



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS PECUARIAS**

**“DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DEL *Acetobacter aceti* y  
*Saccharomyces cerevisiae* PRESENTES EN EL *Medusomyces gisevi*  
(HONGO KOMBUCHA) PARA UNA POSIBLE APLICACIÓN EN  
LA AGROINDUSTRIA, MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE TRES  
SUSTRATOS”**

**Trabajo de Titulación**

**Tipo:** Proyecto de Investigación

Presentado para optar el grado académico de:

**INGENIERO EN INDUSTRIAS PECUARIAS**

**AUTOR:** ANDRÉS SEBASTIÁN RICAURTE HEREDIA

**DIRECTOR:** Ing. IVÁN PATRICIO SALGADO TELLO Ms.

**Riobamba-Ecuador**

**2020**

**©2020, Andrés Sebastián Ricaurte Heredia**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, **ANDRÉS SEBASTIÁN RICAURTE HEREDIA**, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos.

Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación; El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.  
Riobamba, 28 de enero del 2020.



**Andrés Sebastián Ricaurte Heredia**

**060393713-7**

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS PECUARIAS**

El tribunal del trabajo de titulación certifica que: el trabajo de investigación: Tipo: Proyecto de Investigación, “**DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DEL *Acetobacter aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* PRESENTES EN EL *Medusomyces gisevi* (HONGO KOMBUCHA) PARA UNA POSIBLE APLICACIÓN EN LA AGROINDUSTRIA, MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE TRES SUSTRATOS**”, realizado por el señor: **ANDRÉS SEBASTIÁN RICAURTE HEREDIA**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnico, legales, en tal virtud el Tribunal autoriza su presentación.

	<b>FIRMA</b>	<b>FECHA</b>
Ing. Freddy Patricio Erazo Rodríguez. Mcs. <b>PRESIDENTE DEL TRIBUNAL</b>		2020-01-28
Ing. Iván Patricio Salgado Tello. Mcs. <b>DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN</b>		2020-01-28
Ing. César Iván Flores Mancheno. Ph.D. <b>MIEMBRO DEL TRIBUNAL</b>		2020-01-28

## **DEDICATORIA**

A mis padres Julio y Maritza quienes han sido el soporte e impulso durante toda mi vida, por sus enseñanzas, consejos, buen ejemplo, por ayudarme a salir adelante y afrontar las adversidades que se han presentado en este largo camino, hacer de mí una persona de bien y sobre todo por su apoyo y amor incondicional.

A mi hermano Renato por estar siempre estar a mi lado, además a todas las personas que me han apoyado y han sido parte de mi vida.

Andrés Sebastián Ricaurte Heredia.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios por todos los regalos que me ha dado, por hacerme cada vez más fuerte y por reflejar su amor en mis padres, quienes han hecho de mí una persona honrada, responsable y humilde, agradezco su esfuerzo y dedicación para poder hacer este sueño realidad.

Agradezco a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, a la Facultad de Ciencias Pecuarias por formar un profesional capaz de cumplir con las exigencias de nuestra sociedad, a todos los docentes que han aportado con sus conocimientos durante mi formación académica, de manera especial al Ing. Iván Salgado y al Dr. Iván Flores, por su valioso aporte en el desarrollo del trabajo de titulación, por su apoyo.

Agradezco a todas las personas que me han alentado durante mi formación académica, a quienes he conocido en este largo camino a quienes se han convertido en buenos amigos para mi vida.

Andrés R.

## TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE ANEXOS .....	xii
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT .....	xvi
INTRODUCCIÓN .....	1

### CAPITULO I

1. MARCO TEORICO REFERENCIAL.....	3
1.1. Hongo kombucha.....	3
1.2. Descripción del Kombucha .....	4
1.2.1. <i>Utilidad de kombucha</i> .....	4
1.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	5
1.4. <i>Acetobacter</i> .....	6
1.5. Que es la fermentación .....	7
1.6. Procesos de fermentación.....	9
1.6.1. <i>Fermentación alcohólica</i> .....	10
1.6.2. <i>Fermentación de la glucosa</i> .....	10
1.6.3. <i>Fermentación acética</i> .....	11
1.7. Generalidades del té de kombucha .....	12
1.7.1. <i>Composición química del té</i> .....	12
1.7.2. <i>Propiedades del té de Kombucha</i> .....	13
1.8. Productos de la fermentación del <i>Medusomyces Gisevi</i> (kombucha) .....	14
1.9. Té verde .....	15
1.10. Canela .....	17
1.11. Café .....	17

## CAPITULO II

<b>2.</b>	<b>MARCO METODOLOGICO .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1.</b>	<b>Localización y duración del experimento .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2.</b>	<b>Unidades experimentales.....</b>	<b>19</b>
<b>2.3.</b>	<b>Materiales, equipos e insumos .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3.1.</b>	<b><i>Materiales</i> .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3.2.</b>	<b><i>Equipos</i> .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3.3.</b>	<b><i>Insumos</i> .....</b>	<b>22</b>
<b>2.4.</b>	<b>Tratamiento y diseño experimental .....</b>	<b>22</b>
<b>2.5.</b>	<b>Mediciones experimentales .....</b>	<b>24</b>
<b>2.5.1.</b>	<b><i>Características físico-químicas de la materia prima</i> .....</b>	<b>24</b>
<b>2.5.2.</b>	<b><i>Características físico-químicas de los sustratos</i>.....</b>	<b>24</b>
<b>2.5.3.</b>	<b><i>Características físico-químicas del producto</i> .....</b>	<b>25</b>
<b>2.6.</b>	<b>Procedimiento experimental .....</b>	<b>26</b>
<b>2.7.</b>	<b>Caracterización de la bebida .....</b>	<b>27</b>

## CAPITULO III

<b>3.</b>	<b>RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1.</b>	<b>Evaluación de las características físico-químicas de la materia prima.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1.1.</b>	<b><i>pH</i>.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1.2.</b>	<b><i>Acidez</i> .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1.3.</b>	<b><i>Hidratos de carbono</i> .....</b>	<b>36</b>
<b>3.1.4.</b>	<b><i>Azucares</i> .....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.</b>	<b>Evaluación de las características físico-químicas de los sustratos.....</b>	<b>38</b>
<b>3.2.1.</b>	<b><i>pH</i>.....</b>	<b>38</b>
<b>3.2.2.</b>	<b><i>Acidez</i> .....</b>	<b>40</b>
<b>3.2.3.</b>	<b><i>Grados Bríx</i> .....</b>	<b>40</b>
<b>3.3.</b>	<b>Evaluación de las características físico-químicas del producto .....</b>	<b>41</b>



3.3.1.	<i>pH</i> .....	41
3.3.2.	<i>Acidez</i> .....	43
3.3.3.	<i>Contenido de alcohol</i> .....	44
3.4.	<b>Determinación de la viabilidad microbiológica del inóculo en el tiempo</b> .....	45
	<b>CONCLUSIONES</b> .....	50
	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	51
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		
<b>ANEXOS</b>		

