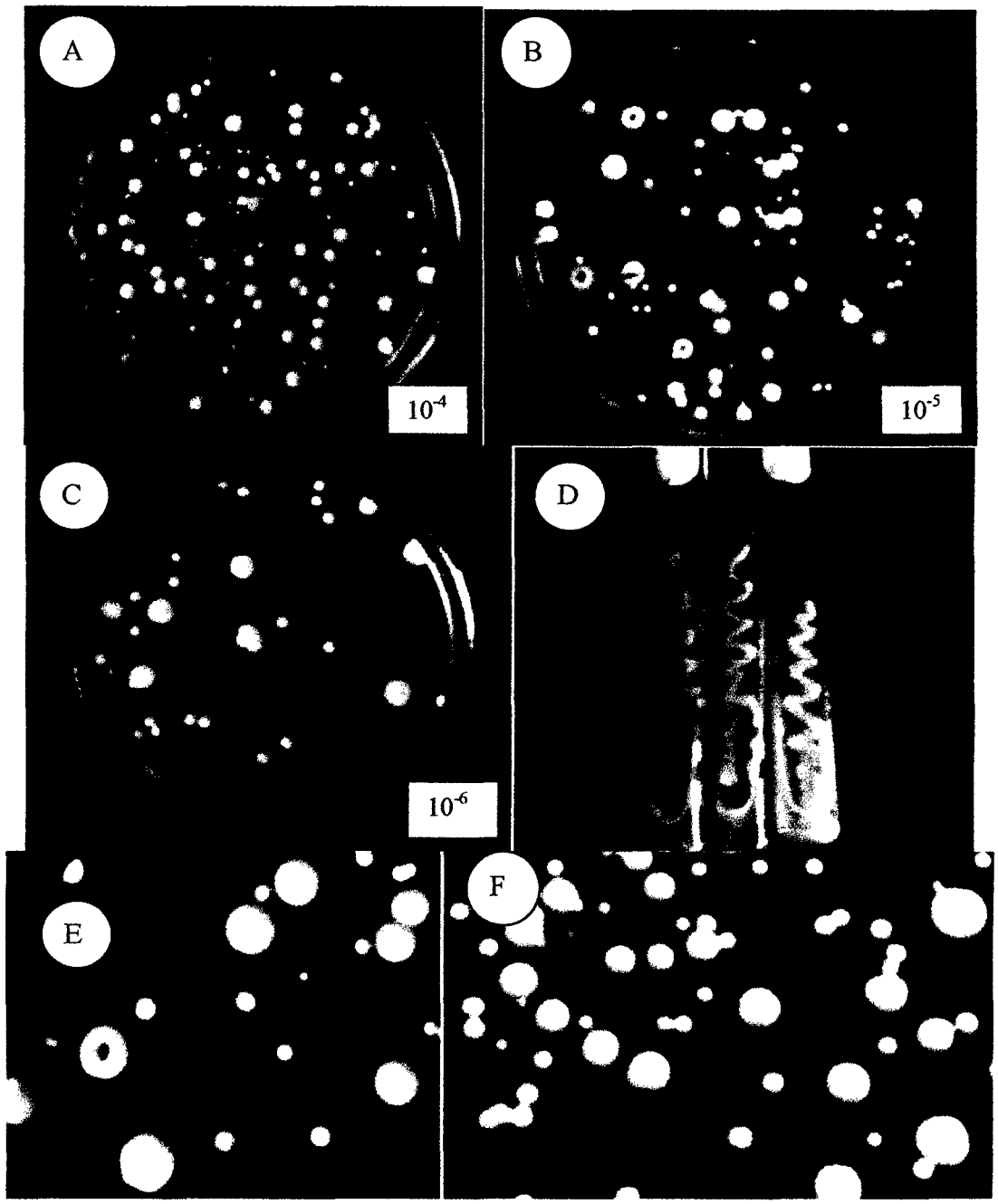
74) Ward (1999), Biotecnología de la fermentación, Editorial Acribia Zaragoza España.

75) Zeisel (1999), Regulation of "nutraceuticals". Science 285: 1853-1855.

Páginas web:

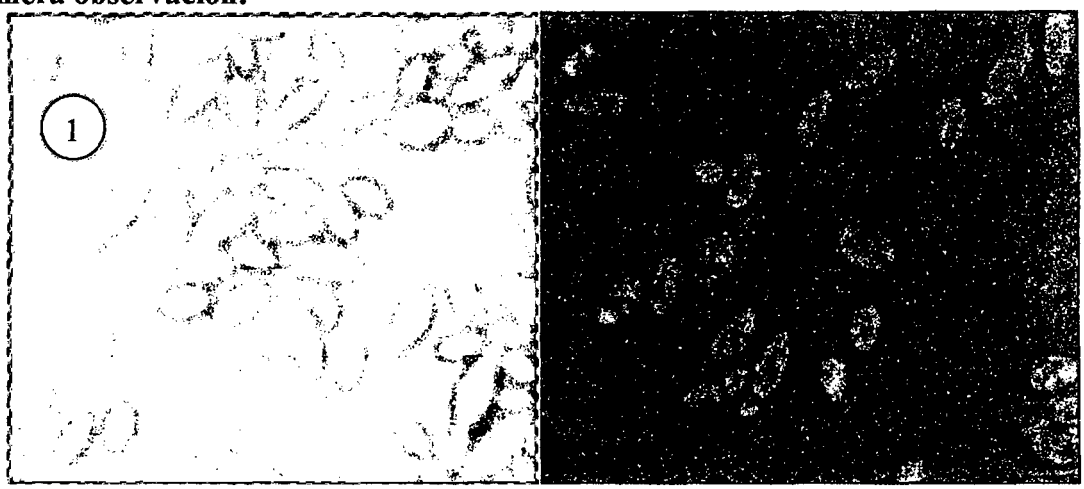
www.comunicadosdeprensadelaFAO99-55.htm

ANEXOS:

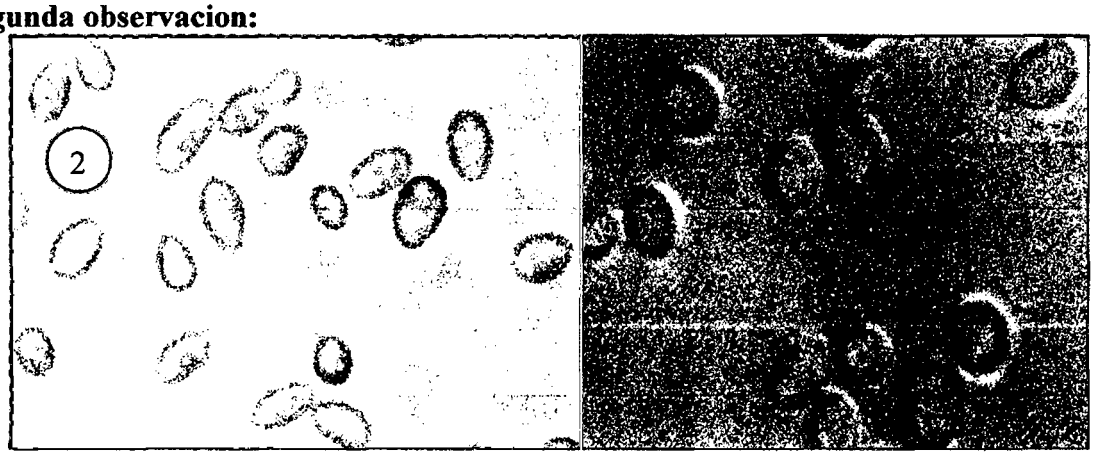


Fotografía 01. Características macroscópicas de las levaduras del fermento de té: (A). Aspecto macroscópico de las colonias de levaduras del fermento de té, de la dilución 10^{-4}, **(B).** Placa con levaduras del fermento de té, de la dilución 10^{-5} (ya muestreada), **(C).** Placa con levaduras del fermento de té, de la dilución 10^{-6}, **(D).** Tubos inclinados con pureza de la cultura de levaduras en agar, **(E).** Vista de las colonias de levaduras de color rojo y blanco con la ayuda de una lente con contraste y brillo **(F).** Vista de las colonias de levaduras de color blanco con la ayuda de una lente con contraste y brillo.

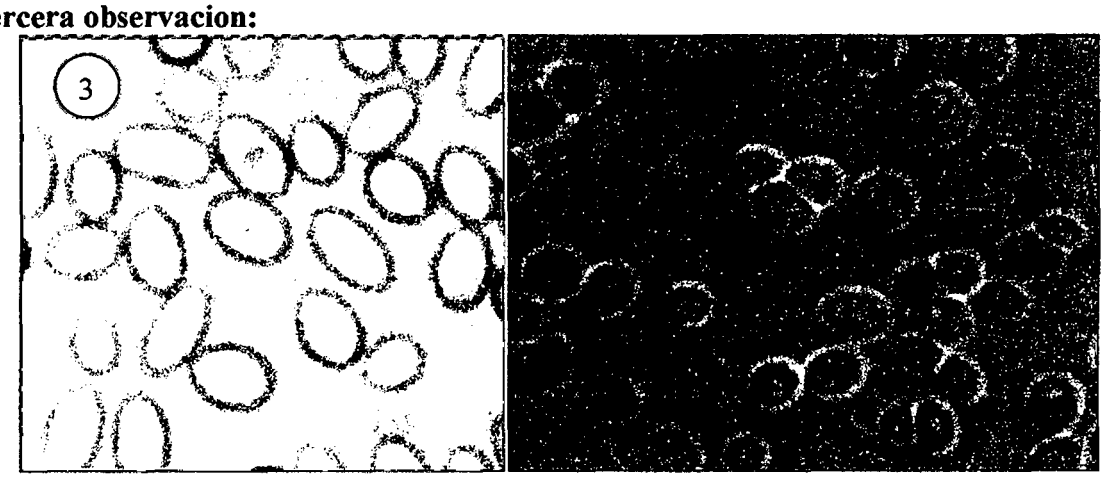
Primera observacion:



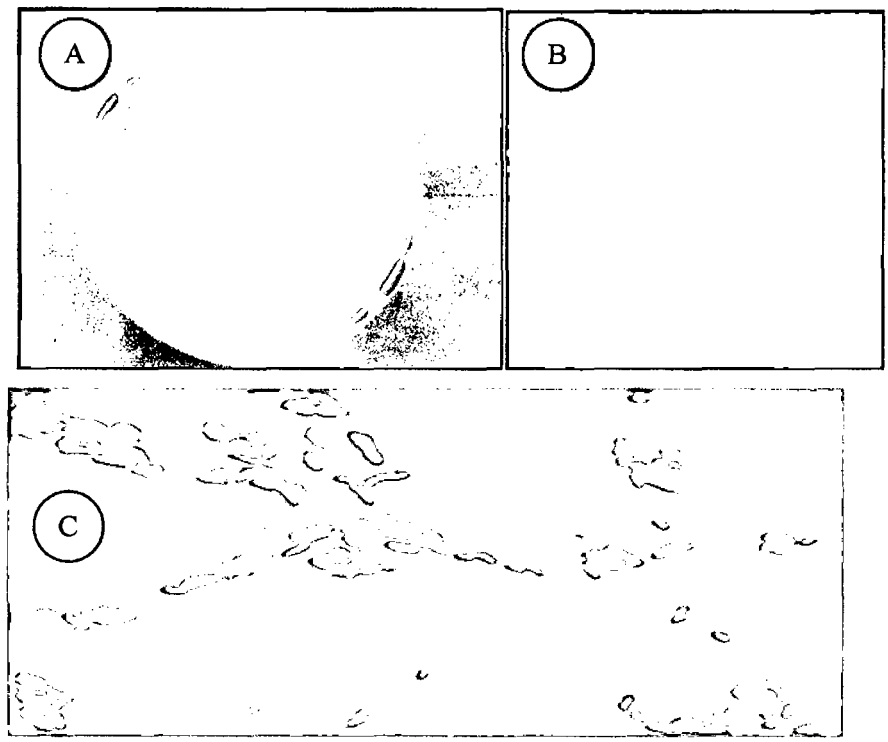
Segunda observacion:



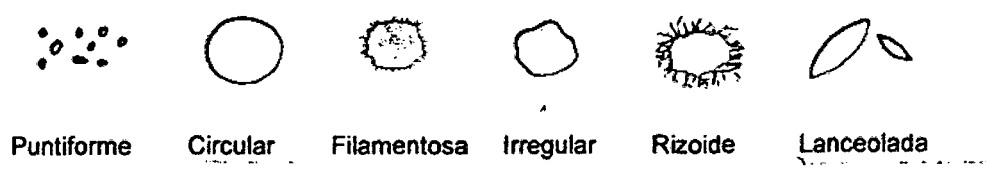
Tercera observacion:



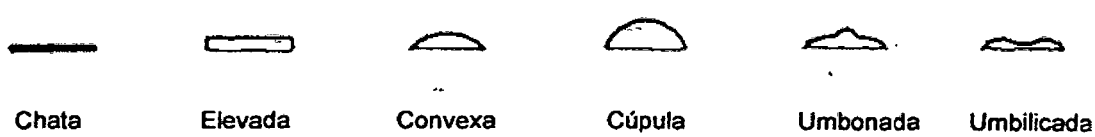
Fotografía 02. Características microscópicas de las levaduras del fermento de té
(1). Morfología celular: *Apiculatas* de levadura vista en el microscopio óptico motic y con una cámara digital, **(2).** Morfología celular: *Elipsoidales* de levadura vista en el microscopio óptico motic y con una cámara digital, **(3).** Morfología celular: *Ovaladas* de levadura vista en el microscopio óptico motic y con una cámara digital.