## ÍNDICE DETABLAS

<b>Tabla 1-1:</b> Bacterias y levaduras asociadas con la fermentación del Kombucha.....	8
<b>Tabla 2-2:</b> Condiciones Meteorológicas del Cantón Riobamba.....	19
<b>Tabla 3-2:</b> Nomenclatura elegida para determinar el nombre para los tratamientos de la investigación .....	23
<b>Tabla 4-2:</b> Esquema del experimento.....	24
<b>Tabla 5-2 :</b> Esquema del análisis de la varianza. ....	25
<b>Tabla 6-2:</b> Determinación del pH según la NTE INEN 0983. ....	27
<b>Tabla 7-2:</b> Determinación del contenido de grados Brix por el método del refractómetro.....	29
<b>Tabla 8-2:</b> Determinación del contenido de coliformes fecales en el té de Kombucha de acuerdo a la norma técnica NTE INEN 1529-8. ....	30
<b>Tabla 9-2:</b> Determinación del grado alcohólico en el té de Kombucha de acuerdo a la norma técnica NTE INEN 0360.....	31
<b>Tabla 10-3:</b> Evaluación de las características físico-químicas de la materia prima (té, café y canela), para determinar la viabilidad del <i>Acetobacter Aceti</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> presentes en el <i>Medusomyces gisevi</i> (hongo kombucha).....	33
<b>Tabla 11-3:</b> Evaluación de las características físico químicas del te de Kombucha para una posible aplicación en la agroindustria, mediante la utilización de tres sustratos. ....	42
<b>Tabla 12-3:</b> Determinación de la viabilidad microbiológica del inóculo en el tiempo (té, café y canela) por efecto del tipo de bacteria .....	46
<b>Tabla 13-3:</b> Determinación de la viabilidad microbiológica del inóculo en el tiempo (té, café y canela) por efecto del sustrato .....	47

<b>Tabla 14-3:</b> Determinación de la viabilidad microbiológica del inóculo en el tiempo (té, café y canela) por efecto de la interacción entre el tipo de materia prima y sustrato .....	49
--	----

## ÍNDICE DE ANEXOS

**Anexo A.** Determinación del pH de los diferentes sustratos para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha)

**Anexo B.** Determinación de la acidez de los diferentes sustratos para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha)

**Anexo C.** Determinación de los grados brix de los diferentes sustratos para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha)

**Anexo D.** Determinación de los de los azúcares totales de la materia prima para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

**Anexo E.** Determinación de los carbohidratos solubles de la materia prima para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

**Anexo F:** Determinación de la acidez de la materia prima para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

**Anexo G:** Determinación del pH de la materia prima para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

**Anexo H:** Determinación del pH inicial del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

**Anexo I:** Determinación del pH a las 24 horas del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

**Anexo J:** Determinación del pH a las 48 horas del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

**Anexo K:** Determinación del pH a las 72 horas del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

**Anexo L:** Determinación del pH a las 96 horas del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

**Anexo M:** Determinación del pH a las 120 horas del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

**Anexo N:** Determinación de la acidez inicial del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

**Anexo O:** Determinación de la acidez a las 24 horas del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

**Anexo P:** Determinación de la acidez a las 48 horas del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

**Anexo Q:** Determinación de la acidez a las 72 horas del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

**Anexo R:** Determinación de la acidez a las 96 horas del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

**Anexo S:** Determinación de la acidez a las 120 horas del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

**Anexo T:** Determinación del alcohol a las 24 horas del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

**Anexo U:** Determinación del alcohol a las 48 horas del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

**Anexo V:** Determinación del alcohol a las 72 horas del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

**Anexo W:** . Determinación del alcohol a las 96 horas del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

**Anexo Y:** Determinación de la viabilidad microbiológica del inóculo a las 24 horas para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

**Anexo Z:** Determinación de la viabilidad microbiológica del inóculo a las 48 horas para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

**Anexo AA:** Determinación de la viabilidad microbiológica del inóculo a las 72 horas para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

**Anexo BB:** Determinación de la viabilidad microbiológica del inóculo a las 96 horas para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

**Anexo CC:** Determinación de la viabilidad microbiológica del inóculo a las 120 horas para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos.

## RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar de la viabilidad del *Acetobacter aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* para una posible aplicación en la agroindustria, mediante la utilización de tres sustratos, por lo que se desarrolló un medio metabólico para el crecimiento del *Medusomyces gisevi* con la utilización de té verde (*Camellia sinensis*), café (*Coffea arabica L*) y canela (*Cinnamomum verum*), se realizaron pruebas físico químicas para el producto de pH, acidez y % de alcohol a las 0,24,48,72,96 y 120 horas después de la inoculación, presentando valores de alcohol entre 0.3 y 0.8, un descenso en el valor del pH y un aumento en los valores de la acidez, excepto en el elaborado con *Cinnamomum verum* . Para el análisis estadístico se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo bifactorial, dando un resultado altamente significativo en los tratamientos realizados con *Camellia sinensis* y *Coffea arabica L*, en donde se desarrollaron el *Saccharomyces cerevisiae* en un lapso de 24 a 48 H, así se produce el alcohol necesario para que el *Acetobacter aceti* se pueda desarrollar, presentando un mayor crecimiento en el caso del tratamiento con *Camellia sinensis*, que en el caso de *Saccharomyces cerevisiae* tiene un crecimiento de 73UFC/mL analizado y el *Acetobacter aceti* un crecimiento de 200 UFC/mL a las 120 H. Se concluye que el mejor sustrato para la elaboración de la simbiosis de kombucha, se desarrolló con *Camellia sinensis*, por las condiciones que presenta y sirve como alimento para el desarrollo de los microorganismos. Se recomienda aplicar procesos tecnológicos agroindustriales, para la elaboración de la bebida de Kombucha ya que de esta forma se puede colocar un nuevo producto en el mercado y darle mayor tiempo de vida útil sin que pierda sus características.

**Palabras clave:** <SIMBIOSIS>, <VIABILIDAD>, <MICROORGANISMOS>, <HONGO KOMBUCHA (*Medusomyces gisevi*)>, <TÉ VERDE (*Camellia sinensis*)>, <CAFÉ (*Coffea arabica L*)>, <CANELA (*Cinnamomum verum*)>, < *Acetobacter aceti* >, < *Saccharomyces cerevisiae*>.



## ABSTRACT

The objective of the study was to determine the viability of *Acetobacter aceti* and *Saccharomyces cerevisiae* present in *Medusomyces gisevi* for a possible application in agribusiness, through the use of three substrates, so a metabolic medium for the growth of *Medusomyces gisevi* was developed with the use of green tea (*Camellia sinensis*), coffee (*Coffea arabica L*) and cinnamon (*Cinnamomum verum*), physical and chemical tests were carried out for the pH product, acidity and % of alcohol at 0,24,48,72,96 and 120 hours after inoculation, presenting alcohol values between 0,3 and 0,8, a decrease in the pH value and an increase in the acidity values, except in that made with *Cinnamomum verum*. For the statistical analysis, a completely randomized design with a bifactorial arrangement was used, giving a highly significant result in the treatments carried out with *Camellia sinensis* and *Coffea arabica L*, where *Saccharomyces cerevisiae* were developed in a period of 24 to 48 H, thus the alcohol necessary is produced so that the *Acetobacter aceti* can be developed, showing greater growth in the case of treatment with *Camellia sinensis*, which in the case of *Saccharomyces cerevisiae* has a growth of 73 UFC / mL analyzed and *Acetobacter aceti* a growth of 200 UFC / mL at 120 H. It is concluded that the best substrate for the preparation of kombucha symbiosis, was developed with *Camellia sinensis*, due to the conditions it presents and serves as food for the development of microorganisms. It is recommended to apply agro-industrial technological processes for the preparation of the Kombucha beverage since in this way a new product can be placed on the market and give it a longer shelf life without losing its characteristics.

**Keywords:** <SIMBIOSIS>, <VIABILITY>, <MICROORGANISMS>, < KOMBUCHA FONGUS (*Medusomyces gisevi*) », <GREEN TEA (*Camellia sinensis*)>, <COFFEE (*Coffea arabica L*)>, <CINNAMON (*Cinnamomum verum*)>, <*Acetobacter aceti*>, <*Saccharomyces cerevisiae*>.



## INTRODUCCIÓN

La escasa eficiencia en los procesos productivos de bebidas nutritivas o bebidas alcohólicas, es uno de los grandes problemas en la implementación de nuevos productos o negocios; el problema principal radica en el control de las reacciones químicas que se producen y en el comportamiento de los sustratos que en la mayoría de casos son orgánicos y que pueden presentar reacciones que no son fáciles de controlar en la producción. (Fontana, 2011 pág. 12).