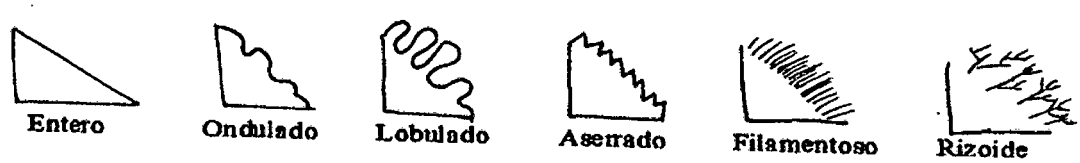
Fotografía 03. Características macroscópicas y microscópicas de las bacterias acéticas del fermento de té. **(A):** Placa con bacterias acéticas en agar manitol **(B):** Aspecto macroscópico de las bacterias acéticas. **(C):** Aspecto microscópicos de la bacteria acetobacter visualizado con el microscopio Motic.



Fotografía 04. Formas de la colonias en placas con Agar (Moreno et al., 2000)



Fotografía 05. Formas de elevación de colonias (Moreno et al., 2000)



Fotografía 06. Márgenes de colonias formadas en placas con agar (Campos, 2007)

1. Características sensoriales de la Kombucha

Evaluación del grado de satisfacción

a). "Color": por tipo de muestra

Tabla 13. Resumen estadístico para color

Tipo de muestra	Recuento	Promedio	Coeficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
423	22	4.68±1.49	31.88%	2.0	7.0	5.0
465	22	4.45±1.82	40.83%	2.0	7.0	5.0
571	22	5.18±1.30	25.01%	3.0	7.0	4.0
649	**22**	**4.40**±1.50	**34.04%**	**1.0**	**7.0**	**6.0**
654	22	4.95±1.25	25.28%	3.0	7.0	4.0
789	22	5.09±1.19	23.41%	3.0	7.0	4.0
796	22	4.54±1.65	36.39%	1.0	7.0	6.0
832	**22**	**5.27**±0.94	**17.74%**	**3.0**	**7.0**	**4.0**
Total	176	4.82±1.42	29.55%	1.0	7.0	6.0

Tabla 14. ANOVA para color por tipo de muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	18.1307	7	2.5901	1.29	0.2582
Intra grupos	337.409	168	2.00839		
Total (Corr.)	355.54	175			

Tabla 15. Pruebas de múltiple rangos para color por tipo de muestra
Método: 95.0 porcentaje LSD

Tipo de muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
649	22	4.40909	X
465	22	4.45455	XX
796	22	4.54545	XX
423	22	4.68182	XX
654	22	4.95455	XX
789	22	5.09091	XX
571	22	5.18182	XX
832	22	5.27273	X

Tabla 16. Diferencias significativas del color

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
423 - 465		0.227273	0.84356
423 - 571		-0.5	0.84356
423 - 649		0.272727	0.84356
423 - 654		-0.272727	0.84356
423 - 789		-0.409091	0.84356
423 - 796		0.136364	0.84356
423 - 832		-0.590909	0.84356
465 - 571		-0.727273	0.84356
465 - 649		0.0454545	0.84356
465 - 654		-0.5	0.84356
465 - 789		-0.636364	0.84356
465 - 796		-0.0909091	0.84356
465 - 832		-0.818182	0.84356
571 - 649		0.772727	0.84356
571 - 654		0.227273	0.84356
571 - 789		0.0909091	0.84356
571 - 796		0.636364	0.84356
571 - 832		-0.0909091	0.84356
649 - 654		-0.545455	0.84356
649 - 789		-0.681818	0.84356
649 - 796		-0.136364	0.84356
649 - 832	*	**-0.863636**	0.84356
654 - 789		-0.136364	0.84356
654 - 796		0.409091	0.84356
654 - 832		-0.318182	0.84356
789 - 796		0.545455	0.84356
789 - 832		-0.181818	0.84356
796 - 832		-0.727273	0.84356

* indica una diferencia significativa.

b). "Olor": por tipo de muestra

Tabla 17. Resumen estadístico para olor

Tipo de muestra	Recuento	Promedio	Coeficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
423	22	5.04±0.99	19.79%	3.0	7.0	4.0
465	**22**	**4.045**±1.46	**36.17%**	**1.0**	**7.0**	**6.0**
571	22	4.68±1.25	26.68%	3.0	6.0	3.0
649	22	4.27±1.86	43.45%	1.0	7.0	6.0
654	22	4.5±1.01	22.49%	3.0	7.0	4.0
789	22	4.91±1.19	24.27%	2.0	7.0	5.0
796	22	4.59±1.47	31.99%	2.0	7.0	5.0
832	**22**	**5.14**±0.99	**19.28%**	**3.0**	**7.0**	**4.0**
Total	176	4.65±1.33	28.64%	1.0	7.0	6.0

Tabla 18. ANOVA para olor por tipo de muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	21.8864	7	3.12662	*1.82*	*0.0860*
Intra grupos	288.273	168	1.71591		
Total (Corr.)	310.159	175			

Tabla 19. Pruebas de múltiple rangos para olor por tipo de muestra
Método: 95.0 porcentaje LSD

Tipo de muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
465	22	4.04545	X
649	22	4.27273	XX
654	22	4.5	XXX
796	22	4.59091	XXX
571	22	4.68182	XXX
789	22	4.90909	XX
423	22	5.04545	XX
832	22	5.13636	X