El uso de microorganismos como sustratos en la producción de bebidas ha sido ampliamente estudiado por la humanidad; como resultado de esto mayormente en la industria se han utilizado levaduras; pero estas producen la fermentación total de las bebidas azucaradas con lo que producen etanol y se dan bebidas alcohólicas; pero en ocasiones que no se quiere una fermentación total de los azúcares y no se puede utilizar este sustrato, (Dufresne, 2010 pág. 21).

Otro de los problemas que se enfrentan la producción de bebidas nutracéuticas son las características de sabor; textura y otras consideraciones organolépticas de las bebidas; esto ocasiona que la selección de los aditivos que se utilicen sea decisiva al momento de elaborarlas; esto además ocasiona que los gastos de producción aumenten y que las propiedades nutritivas de las bebidas disminuyan; ya que los aditivos por lo general incluyen azúcares, (Brado, 2017 pág. 34).

Además la producción de bebidas como té u otras bebidas ancestrales siempre han tenido en el Ecuador una connotación tradicional, por lo que los esfuerzos de investigar maneras de producción industrial son escasos; llegando así a considerar como bebidas de las comunidades o pueblos que la producen y no siendo consumidas en otras comunidades o en ciudades más grandes, (Bellozo, 2013 pág. 58).

La escasa industrialización y la dificultad de controlar los procesos de producción han dado como resultado que los productores no apuesten a sistemas alternativos de producción; así como también no se dé un cambio en los hábitos de consumo; que muchas veces solo se incluyen bebidas azucaradas sin ningún valor nutritivo, lo que afecta a la salud de los consumidores y que conlleva a la aparición de enfermedades como obesidad, colesterol alto entre otras enfermedades relacionados con los hábitos de alimentación de la población, (Gomez, 2017 pág. 45).

Según datos del (INEC, 2018); las plantaciones de té en el Ecuador ocupan alrededor de 80 hectáreas, las cuales se encuentran en las zonas de la región amazónica especialmente en las

provincias de Pastaza y Morona Santiago; el 95% de la cosecha es utilizado para la producción de té empaquetado; mientras que el restante 5% es utilizado para la producción de bebidas azucaradas a partir del té, el cual tiene mayor valor comercial pero necesita de una inversión mayor, (Calonge, 2003 pág. 12).

Por lo cual es necesario la inclusión de nuevos métodos de producción para aumentar la eficiencia en la producción de bebidas a partir del té; además de otorgarle mejores características para que esta bebida pueda tener la aceptación de los consumidores y pueda competir con las bebidas que existen en la actualidad; por lo que es necesario la inclusión de nuevos sustratos que cambien la composición y características nutricionales, (Gomez, 2017 pág. 45) .

Otra de las propiedades que presenta el té de kombucha es ser uno de los productos de la fermentación caseros que contienen organismos vivos activos capaces de regenerar la microbiota amiga en el organismo, sobre todo en el aparato digestivo y regenerar las defensas, además de muchas otras propiedades que revelan los beneficios de su consumo regular; esto ayuda a controlar los problemas que existe en el aparato digestivo y a procesar mejor los alimentos que se consumen mejorando de manera significativa la salud de las personas, (Brado, Patrick, 2017).

Dado que es una tecnología ancestral, la producción de té de kombucha no requiere condiciones especiales, o inversión en maquinarias y equipos; esto hace que el proyecto sea viable y si se logra obtener una técnica para la obtención de esta bebida de alta calidad se generara ganancia en los productores de té; además de que se puede comercializar la bebida en un nicho en el que no han incursionado otras bebidas ya que no tienen las propiedades nutritivas ni farmacológicas del té de kombucha. Por lo expuesto anteriormente los objetivos fueron:

- Desarrollar un sustrato In-vitro que sirva como medio metabólico de crecimiento para el *Medusomyces gisevi*.
- Utilizar y caracterizar como medios de sustrato al té verde (*Camellia sinensis*), café (*Coffea arabica L*) y canela (*Cinnamomum verum*).
- Determinar la viabilidad del *Acetobacter aceti* y el *Saccharomyces cerevisiae* en los distintos sustratos empleados.
- Evaluar el mejor sustrato como medio óptimo de crecimiento en el tiempo, para el *Acetobacter aceti* y el *Saccharomyces cerevisiae*, como alternativa en nuevos procesos agroindustriales.

## CAPITULO I

### 1. MARCO TEORICO REFERENCIAL

#### 1.1. *Hongo kombucha*

El hongo Kombucha es conocido como el Divino Tsche, debido a sus propiedades mágicas, ha sido consumido desde el año 220 a. de C. en Manchuria durante la dinastía Tsin (Roche J, 1998). En 414 el Dr. Kombu lo llevó a Corea y Japón para tratar los problemas gastrointestinales del emperador. A través de los distintos viajeros llegaría a Rusia y Europa, y de allí sería conocido por todo el mundo. (Calonge, 2014 pág. 71).

Hay varias hipótesis sobre el origen del nombre, la primera dice que el físico coreano que trató al emperador de Japón se llamaba Kombu y de ahí pudo derivar el nombre, y la segunda y más aceptada es que la palabra kombucha, deriva de otras japonesas: Kombu (alga) y cha (té), (Dufresne, 2010 pág. 70).

Para que el hongo Kombucha pueda reproducirse, es necesario que el medio tenga la cantidad suficiente de azúcar y se recomienda usar hojas de té negro para que se reproduzca más rápido. Algunos autores reportan que la adición de teofilina y teobromina al medio estimula el crecimiento del hongo, (Stevens, 2002 pág. 132).

Los productos de fermentación identificados han sido distintos ácidos (láctico, acético, glucónico y glucurónico) etanol y glicerol. También se han detectado vitaminas, antibióticos y aminoácidos. La concentración de estos productos dependerá del tiempo y del lugar en el que se lleve a cabo la fermentación, (Ermito, 2014 pág. 74).

La exploración científica de los hongos comenzó en la década de 1950, con el Instituto Bacteriológico de Moscú (como parte de sus proyectos de investigación del estudio del cáncer en todo el país). Descubrieron que no era un solo organismo sino una colonia simbiótica de varias bacterias y levaduras con vías metabólicas altamente complejas y sofisticadas, (Fontana, 2011 pág. 35).

Este grupo de organismos muestra un efecto antibiótico distinto a través de la presencia de ácido úsnico que está presente en algunos líquenes. También existen evidencias de que el ácido úsnico puede desactivar ciertos grupos de virus. Como dato curioso en la historia del hongo medicinal,

se comenta que los científicos rusos realizaron un profundo estudio para detectar la incidencia de cáncer en todos los distritos de la URSS (Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas actualmente Rusia), y fue el caso en las Montañas Urales Occidentales, que difícilmente se registraban casos de cáncer, (Brado, 2017 pág. 23).

## **1.2. Descripción del Kombucha**

El Kombucha es una bebida no alcohólica fermentada, tradicional con una historia de miles de años, la misma que se prepara fermentando el té negro endulzado con el cultivo orgánico de Manchurian fungus, que es una simbiosis de bacterias (*Acetobacter spp* y *Gluconobacter sp*) y levaduras (*Saccharomyces spp*), (Calvo, 2013 pág. 67).

Se denomina Kombucha tanto al fermento madre utilizada como a la bebida resultante, sin embargo, vamos a llamar a cada cosa por su nombre y designar como Kombucha a la madre productora del fermento y como té de Kombucha a la bebida resultante. Frecuentemente se lo llama hongo, debido a su aspecto y textura, pero la Kombucha no es un hongo, sino una colonia de bacterias y levaduras que viven en simbiosis, (Gomez, 2017 pág. 78).

El té de Kombucha es una bebida de té azucarado fermentado con *Manchurian fungus*, dicho té está compuesto de dos porciones: la capa flotante de celulosa y el caldo líquido agrio. Inicialmente comienza siendo una película gelatinosa transparente, que pronto se va opacando por los bordes hasta llegar a cubrir toda la superficie del líquido, adquiriendo así una forma redonda, dependiendo del borde del recipiente. Mientras se degrada el azúcar, el té se vuelve ácido, como productos de dicha degradación se obtienen ciertos ácidos y enzimas responsables del sabor característico y de sus efectos benéficos, (Lajolo, 2002 pág. 67).

### **1.2.1. Utilidad de kombucha**

Opiniones que destacan las ventajas del té Kombucha sobre todo en humanos, como regulador del sistema digestivo, alivia dolencias a consecuencia de artritis mantiene saludable a la piel. Kombucha por ser un fenómeno tipo sidra es bebida agradable que se utiliza como bebida anti sed, su consumo tiene la ventaja porque se ingiere los 3 microorganismos integrantes vivos tanto de hongos como bacterias a quienes los científicos atribuyen influencia positiva en el sistema digestivo, (Gomez, 2017 pág. 56).

Otra cualidad atribuible a la kombucha es su acción sobre la artritis, pues sus altos niveles de glucosamina, siendo esta la sustancia que mantiene las articulaciones saludables, promueve la producción de ácido hialurónico en el organismo, este ácido ayuda a su vez a preservar la estructura de los cartílagos, reduciendo el dolor que se produce en las articulaciones a causa de esta enfermedad. Pues este ácido mantiene lubricada las articulaciones y los tejidos conectivos del cuerpo permitiendo que los mismos sean flexibles, (Stevens, 2002 pág. 98).

Conocido como “el té de la inmortalidad”, el té kombucha prometía longevidad y bienestar. Hoy en día, el té kombucha es apreciado por su alto contenido de vitaminas, sobre todo vitaminas del grupo B, por sus propiedades probióticas y porque facilita la digestión, entre otros beneficios para la salud intestinal y la salud en general. El té kombucha se puede consumir solo como una bebida refrescante, combinado con zumo de fruta o con cualquier bebida y también como ingrediente en aderezos para ensaladas, en salsas y en adobos dulces y salados. El kombucha tiene un ligero sabor agridulce y crea una sensación de hormigueo en la boca. Cuanto más tiempo se fermenta el té (hasta 4 semanas), su sabor recordará al vinagre. Para conseguir un sabor más dulce el periodo de fermentación debe ser más corto (5-10 días), (Calvo, 2013 pág. 23).

### **1.3. *Saccharomyces cerevisiae***

*Saccharomyces cerevisiae* es una levadura, un hongo unicelular, del grupo de los ascomicetos. Este grupo incluye a más de 60000 especies, entre ellas las trufas, las colmenillas o el *Penicillium*, el hongo que produce la penicilina, pero también a hongos patogénicos tanto de plantas como de animales, el más conocido de los cuales es *Candida*. En la naturaleza se encuentra sobre sustratos ricos en azúcares o en los exudados y savias dulces de algunas plantas, (Bacardit, 2012 pág. 1).

Levadura es un nombre genérico que agrupa a una variedad de hongos, incluyendo tanto especies patógenas para plantas y animales, como especies no solamente inocuas sino de gran utilidad. De hecho, las levaduras constituyen el grupo de microorganismos más íntimamente asociado al progreso y bienestar de la humanidad, (Jaramillo, 2016 pág. 87).

Algunas especies de levaduras del género *Saccharomyces* son capaces de llevar a cabo el proceso de fermentación, propiedad que se ha explotado desde hace muchos años en la producción de pan y de bebidas alcohólicas, y que a su vez ha inspirado un sinnúmero de obras de arte que ensalzan al Dios del vino y a aquellos que disfrutan su consumo, El número de bacterias acéticas usualmente presente en el jugo fermentado es pequeño y a menudo son del tipo indeseable o inactivo(Gonzalez, 2010 pág. 23).

En 1897, los hermanos Hans y Edward Buchner obtuvieron extractos libres de células moliendo levadura para pan con granos de arena, a los cuales adicionaron grandes cantidades de azúcar de caña para evitar su posible contaminación. Para su sorpresa, encontraron que el azúcar se fermentaba rápidamente: por primera vez se había descubierto un modelo para el estudio de la fermentación alcohólica en un sistema carente de células. Este descubrimiento atrajo la atención de los bioquímicos, que decidieron analizar cada uno de los pasos que conducían a la producción de etanol y bióxido de carbono a partir de la glucosa., (Alimentos funcionales una historia con mucho presente y futuro , 2005 pág. 45).

Este trabajo implicó el esfuerzo de muchos científicos y dio como resultado el descubrimiento y descripción del metabolismo del carbono; algunas de las vías metabólicas que conocemos actualmente, llevan los nombres de los científicos que participaron en este trabajo, como Embden y Meyerhof. La vía metabólica que permite la utilización de glucosa fue la primera ruta metabólica descrita, y la metodología empleada para lograrlo se utilizó para el estudio posterior de otras vías que constituyen el metabolismo celular, (Calvo, 2013 pág. 78).

#### ***1.4. Acetobacter***

El *Acetobacter*, un género de bacterias aeróbicas que utiliza como sustrato el alcohol para originar ácido acético. Estas bacterias a diferencia de las levaduras productoras de alcohol, requieren gran cantidad de O<sub>2</sub> para su crecimiento y actividad. El proceso metabólico se basa en la conversión del etanol en acetaldehído (Rx catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa) y del acetaldehído hidratado en ácido acético por la acción de la enzima acetaldehído deshidrogenasa, (Martínez, 2009 pág. 1).

El *Acetobacter* es un género de bacterias gram negativas que abarca una gran cantidad de especies, muchas de ellas de importancia comercial. Fue descrito por primera vez en 1898 por el microbiólogo holandés Martinus Beijerinck, Así mismo, estas bacterias son aeróbicas obligadas. Debido a esto, para desarrollarse deben estar obligatoriamente en un ambiente en el que haya una amplia disponibilidad de oxígeno, (Sreeramulu, 2014 pág. 65).

Las bacterias que lo conforman son pleomórficas, pudiendo tener forma de bastones u ovoide. Además, se caracterizan porque tienen la capacidad de producir ácido acético a partir de etanol. Esta es una habilidad que ha sido explotada por el hombre a nivel comercial, en la producción de vinagre y de una amplia variedad de productos derivados de este. (Artemio, 2017 pág. 1).

La fermentación acética necesita de microorganismos como son las bacterias que llevan a cabo la oxidación y transformación de Alcohol Etílico. Tienen la capacidad de producir ácido acético a partir de etanol, habilidad que ha sido explotada por el hombre a nivel comercial, en la producción de vinagre y de una amplia variedad de productos derivados de este. En los tipos de fermentaciones de alimentos encontramos a la fermentación acética la cual necesita de microorganismos como son las bacterias que llevan a cabo la oxidación y transformación de Alcohol Etílico, (Artemio, 2017 pág. 34).

### **1.5. Que es la fermentación**

La fermentación es un proceso que degrada moléculas para transformarlas en otras moléculas más simples. En la elaboración del pan las levaduras transforman el almidón (un azúcar complejo) en glucosa. Lo hacen mediante la enzima amilasa (otras enzimas: glucosidasas y amiloglucosidasas), (Calvo, 2013 pág. 34).