Tabla 20. Diferenciación de las muestras del olor

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
423 - 465	*	**1.0**	0.779722
423 - 571		0.363636	0.779722
423 - 649		0.772727	0.779722
423 - 654		0.545455	0.779722
423 - 789		0.136364	0.779722
423 - 796		0.454545	0.779722
423 - 832		-0.0909091	0.779722
465 - 571		-0.636364	0.779722
465 - 649		-0.227273	0.779722
465 - 654		-0.454545	0.779722
465 - 789	*	**-0.863636**	0.779722
465 - 796		-0.545455	0.779722
465 - 832	*	**-1.09091**	0.779722
571 - 649		0.409091	0.779722
571 - 654		0.181818	0.779722
571 - 789		-0.227273	0.779722
571 - 796		0.0909091	0.779722
571 - 832		-0.454545	0.779722
649 - 654		-0.227273	0.779722
649 - 789		-0.636364	0.779722
649 - 796		-0.318182	0.779722
649 - 832	*	**-0.863636**	0.779722
654 - 789		-0.409091	0.779722
654 – 796		-0.0909091	0.779722
654 – 832		-0.636364	0.779722
789 – 796		0.318182	0.779722
789 – 832		-0.227273	0.779722
796 – 832		-0.545455	0.779722

* indica una diferencia significativa.

c). "Sabor" por tipo de muestra

Tabla 21. Resumen estadístico para sabor

Tipo de muestra	Recuento	Promedio	Coeficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
423	22	5.23±1.31	25.00%	2.0	7.0	5.0
465	**22**	**3.23**±1.72	**53.18%**	**1.0**	**7.0**	**6.0**
571	**22**	**3.23**±1.48	**45.79%**	**1.0**	**7.0**	**6.0**
649	22	3.36±1.76	52.34%	1.0	7.0	6.0
654	22	4.0±1.41	35.36%	2.0	7.0	5.0
789	22	5.0±0.82	16.33%	3.0	6.0	3.0
796	22	3.68±1.64	44.66%	1.0	7.0	6.0
832	**22**	**5.86**±0.83	**14.22%**	**5.0**	**7.0**	**2.0**
Total	176	4.19±1.69	40.18%	1.0	7.0	6.0

Tabla 22. ANOVA para sabor por tipo de muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	161.994	7	23.142	*11.57*	*0.0000*
Intra grupos	336.045	168	2.00027		
Total (Corr.)	498.04	175			

Tabla 23. Pruebas de múltiple rangos para sabor por tipo de muestra
Método: 95.0 porcentaje LSD

Tipo de muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
571	22	3.22727	X
465	22	3.22727	X
649	22	3.36364	X
796	22	3.68182	X
654	22	4.0	X
789	22	5.0	X
423	22	5.22727	XX
832	22	5.86364	X

Tabla 24. Diferencias significativas del sabor

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
423 - 465	*	**2.0**	0.841854
423 - 571	*	**2.0**	0.841854
423 - 649	*	**1.86364**	0.841854
423 - 654	*	**1.22727**	0.841854
423 - 789		0.227273	0.841854
423 - 796	*	**1.54545**	0.841854
423 - 832		-0.636364	0.841854
465 - 571		0.0	0.841854
465 - 649		-0.136364	0.841854
465 - 654		-0.772727	0.841854
465 - 789	*	**-1.77273**	0.841854
465 - 796		-0.454545	0.841854
465 - 832	*	**-2.63636**	0.841854
571 - 649		-0.136364	0.841854
571 - 654		-0.772727	0.841854
571 - 789	*	**-1.77273**	0.841854
571 - 796		-0.454545	0.841854
571 - 832	*	**-2.63636**	0.841854
649 - 654		-0.636364	0.841854
649 - 789	*	**-1.63636**	0.841854
649 - 796		-0.318182	0.841854
649 - 832	*	**-2.5**	0.841854
654 - 789	*	**-1.0**	0.841854
654 - 796		0.318182	0.841854
654 - 832	*	**-1.86364**	0.841854
789 - 796	*	**1.31818**	0.841854
789 - 832	*	**-0.863636**	0.841854
796 - 832	*	**-2.18182**	0.841854

* indica una diferencia significativa.

d). "Apariencia general": por tipo de muestra

Tabla 25. Resumen estadístico para apariencia general

Tipo de muestra	Recuento	Promedio	Coeficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
423	22	4.68±1.46	31.19%	2.0	7.0	5.0
465	**22**	**4.14**±1.69	**41.06%**	**1.0**	**7.0**	**6.0**
571	22	4.77±1.11	23.25%	3.0	7.0	4.0
649	22	4.23±1.63	38.58%	1.0	7.0	6.0
654	22	4.64±1.00	21.61%	3.0	6.0	3.0
789	22	5.05±1.09	21.61%	3.0	7.0	4.0
796	22	4.36±1.36	31.27%	3.0	7.0	4.0
832	**22**	**5.45**±1.01	**18.53%**	**4.0**	**7.0**	**3.0**
Total	176	4.66±1.36	29.13%	1.0	7.0	6.0

Tabla 26. ANOVA para apariencia general por tipo de muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	29.5398	7	4.21997	*2.41*	*0.0222*
Intra grupos	293.682	168	1.74811		
Total (Corr.)	323.222	175			

Tabla 27. Pruebas de múltiple rangos para apariencia general por tipo de muestra.
Método: 95.0 porcentaje LSD

Tipo de muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
465	22	4.13636	X
649	22	4.22727	X
796	22	4.36364	XX
654	22	4.63636	XX
423	22	4.68182	XXX
571	22	4.77273	XXX
789	22	5.04545	XX
832	22	5.45455	X

Tabla 28. Diferencias significativas de la apariencia general

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
423 - 465		0.545455	0.787003
423 - 571		-0.0909091	0.787003
423 - 649		0.454545	0.787003
423 - 654		0.0454545	0.787003
423 - 789		-0.363636	0.787003
423 - 796		0.318182	0.787003
423 - 832		-0.772727	0.787003
465 - 571		-0.636364	0.787003
465 - 649		-0.0909091	0.787003
465 - 654		-0.5	0.787003
465 - 789	*	**-0.909091**	0.787003
465 - 796		-0.227273	0.787003
465 - 832	*	**-1.31818**	0.787003
571 - 649		0.545455	0.787003
571 - 654		0.136364	0.787003
571 - 789		-0.272727	0.787003
571 - 796		0.409091	0.787003
571 - 832		-0.681818	0.787003
649 - 654		-0.409091	0.787003
649 - 789	*	**-0.818182**	0.787003
649 - 796		-0.136364	0.787003
649 - 832	*	**-1.22727**	0.787003
654 - 789		-0.409091	0.787003
654 - 796		0.272727	0.787003
654 - 832	*	**-0.818182**	0.787003
789 - 796		0.681818	0.787003
789 - 832		-0.409091	0.787003
796 - 832	*	**-1.09091**	0.787003

* indica una diferencia significativa.