La mayor parte de los azúcares que desdobra la levadura los utiliza la propia levadura para vivir y desarrollarse, y otra parte quedan en la masa del pan, dándole parte de su sabor y el color dorado del horneado. En el proceso de fermentación se producen unos desechos, (Bellozo, 2013 pág. 45):

- Alcohol (por eso se dice que la fermentación de la levadura es alcohólica). Este alcohol (concretamente etanol) se evapora durante el horneado.
- Dióxido de carbono o CO<sub>2</sub>, gas que “infla” la masa, en forma de burbujas. También el CO<sub>2</sub> se elimina en el horneado.
- Y también produce calor (si se fijan, una masa de pan al fermentar genera un calor propio).

La fermentación ocurre de forma natural cuando el azúcar entra en contacto con ciertas variedades de levaduras y bacterias. Las bacterias y levaduras conviven en una “comunidad” simbiótica, lo cual significa que tienen una relación de dependencia mutua conocida como Cultivo Simbiótico de Bacterias y Levaduras (conocido como SCOBY, su acrónimo en inglés).

Algunas bacterias y levaduras que se asocian con la fermentación del kombucha son:



**Tabla 1-1:** Bacterias y levaduras asociadas con la fermentación del Kombucha.

Tipo de microorganismo	DEFINICIÓN
<b>Bacterias</b>	
<i>Acetobacter</i>	Una bacteria aeróbica que produce ácido acético y ácido glucónico. Dos tipos de esta bacteria que suelen aparecer en kombucha son <i>acetobacter xylinoides</i> y <i>acetobacter ketogenum</i>
<i>Lactobacillus</i>	Otra bacteria aeróbica que puede aparecer en kombucha, aunque no siempre. Produce ácido láctico
<i>Gluconacetobacter kombuchae</i>	una bacteria anaeróbica que se encuentra exclusivamente en el kombucha. Se alimenta de nitrógeno que procede del té y produce ácido acético y ácido glucónico.
<b>Levaduras</b>	
<i>Saccharomyces</i>	una variedad de levaduras que producen alcohol y son las más comunes en el kombucha. Tienen derivados aeróbicos y anaeróbicos
<i>Brettanomyces</i>	otra variedad de levadura que se encuentra con frecuencia en el kombucha. Produce alcohol o ácido acético y puede ser aeróbico o anaeróbico
<i>Zygosaccharomyces kombuchaensis</i>	Esta levadura se encuentra solo en el kombucha. Produce alcohol y carbonación.

Fuente: (Calonge, 2014 pág. 34)

Realizado por: RICAURTE, Andrés, 2020.

Se llama fermentación a un proceso de oxidación incompleta, que no requiere de oxígeno para tener lugar, y que arroja una sustancia orgánica como resultado. Es un proceso de tipo catabólico, es decir, de transformación de moléculas complejas a moléculas sencillas y generación de energía química en forma de ATP (Adenosín Trifosfato), (Carminiano, 2019 pág. 23).

Durante el proceso de la fermentación del kombucha, la SCOBY hace que el azúcar se descomponga en ácidos, vitaminas, minerales, enzimas y dióxido de carbono, lo cual aporta el efecto gaseoso al té. Es decir, el azúcar alimenta a las bacterias y levaduras para que fermenten el té y, por lo tanto, el kombucha no contiene azúcar o tiene un nivel muy bajo, aproximadamente 1-2 g de azúcar por vaso. Cuánto más se deja fermentar, más bajos son los niveles de azúcar. Hay tres factores fundamentales para una fermentación exitosa:

- Temperatura ambiental: las temperaturas muy elevadas aceleran la actividad de las bacterias y levaduras y también el proceso de fermentación, mientras temperaturas muy bajas lo hacen más lento, alterando el sabor. La temperatura ideal para la fermentación es de entre 20-27°C.
- Oxígeno: el flujo de aire es necesario para facilitar el proceso de fermentación. Se aconseja fermentar el kombucha en un recipiente con una tapa de tela permeable.
- Área de superficie del líquido: cuanto mayor es la superficie del líquido, más espacio tienen las moléculas para agitarse y, por lo tanto, más rápido se produce la fermentación. Lo ideal sería una superficie de 5-8 cm.

Lo ideal es conseguir una fermentación gradual y controlada para evitar que el kombucha tenga un sabor muy avinagrado. ¡Cogerle el truco requiere mucha práctica! Productos que resultan del proceso de fermentación del Kombucha incluyen: ácido glucónico, ácido acético y fructosa.

#### **1.6. Procesos de fermentación**

Hay que recalcar que todavía no se han efectuado cambios redox, puesto que las tres reacciones se realizan sin ninguna transferencia de electrones, aunque se han empleado dos enlaces fosfato de altas energías provenientes del ATP. La primera reacción de oxidación tiene lugar en la conversión del gliceraldehído-3-fosfato en ácido 1,3- difosfoglicerido, (Brado, Patrick, 2017 pág. 47).

En esta reacción la coenzima NAD acepta dos electrones y se convierte en NADH, mientras que el fosfato inorgánico se convierte en forma orgánica (químicamente se dice que el fosfato ha sido esterificado) constituyendo de esta manera base de la fosforilación del sustrato y la formación del ATP, como reacción más importante en los organismos vivos, (Dufresne, 2010 pág. 78)

En la fermentación completa se emplea dos moléculas de ATP para fosforilación del azúcar y se sintetiza cuatro moléculas de ATP (dos por cada fragmento de tres carbonos). con que la ganancia neta es dos moléculas de ATP por moléculas de glucosa fermentada. Puesto que el valor energético de un enlace de alta energía de ATP es de cerca de 7,4 kcal/mol y se liberan 57 kcal de energía por molécula de glucosa, durante la fermentación alcohólica; cerca del 26% de la energía liberada durante la oxidación de glucosa se mantiene en enlaces de alta energía de ATP (14.8kcal en dos mol de ATP) y el resto se pierde en forma de calor, (Fontana, 2011 pág. 81).

Las reacciones que van de glucosa al piruvato que se acaban de describir se presentan en gran variedad de microorganismos, pero el piruvato producido puede procesarse todavía más y de

diferentes formas, muchas bacterias, así como animales superiores, efectúan la reducción piruvato+ NAD-ácido láctico +NAD, sirviendo el piruvato como el último receptor de electrones para formar el producto final, el ácido láctico en lugar del alcohol y CO<sub>2</sub>, (Stevens, 2002 pág. 79).

### ***1.6.1. Fermentación alcohólica***

Es un proceso biológico en plena ausencia de aire (oxígeno - O<sub>2</sub>), llamado también proceso anaeróbico originado por la actividad de algunos microorganismos unicelulares (levaduras), que procesan los hidratos de carbono (azúcares ) como puede ser glucosa, fructosa, sacarosa y almidón para obtener como producto final alcohol en forma de etanol (cuya fórmula química es: CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-OH), dióxido de carbono, en forma de gas y unas moléculas de ATP que consumen los propios microorganismos, en su -metabolismo celular energético anaeróbico, (Calonge, 2003 pág. 69)

El etanol resultante se emplea en la elaboración de algunas bebidas alcohólicas, tales como el vino, cerveza y sidra. La fermentación acética corresponde a la fermentación del etano~ para convertirse en ácido acético, provocado por bacterias comúnmente se presenta en vinos cuando éste se agria. La fermentación alcohólica tiene como objetivo proporcionar energía anaeróbica a los microorganismos unicelulares (levaduras) en ausencia de oxígeno a partir de la glucosa, (Sreeramulu, 2014 pág. 50).