4.4.2. Análisis descriptivo cuantitativo:

a). Sabor: "Dulce" por tipo de muestra

Tabla 29. Resumen estadístico para el sabor dulce

Tipo de muestra	Recuento	Promedio	Coeficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
423	22	2.96±0.46	15.53%	2.1	3.5	1.4
465	22	2.36±0.85	35.86%	1.0	5.0	4.0
571	**22**	**1.65**±0.93	**56.63%**	**0.0**	**3.0**	**3.0**
649	22	3.36±0.50	14.89%	2.0	4.3	2.3
654	22	2.24±0.66	29.34%	1.0	3.2	2.2
789	22	3.32±0.70	21.17%	1.5	4.5	3.0
796	22	1.89±0.68	36.05%	0.5	3.0	2.5
832	**22**	**3.75**±0.55	**14.80%**	**2.5**	**4.8**	**2.3**
Total	176	2.69±0.98	36.44%	0.0	5.0	5.0

Tabla 30. ANOVA para el sabor: Dulce por tipo de muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	89.6709	7	12.8101	*27.30*	*0.0000*
Intra grupos	78.8409	168	0.469291		
Total (Corr.)	168.512	175			

Tabla 31. Pruebas de múltiple rangos para el sabor dulce por tipo de muestra,
Método: 95.0 porcentaje LSD

Tipo de muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
571	22	1.65	X
796	22	1.89091	XX
654	22	2.24545	XX
465	22	2.35909	X
423	22	2.96364	X
789	22	3.32727	X
649	22	3.36364	XX
832	22	3.74545	X

Tabla 32. Diferencias significativas del sabor dulce

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
423 - 465	*	**0.604545**	0.407768
423 - 571	*	**1.31364**	0.407768
423 - 649		-0.4	0.407768
423 - 654	*	**0.718182**	0.407768
423 - 789		-0.363636	0.407768
423 - 796	*	**1.07273**	0.407768
423 - 832	*	**-0.781818**	0.407768
465 - 571	*	**0.709091**	0.407768
465 - 649	*	**-1.00455**	0.407768
465 - 654		0.113636	0.407768
465 - 789	*	**-0.968182**	0.407768
465 - 796	*	**0.468182**	0.407768
465 - 832	*	**-1.38636**	0.407768
571 - 649	*	**-1.71364**	0.407768
571 - 654	*	**-0.595455**	0.407768
571 - 789	*	**-1.67727**	0.407768
571 - 796		-0.240909	0.407768
571 - 832	*	**-2.09545**	0.407768
649 - 654	*	**1.11818**	0.407768
649 - 789		0.0363636	0.407768
649 - 796	*	**1.47273**	0.407768
649 - 832		-0.381818	0.407768
654 - 789	*	**-1.08182**	0.407768
654 - 796		0.354545	0.407768
654 - 832	*	**-1.5**	0.407768
789 - 796	*	**1.43636**	0.407768
789 - 832	*	**-0.418182**	0.407768
796 - 832	*	**-1.85455**	0.407768

* indica una diferencia significativa.

b). Sabor: "Ácido" por tipo de muestra

Tabla 33. Resumen estadístico para el sabor: ácido

Tipo de muestra	Recuento	Promedio	Coeficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
423	**22**	**0.69**±0.63	**91.62%**	**0.0**	**2.5**	**2.5**
465	22	2.65±0.54	20.53%	1.5	3.5	2.0
571	22	2.92±0.75	25.58%	2.0	4.2	2.2
649	**22**	**2.94**±0.45	**15.34%**	**2.0**	**4.0**	**2.0**
654	22	2.70±0.87	32.12%	1.5	5.0	3.5
789	22	1.41±0.69	49.36%	0.0	2.5	2.5
796	22	1.49±0.59	39.59%	0.5	3.0	2.5
832	**22**	**0.69**±0.62	**91.63%**	**0.0**	**2.5**	**2.5**
Total	176	1.94±1.12	57.77%	0.0	5.0	5.0

Tabla 34. ANOVA para el sabor ácido por Tipo de muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	146.918	7	20.9882	*48.82*	*0.0000*
Intra grupos	72.2323	168	0.429954		
Total (Corr.)	219.15	175			

Tabla 35. Pruebas de múltiple rangos para el sabor ácido por Tipo de muestra,
Método: 95.0 porcentaje LSD

Tipo de muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
832	22	0.686364	X
423	22	0.686364	X
789	22	1.41364	X
796	22	1.49091	X
465	22	2.65	X
654	22	2.70455	X
571	22	2.92273	X
649	22	2.94091	X

Tabla 36. Diferencias significativas del sabor ácido

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
423 - 465	*	**-1.96364**	0.390304
423 - 571	*	**-2.23636**	0.390304
423 - 649	*	**-2.25455**	0.390304
423 - 654	*	**-2.01818**	0.390304
423 - 789	*	**-0.727273**	0.390304
423 - 796	*	**-0.804545**	0.390304
423 - 832		0.0	0.390304
465 - 571		-0.272727	0.390304
465 - 649		-0.290909	0.390304
465 - 654		-0.0545455	0.390304
465 - 789	*	**1.23636**	0.390304
465 - 796	*	**1.15909**	0.390304
465 - 832	*	**1.96364**	0.390304
571 - 649		-0.0181818	0.390304
571 - 654		0.218182	0.390304
571 - 789	*	**1.50909**	0.390304
571 - 796	*	**1.43182**	0.390304
571 - 832	*	**2.23636**	0.390304
649 - 654		0.236364	0.390304
649 - 789	*	**1.52727**	0.390304
649 - 796	*	**1.45**	0.390304
649 - 832	*	**2.25455**	0.390304
654 - 789	*	**1.29091**	0.390304
654 - 796	*	**1.21364**	0.390304
654 - 832	*	**2.01818**	0.390304
789 - 796		-0.0772727	0.390304
789 - 832	*	**0.727273**	0.390304
796 - 832	*	**0.804545**	0.390304

* indica una diferencia significativa.

c). Sabor: "Fermentado" por tipo de muestra

Tabla 37. Resumen estadístico para el sabor: fermentado

Tipo de muestra	Recuento	Promedio	Coeficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
423	22	1.44±0.73	51.05%	0.2	3.0	2.8
465	22	2.35±0.53	22.50%	1.5	4.0	2.5
571	**22**	**2.82**±0.76	**27.09%**	**1.0**	**4.2**	**3.2**
649	22	2.75±0.45	16.55%	2.0	3.5	1.5
654	22	2.44±0.65	26.71%	1.3	3.6	2.3
789	22	1.31±0.72	55.28%	0.2	2.5	2.3
796	22	2.56±0.89	34.92%	1.0	5.0	4.0
832	**22**	**0.92**±0.56	**61.02%**	**0.0**	**2.0**	**2.0**
Total	176	2.07±0.96	46.22%	0.0	5.0	5.0