### ***1.6.2. Fermentación de la glucosa***

Cuando la glucosa se degrada, por vía del glucolisis en condiciones anaeróbicas no se produce una oxidación o una reducción total del sustrato. Se afirma entonces que la reacción de fermentación está "equilibrada". La energía libre requerida para la formación de ATP se obtiene a partir de las reacciones de transferencia de electrones favorables, ocurriendo la degradación pasando por tres momentos, (Rodríguez, 2017 pág. 91):

- Primero ocurre la reacción de arreglo preparatorio de degradación formando al compuesto intermediario gliceraldehido-3-fosfato; sin oxido- reducción.
- Se produce la energía para los enlaces de fosfato en forma de ATP y la producción de piruvato.
- El proceso de la reacción de óxido-reducción manifestándose la fermentación con la producción de etanol y liberación de CO<sub>2</sub>. La vía bioquímica del piruvato se denomina

glucólisis y algunas veces recibe el nombre de Embden Meyerhof en honor a sus descubridores.

### ***1.6.3. Fermentación acética***

La fermentación acética es uno de los tres tipos principales de fermentación que son capaces de llevar a cabo las bacterias y otros organismos, concretamente la fermentación acética es aquella que llevan a cabo las bacterias del grupo *Acetobacter*, Estas bacterias son las encargadas de la producción mundial de vinagre, puesto que el ácido acético es la característica principal de este condimento, (Gomez, 2017 pág. 2).

Estrictamente hablando la fermentación acética no es una fermentación, sino que metabólicamente es una oxidación y las fermentaciones, tanto la alcohólica como la láctica, se caracterizan por llevarse a cabo en condiciones de anabolía o al menos de baja presión parcial de oxígeno. El sustrato de la fermentación acética es el alcohol etílico, presente en el vino o la sidra, (Gomez, 2017 pág. 32).

Sin embargo, también se encuentra de forma natural en frutas y flores, que emplean la volatilidad de este compuesto para atraer a sus polinizadores o dispersores del fruto. La transformación del alcohol etílico en ácido acético se lleva a cabo en la bacteria mediante una cadena de 3 enzimas. Estequiométricamente hablando estas bacterias son capaces de producir un mol de ácido acético por cada mol de etanol presente en el medio, por lo que su eficiencia es enorme, (Fontana, 2011 pág. 61).

El primer enzima, llamado alcohol deshidrogenasa tiene como sustrato el alcohol etílico y lo transforma en acetaldehído. Durante este paso del metabolismo del etanol se elimina un hidrógeno del etanol que pasa a reducir al NAD, una molécula de almacenamiento de energía. De esta manera el alcohol, al perder un hidrógeno se oxida, es decir, el balance oxígeno/ hidrógeno de la molécula tiende al oxígeno. En este proceso el NAD queda reducido a NADH. Este paso supone una “vuelta atrás” pues el paso de acetaldehído a etanol forma parte de la fermentación etílica que llevan a cabo otras bacterias, (Greenwalt, 2010 pág. 11).

En el segundo paso del metabolismo el acetaldehído es hidratado. Para ello la bacteria emplea una molécula de agua H<sub>2</sub>O. Convirtiendo el acetaldehído en acetaldehído hidrato. Finalmente el tercer paso para la obtención de ácido acético es una segunda oxidación ésta se lleva a cabo mediante la enzima acetaldehído deshidrogenasa que libera otra molécula de hidrógeno que será captada por otro NAD y producirá una molécula de ácido acético, (Bellozo, 2013 pág. 67).

El oxígeno, que hemos dicho que era esencial para que las bacterias llevaran a cabo la fermentación del etanol. Las moléculas de NADH que se han formado en el primer y tercer paso de este proceso irán a la respiración celular, que es necesaria para el crecimiento de la célula. Para la degradación de estas moléculas, para obtener la energía que almacenan, la bacteria las oxidará, mediante el uso del oxígeno. Sin el oxígeno las moléculas quedarían en su forma reducida NADH y la transformación del etanol no podría llevarse a cabo. Puedes leer más sobre las reacciones REDOX, que es como se denominan las reacciones de reducción y oxidación (Carminiano, 2019 pág. 45).

## **1.7. Generalidades del té de kombucha**

Los estudios realizados han demostrado que la Kombucha elaborada con té negro produce altas concentraciones de ácidos glucónico, láctico y acético, por lo que la descomposición de la glucosa en él se realiza de un modo mucho más efectivo que en otros sustratos. Además de conferir al producto final su sabor particular y sus cualidades medicinales; el té es una importante fuente de nutrientes minerales para el cultivo, (Jaramillo, 2016 pág. 46).

Uno de los factores que diferencian la fermentación del té de las otras hierbas o extractos frutales es su elevado contenido en taninos. Los taninos llamados también polifenoles son moléculas grandes y complejas cuyos efectos sobre las membranas mucosas del cuerpo son astringentes y condensantes, además poseen cualidades bactericidas. Los taninos del té inhiben parcialmente el proceso de fermentación, por esta razón el contenido final de alcohol en la bebida es tan bajo. Los tés de hierbas suelen contener una cantidad mayor de aceites volátiles (aceites esenciales) lo cual interfiere con las bacterias del Kombucha, dando como resultado final una bebida de baja calidad, (Palate, 2009 pág. 78).

### **1.7.1. Composición química del té**

Contiene polifenoles, flavonoides (*teoflavinas* y *teorubiginas*), catequinas, cafeína, los galatos de la catequina, adenina, teobromina, teofilina, ácidos gálicos, taninos, galotatinos, pequeñas cantidades de aminofilina y un aceite amarillo volátil que es sólido a las temperaturas ordinarias y tiene un fuerte olor y sabor aromático. La actividad antioxidante depende de la estructura de los radicales libres en los compuestos, de los sustituyentes presentes en los anillos de los flavonoides y del grado de polimerización, (Dufresne, 2010 pág. 72).

Su origen se remonta a la mitología japonesa, acreditado por el Santo Budista Chino Bodhidharma, meditando durante nueve años frente a una pared. Tiempo que condujo al Santo a

quedar profundamente dormido luego de despertar se disgustó por haberse quedado dormido este disgusto hizo que se corte sus párpados, para de esta manera asegurarse, a no quedarse dormido nuevamente durante sus meditaciones. De sus párpados caídos al suelo crecieron plantas cuyas hojas inmersas en agua caliente producen tibia bebida que combate el sueño, (Sreeramulu, 2014 pág. 71).

### ***1.7.2. Propiedades del té de Kombucha***

El té fermentado a base de *Medusomyces gisevi* (Kombucha), está compuesto por dos porciones: una película celulosa flotante y el caldo agrio. En su composición a más de los compuestos citados anteriormente, también contiene varios compuestos nitrogenados, como los aminoácidos, proteínas; los alcaloides (cafeína, teofilina y teobromina), (Rubio, 2007 pág. 71).

La kombucha es una de las bebidas exóticas de moda. Se trata de un té azucarado que se obtiene tras la fermentación de una colonia microbiana que se conoce comúnmente como “hongo de la inmortalidad”. Así, ha adquirido cierta fama como jugo curativo, aunque realmente no existe una fuerte base científica real que apoye la mayoría de beneficios que se le atribuyen, (Palate, 2009 pág. 23).

La composición microbiana y nutritiva puede variar dependiendo del sustrato, de los cultivos y del lugar donde se elabora ya que es totalmente casero. Los efectos beneficios del té de Kombucha se hablan en base a los polifenoles presentes en el té, a los ácidos glucónico, glucorónico y láctico, vitaminas, aminoácidos, compuestos con actividad antibiótica, y a una variedad de micronutrientes producidos durante la fermentación, (Bellozo, 2013 pág. 32).

Un cultivo sano y vigoroso de *Manchurian fungus* repercute en la calidad de la bebida y su efectividad. Si el té de Kombucha se fermenta correctamente a fondo, se pueden obtener (Calvo, 2013 pág. 48):

- Aminoácidos: relacionados con el equilibrio de piel, pelo, cartílagos, articulaciones y del humor vítreo de los ojos. Son sintetizados por nuestro organismo, entre ellos tenemos: lisina, alanina, tirosina, valina, fenilalanina, leucina, isoleucina, serina y treonina.
- Enzimas: entre ellas amilasa, invertasa y lactasa con importantes funciones digestivas como descomponer grandes moléculas en otras más pequeñas de fácil asimilación.
- Ácidos: acético, carbónico, glucorónico, fólico, glucónico, aspártico, glutámico, y láctico.