Tabla 38. ANOVA para el sabor fermentado por tipo de muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	83.5845	7	11.9406	*26.04*	*0.0000*
Intra grupos	77.0445	168	0.458598		
Total (Corr.)	160.629	175			

Tabla 39. Pruebas de múltiple rangos para el sabor fermentado por tipo de muestra,
Método: 95.0 porcentaje LSD

Tipo de muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
832	22	0.913636	X
789	22	1.30909	XX
423	22	1.43636	X
465	22	2.35455	X
654	22	2.43636	XX
796	22	2.56364	XX
649	22	2.74545	XX
571	22	2.82273	X

Tabla 40. Diferencias significativas del sabor fermentado

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
423 - 465	*	**-0.918182**	0.403096
423 - 571	*	**-1.38636**	0.403096
423 - 649	*	**-1.30909**	0.403096
423 - 654	*	**-1.0**	0.403096
423 - 789		0.127273	0.403096
423 - 796	*	**-1.12727**	0.403096
423 - 832	*	**0.522727**	0.403096
465 - 571	*	**-0.468182**	0.403096
465 - 649		-0.390909	0.403096
465 - 654		-0.0818182	0.403096
465 - 789	*	**1.04545**	0.403096
465 - 796		-0.209091	0.403096
465 - 832	*	**1.44091**	0.403096
571 - 649		0.0772727	0.403096
571 - 654		0.386364	0.403096
571 - 789	*	**1.51364**	0.403096
571 - 796		0.259091	0.403096
571 - 832	*	**1.90909**	0.403096
649 - 654		0.309091	0.403096
649 - 789	*	**1.43636**	0.403096
649 - 796		0.181818	0.403096
649 - 832	*	**1.83182**	0.403096
654 - 789	*	**1.12727**	0.403096
654 - 796		-0.127273	0.403096
654 - 832	*	**1.52273**	0.403096
789 - 796	*	**-1.25455**	0.403096
789 - 832		0.395455	0.403096
796 - 832	*	**1.65**	0.403096

* indica una diferencia significativa.

d). Sabor: "Acético" por tipo de muestra

Tabla 41. Resumen estadístico para el sabor: Acético

Tipo de muestra	Recuento	Promedio	Coeficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
423	22	1.19±0.68	57.23%	0.2	2.2	2.0
465	22	2.0±0.60	30.19%	1.0	3.0	2.0
571	**22**	**2.61**±0.58	**22.38%**	**1.8**	**3.8**	**2.0**
649	22	2.15±0.74	34.52%	1.0	3.4	2.4
654	22	2.08±0.78	37.52%	1.0	3.2	2.2
789	22	1.00±0.69	68.66%	0.0	3.0	3.0
796	22	1.58±0.97	61.56%	0.2	5.0	4.8
832	**22**	**0.33**±0.59	**180.44%**	**0.0**	**2.1**	**2.1**
Total	176	1.62±0.98	61.04%	0.0	5.0	5.0

Tabla 42. ANOVA para el sabor acético por tipo de muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	84.6298	7	12.09	*23.52*	*0.0000*
Intra grupos	86.3645	168	0.514075		
Total (Corr.)	170.994	175			

Tabla 43. Pruebas de múltiple rangos para el sabor acético por tipo de muestra;
Método: 95.0 porcentaje LSD

Tipo de muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
832	22	0.331818	X
789	22	1.00455	X
423	22	1.19545	XX
796	22	1.57727	XX
465	22	2.0	XX
654	22	2.07727	X
649	22	2.15455	X
571	22	2.61364	X

Tabla 44. Diferencias significativas del sabor acético

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
423 - 465	*	**-0.804545**	0.426781
423 - 571	*	**-1.41818**	0.426781
423 - 649	*	**-0.959091**	0.426781
423 - 654	*	**-0.881818**	0.426781
423 - 789		0.190909	0.426781
423 - 796		-0.381818	0.426781
423 - 832	*	**0.863636**	0.426781
465 - 571	*	**-0.613636**	0.426781
465 - 649		-0.154545	0.426781
465 - 654		-0.0772727	0.426781
465 - 789	*	**0.995455**	0.426781
465 - 796		0.422727	0.426781
465 - 832	*	**1.66818**	0.426781
571 - 649	*	**0.459091**	0.426781
571 - 654	*	**0.536364**	0.426781
571 - 789	*	**1.60909**	0.426781
571 - 796	*	**1.03636**	0.426781
571 - 832	*	**2.28182**	0.426781
649 - 654		0.0772727	0.426781
649 - 789	*	**1.15**	0.426781
649 - 796	*	**0.577273**	0.426781
649 - 832	*	**1.82273**	0.426781
654 - 789	*	**1.07273**	0.426781
654 - 796	*	**0.5**	0.426781
654 - 832	*	**1.74545**	0.426781
789 - 796	*	**-0.572727**	0.426781
789 - 832	*	**0.672727**	0.426781
796 - 832	*	**1.24545**	0.426781

* **indica** una diferencia significativa.

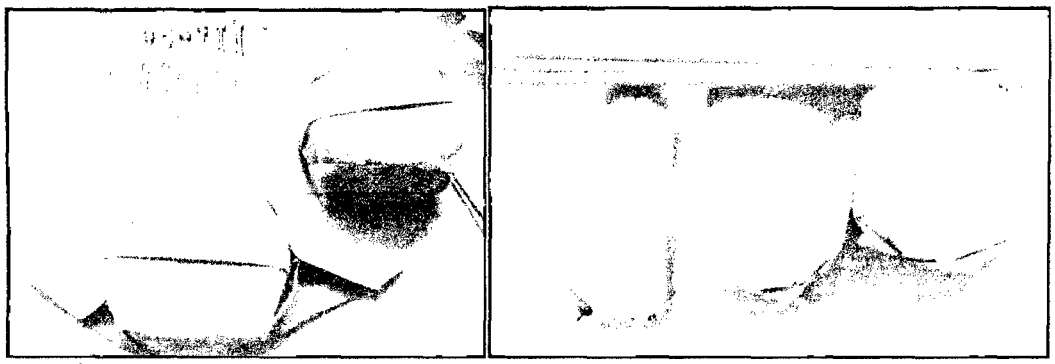
Tabla 45. Comportamiento del pH, Acidez, °Brix y Absorbancia durante la fermentación de la Kombucha

pH de las muestras								
Horas de fermentación	MUESTRAS							
	M-465	M-789	M-654	**M-832**	M-423	M-796	M-649	M-571
0	4.57	4.63	4.57	**4.63**	4.57	4.63	4.57	4.63
14	4.43	4.52	4.45	**4.43**	4.48	4.58	4.41	4.38
17	4.38	4.41	4.39	**4.31**	4.26	4.49	4.32	4.32
20	4.2	4.2	4.31	**4.26**	4.12	4.2	4.05	4.26
23	4.15	4.15	4.2	**4.23**	3.98	4.1	3.8	4.2
26	3.98	3.95	4	**4.18**	3.83	4.06	3.83	3.82
36	3.5	3.58	3.71	**3.91**	3.66	3.81	3.64	3.72
47			3.49	**3.7**			3.47	3.66
61			3.4	**3.5**			3.41	3.53
72			3.31	**3.4**			3.31	3.44