- El ácido glucónico: es producido por una gran variedad de bacterias y hongos a partir de la glucosa mediante oxidación y sirve para preservar los alimentos.

### **1.8. Productos de la fermentación del *Medusomyces Gisevi* (kombucha)**

Entre los metabolitos secundarios presentes en la Kombucha como resultado de procesos metabólicos, bioquímicos y químicos originados durante su cultivo tenemos: ácido acético, ácido fólico, ácido carbónico, ácido glucorónico, ácido glucónico, ácido L-láctico, ácido úsnico. También se encuentran presentes las vitaminas del complejo B (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>), vitamina C entre otras, enzimas, una sustancia anticoagulante denominada Heparina y distintos oligoelementos en concentraciones trazas, (Greenwalt, 2010 pág. 15).

Una solución diluida de alcohol suministrada con inóculo viable de *Acetobacter sp.*, y mantenida en un lugar cálido y aireado se hará vinagre. Este principio utiliza la industria, para la preparación de vinagre; probablemente la primera producción de vinagre fue consecuencia de errores en la fomentación, durante el proceso de elaboración de vino. Si el mosto se fermenta a temperatura demasiado alta *Acetobacter sp.*, dominará a la levadura (*Saccharomyces sp.*) presente naturalmente en las uvas (*Vitis vinifera*), (Sreeramulu, 2014 pág. 56).

La mayor parte del vinagre hoy en día es hecho en cultivo de tanque sumergido, descrito por primera vez en 1949 por Otto Hromatka y Heinrich Ebner. En este método el alcohol se fermenta a vinagre, en tanque agitado continuamente se suministra oxígeno burbujeando aire a través de la solución. Usando aplicaciones modernas de este método se puede preparar vinagre de 15% ácido acético en sólo 24 horas en un proceso por lotes, incluso de 20% en 60 horas, (Rodríguez, 2011 pág. 59)

#### **1.8.1. Ácido glucorónico**

Considerado por varios autores como el agente terapéutico principal en la Kombucha, ya que desintoxica el hígado. La Kombucha ayuda al hígado a producir ácido glucorónico que es segregado normalmente cuando está sano. Es utilizado para envolver toxinas ajenas y las provenientes de las funciones corporales, una vez sujetas por el ácido glucorónico, las toxinas pueden eliminarse del cuerpo y no se reabsorben nuevamente en su trayecto hasta ser excretadas, (O'Brien, 2003 pág. 112).

El ácido glucorónico es importante para la construcción de sustancias básicas del cuerpo como la membrana mucosa del estómago, los cartílagos y el humor vítreo del ojo. Además, está implicado en la formación de la heparina, sustancia que impide la coagulación sanguínea. Durante el proceso de fermentación, en la conversión de los azúcares las levaduras consumen oxígeno y producen dióxido de carbono que al diluirse en el líquido se transforma en ácido carbónico, (Calonge, 2003 pág. 78).

(Rodríguez, 2017, pp. 39-63), estudia que el producto final contiene baja cantidad de alcohol entre 0,3 a 0,7%, como en una cerveza sin alcohol con una pequeña cantidad de azúcares no transformados. La presencia de cafeína en el fermento oscila entre 3 y 6 mg por litro dependiendo del té utilizado y las condiciones de fermentación. Si se desea un Kombucha con bajo contenido de cafeína, es absolutamente aceptable hacerlo con té descafeinado o usar té verde, (Brado, Patrick, 2017 pág. 60).

### **1.8.2. Sustancias bioquímicas de kombucha**

Es un producto compuesto por levaduras y bacterias que después del proceso de fermentación y oxidación, el hongo lleva a cabo diferentes reacciones complicadas en la sedimentación del té, el hongo del té se alimenta de azúcar a cambio produce otras sustancias valiosas que cambian dentro de la bebida: vitaminas aminoácidos, sustancias antibióticas, ácido glucurónico, ácido acético y otros no determinados por lo tanto el té de hongo es una fábrica bioquímica real. El té de kombucha es uno de los productos de la fermentación caseros que contienen organismos vivos activos capaces de regenerar la microbiota amiga en el organismo, (Bellozo, 2013 pág. 3).

### **1.9. Té verde**

Las hojas de té contienen sales minerales, especialmente vitamina A, C, E y selenio; vitamina B-2, ácido fólico, calcio, cromo, magnesio, manganeso, hierro, cinc, fósforo, potasio, aluminio y flúor. Contiene de 2 a 4% de alcaloides de los cuales los más abundantes son la cafeína y la teofilina. Contiene un 3% en compuestos polifenólicos que son de tres tipos: flavonoides, cateoles y taninos (Jacome, 2018).

Una hoja de té verde contiene un 77% de agua y un 23% de materiales sólidos. De estos últimos, aproximadamente un tercio está constituido por componentes solubles en el agua; como los aminoácidos, los polifenoles (incluyen las catequinas), los polisacáridos y la vitamina C. Las otras dos terceras partes constan de componentes insolubles, como las fibras, la celulosa, la vitamina E y los carotenos.



Cada componente tiene sus propias cualidades y algunos, particularmente las catequinas causantes de la astringencia del té, tienen muchos otros beneficios. Ciertos nutrientes que no se extraen durante la infusión, se pueden obtener cuando utilizamos el té como ingrediente de cocina o en el matcha. Al comer las hojas enteras o molidas, las digerimos y extraemos más cantidad de nutrientes, los componentes del té verde son (Jacome, 2018 pág. 45).

- **Catequinas:** Las catequinas son las responsables de la astringencia en el té, más comúnmente llamadas "taninos". Están relacionadas con los flavonoides, tienen funciones antibacterianas y antioxidantes y son eficaces para reducir la oxidación, inhibir la propagación del cáncer y los tumores y reducir los niveles de colesterol en la sangre. También juegan un papel importante en la estabilización de la presión arterial, el azúcar en la sangre y la resistencia vírica.
- Las infusiones de té verde contienen aminoácidos entre sus componentes, los que más se destacan son la valina, arginina, niacina, teanina e histidina, estas dos últimas con interesantes propiedades para mejorar el funcionamiento del aparato circulatorio. Además, al fluidificar la sangre, ayudan a prevenir la aparición de trombosis.
- **Polisacáridos:** Son eficaces reduciendo y regulando el azúcar en la sangre y el Fluoruro: protege el esmalte de los dientes y previene las caries.
- **Vitamina B, C y E:** La vitamina B nos ayuda en la regulación del metabolismo de la sacarina, la C. Sus efectos incluyen la disminución del estrés y la construcción de resistencia a las infecciones leves como resfriados, y la vitamina E Sus efectos incluyen una acción antioxidante que retarda el proceso de envejecimiento.
- **Ácido Aminobutírico:** Protege contra la hipertensión, y los Flavonoides cuyos efectos incluyen el fortalecimiento de las paredes de los vasos sanguíneos y la halitosis prevaleciente.
- **Teanina:** Es uno de los varios aminoácidos que se encuentran en las hojas del té verde y es responsables del aroma y del sabor distintivos del té japonés.
- **Alcaloides,** siendo los más importantes, debido a su concentración, la cafeína y la teína. Estas sustancias son altamente estimulantes, por lo que la ingesta en dosis elevadas de té verde puede provocar efectos secundarios.