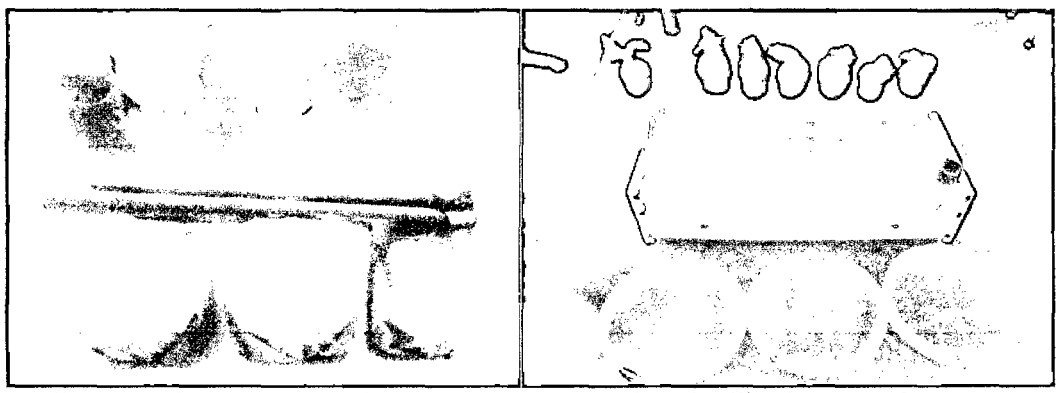
Ácido acético de las muestras (g/l)								
Horas de fermentación	MUESTRAS							
	M-465	M-789	M-654	**M-832**	M-423	M-796	M-649	M-571
0	0.36	0.42	0.36	**0.42**	0.36	0.42	0.36	0.42
14	0.72	0.8	0.54	**0.8**	0.6	0.72	0.79	0.76
17	0.85	0.84	0.57	**0.86**	0.66	0.98	0.82	0.82
20	0.96	0.88	0.61	**0.9**	0.78	1.02	1.09	0.91
23	1.02	0.96	0.72	**1.01**	1.02	1.15	2.21	1.02
26	1.08	1.5	0.93	**1.2**	1.44	1.31	2.33	1.15
36	1.26	1.68	1.59	**1.81**	2.16	2.16	2.75	2.25
47			2.58	**2.34**			4.7	3.18
61			3.48	**4.1**			5.15	4.15
72			4.38	**5.1**			7.5	7.6

°Brix de las muestras								
Horas de fermentación	MUESTRA							
	M-465	M-789	M-654	**M-832**	M-423	M-796	M-649	M-571
0	9	9	9	**9**	9	9	9	9
14	9	9	9	**9**	9	9	9	9
17	9	9	9	**9**	9	9	9	9
20	9	9	9	**9**	9	8.6	8.6	8.7
23	9	9	9	**9**	8.5	8.5	8.5	8.4
26	8.9	8.8	8.88	**8.89**	8.3	8.3	8.2	8.3
36	8.8	8.8	8.7	**8.76**	8	8	8	8
47			8.6	**8.6**			7.9	7.8
61			8.6	**8.65**			7.8	7.7
72			8.5	**8.5**			7.7	7.6

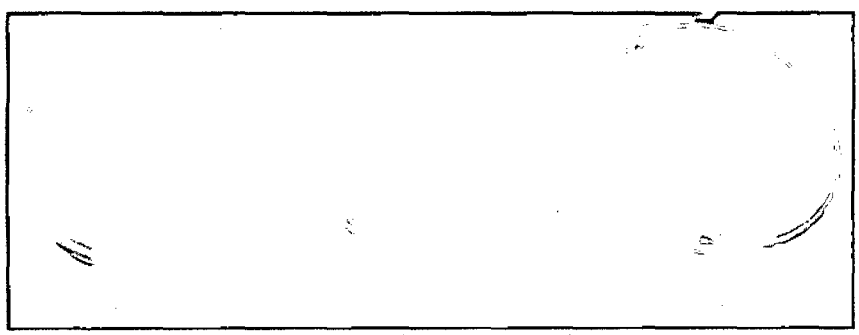
Absorbancia de las muestras								
Horas de fermentación	MUESTRA							
	M-465	M-789	M-654	**M-832**	M-423	M-796	M-649	M-571
0	0.898	1.632	0.898	**1.632**	0.898	1.632	0.898	1.632
14	1.36	1.8	1.361	**1.713**	1.837	1.937	1.211	1.941
17	1.472	1.814	1.472	**1.724**	1.913	1.916	1.391	1.991
20	1.791	1.82	1.792	**1.832**	2.021	2.037	1.516	2.014
23	2.01	1.832	2.011	**1.841**	2.103	2.116	1.661	2.144
26	2.061	1.911	2.061	**1.961**	2.211	2.2	1.913	2.213
36	2.192	2.199	2.189	**2.23**	2.231	2.237	2.231	2.311
47	2.1	2.132	2.496	**2.399**	2.1	2.12	2.481	2.415
61	1.56	1.62	2.532	**2.541**	2.05	2.07	2.711	2.712
72	1.321	1.42	3.011	**3.013**	1.72	1.85	3.023	3.031
108	0.639	0.643	2.23	**2.32**	1.32	1.315	2.25	2.56
144			0.733	**0.735**			1.293	1.298



Placas petri, pipetas tubos de ensayo, etc.

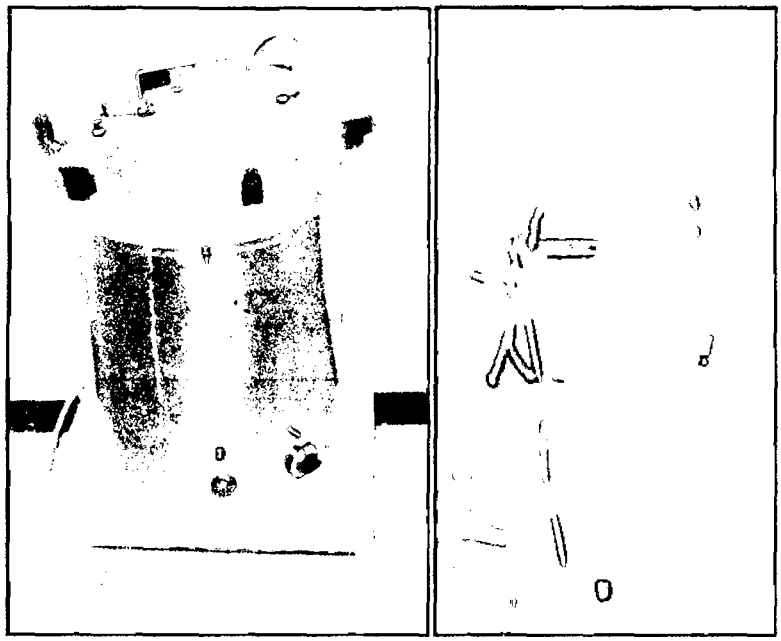


Medios de cultivo y materiales Preparación de diluciones y plaqueo

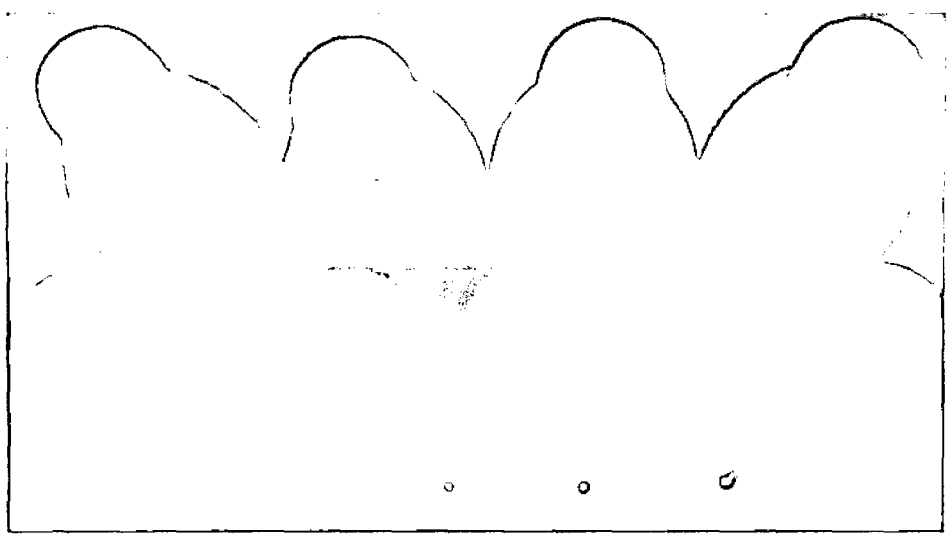


Placas con agar saboraud 4 % de glucosa

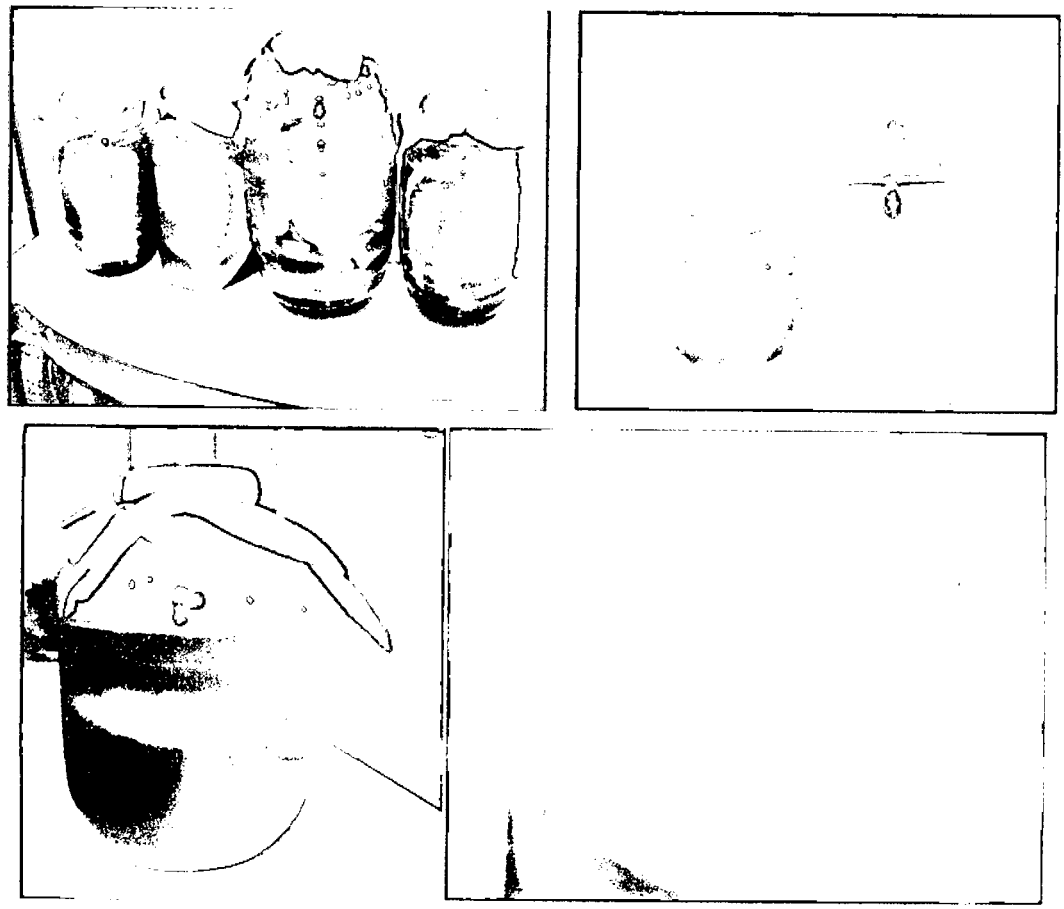
Fotografía 07. Preparación de materiales para la identificación de levaduras y bacterias acéticas en el fermento de té



Fotografía 08. Equipos para la esterilización (autoclave) de los materiales y para la fermentación (biorreactor)



Fotografía 09. Kombucha a distintos tratamientos y su codificación



Fotografía 10. Fermento de té y Kombucha