### **1.10. Canela**

La canela pertenece a la familia de las Lauráceas, misma a la que pertenece el laurel y alcanfor. Son las ramas de unos arbustos que pueden llegar a medir hasta 15 metros llamados zeylanicum y el *Cinnamomum verum* que al secarse y sin corteza forman unos tubitos que desprenden un aroma muy agradable. Su nombre proviene de la palabra italiana cannelle que significa cañitos, (Vittorio, 2008. pág. 32).

Los arbustos zeylanicum y del verum son originarios de Sri Lanka un lugar de clima cálido, ideal para su crecimiento. En la actualidad los países productores de Canela son Indonesia, China, India, Java, Madagascar, Las Islas Seychelles e Islas Mauricio, Birmania, Malasia, Brasil, Antillas, Guayana, siendo por supuesto el mayor productor su lugar de origen. Ese olor tan característico de la canela se obtiene al golpear la corteza, con ello se consigue extraer un polvo marrón-amarillento que conforme pasa el tiempo se va oscureciendo (Lozano, 2018 pág. 23).

Por su apariencia parecería que la canela no aporta ningún beneficio para la salud, sin embargo, sus componentes dicen todo lo contrario, ya que en su corteza podrás encontrar fibras, minerales como el manganeso, vitamina Tiamina, niacina, mucílagos, hierro, potasio, sodio, ácidos, aceite esencial, taninos, vainilla, calcio y fósforo. Tiene un alto contenido en antioxidantes y polifenoles. Por todo ello es que tiene gran uso en el área medicinal. En la corteza de este tronco de casi 15 metros podrás encontrar fibras, minerales como el manganeso, vitamina C, tiamina, niacina, mucílagos, hierro, potasio, sodio, ácidos, aceite esencial, taninos, vainilla, calcio y fósforo. Tiene un alto contenido en antioxidantes y polifenoles, (Martínez, 2009 pág. 76).

### **1.11. Café**

Es un producto de origen vegetal que presenta una serie de componentes similares a otros encontrados en frutas y verduras, en el cacao o en el té. El principio activo que más se ha estudiado es la cafeína, pero al margen de ella, la presencia en el café de otras muchas sustancias del tipo minerales, antioxidantes y fibra hacen que, dependiendo de las cantidades consumidas y de su regularidad, el café pueda llegar a ser considerado un “alimento funcional” (Calvo, 2013 pág. 32).

Los alimentos funcionales se suelen consumir dentro de la dieta normal, pero presentan algún componente biológicamente activo que aporta beneficios para la salud y reduce los riesgos de enfermedades. Se ha descubierto que en muchos alimentos tradicionales como frutas, verduras, etc., existen estos componentes beneficiosos, que en ocasiones son añadidos a los alimentos a los que se les enriquece o fortifica, (Gomez, 2017 pág. 81).

Algunos ejemplos de estas sustancias con carácter antioxidante y prebiótico están incluidos de forma natural en el café y los estudios epidemiológicos indican que esta bebida puede prevenir muchas enfermedades, por lo que se ajusta a la definición misma de “alimento funcional”, (Jacome, 2018 pág. 32).

En la actualidad se tiene interés por conocer efectos beneficiosos y/o perjudiciales de otros compuestos diferentes a la cafeína que también abundan en el café. A continuación, se describen algunos de los principios activos de esta bebida y se resumen los estudios que se han efectuado con ellos, (Lozano, 2018 pág. 54).

El café está compuesto por más de 1.000 sustancias químicas distintas, incluyendo aminoácidos y otros compuestos nitrogenados, polisacáridos, azúcares, triglicéridos, ácido linoleico, diterpenos (cafestol y kahweol), ácidos volátiles (fórmico y acético) y no volátiles (láctico, tartárico, pirúvico, cítrico), compuestos fenólicos (ácido clorogénico), cafeína, sustancias volátiles (sobre 800 identificadas de las cuales 60-80 contribuyen al aroma del café), vitaminas y minerales, (Stevens, 2002 pág. 21).

Otros constituyentes como las melanoidinas derivan de las reacciones de pardeamiento no enzimático o de la caramelización de carbohidratos que ocurren durante el tostado. Existen variaciones importantes en la concentración de estos componentes según la variedad de café y el grado de tostado, (Solarte, 2015 pág. 43).

También están presentes en el café algunas vitaminas, sin embargo, aunque en el grano verde de café se encuentren las de tipo B1, B2, B5, Vitamina C e incluso E, se pierden casi todas en el tostado. Por el contrario, el niacina que no ofrece el café en crudo se obtiene a partir de una molécula parecida llamada “trigonelina” cuando el grano se calienta hasta 200 grados durante el tostado. Las RDA (Recommended Dietary Allowances) de Niacina en adultos son de 16 mg/día y cada taza de café cubre entre un 6 y un 18% de ellas, (Lozano, 2018 pág. 54).

En el café se van descubriendo nuevas sustancias que se analizan y estudian por sus posibles efectos antioxidantes y anti-inflamatorios entre otros. Sin embargo, los resultados de valorar sus componentes aislados no son los mismos de los obtenidos cuando se consumen de manera conjunta en una taza de café. Se considera que existen sinergias que permiten que, aunque su presencia sea cuantitativamente pequeña a nivel individual, los resultados de consumirlos juntos sean notables, ,(Solarte, 2015 pág. 43).

## CAPITULO II

### 2. MARCO METODOLOGICO

#### 2.1. Localización y duración del experimento

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Pecuarias perteneciente a la Escuela Superior politécnica de Chimborazo, ubicada en la Av. Panamericana Sur km 1 ½, en la ciudad de Riobamba, provincia de Chimborazo, Ecuador, las condiciones experimentales del lugar donde se ejecutó la investigación se muestran en la tabla 2-2. La duración de esta investigación fue de 60 días.

**Tabla 2-2:** Condiciones Meteorológicas del Cantón Riobamba

<b>Parámetros</b>	<b>Valores Promedios</b>
	<b>Año 2018</b>
Altitud, msm.	2680
Temperatura , °C	12
Precipitación, mm/mes.	421
Humedad relativa, %.	61

**Fuente:** Estación Agrometeorológica de la Facultad de Recursos Naturales de la ESPOCH (2019)

#### 2.2. Unidades experimentales

En la presente investigación se estudió las propiedades físico-químicas y sensoriales del té de Kombucha por lo que las unidades experimentales constituyeron 250 ml de cada muestra por tipo de sustrato utilizado (café, canela y té verde). Estas muestras fueron realizadas de acuerdo a lo establecido en la norma técnica para evaluar la calidad y como difiere de acuerdo al tratamiento que se probó para lograr así demostrar las hipótesis planteadas.

## **2.3. Materiales, equipos e insumos**

### **2.3.1. *Materiales***

- Probeta de 1000 mL
- Vaso de precipitación 1000 mL
- Pipetas de 1, 5 y 10 mL.
- Micro pipetas
- Mechero de bunsen
- Frascos de vidrio de 250 mL.
- Tubos de ensayo
- Puntas de micro pipetas de 100 mL
- Gradilla para tubos
- Guantes
- Mascarilla
- Mandil
- Marcador
- Canasta
- Ollas

- Etiquetas
- Cuaderno
- Cooler
- Recipientes de diferentes dimensiones
- Tapas
- Aza de Digrafsky

### **2.3.2. Equipos**

- Balanza analítica
- Varillas de agitación
- Frascos termo resistentes
- Cuenta colonias
- Equipo de titulación
- pH-metro
- Brixómetro
- Alcoholímetro
- Pipeta automática de 200 mL
- Computador
- Autoclave
- Estufa
- Refrigerador

- Cámara de flujo laminar
- Ligas de caucho
- Cajas Petri
- Agitador Magnético

### **2.3.3. Insumos**

- Alcohol antiséptico
- Fenolftaleína
- NaOH 0,1N
- Solución buffer, de pH 7,00.
- Agua destilada
- Té verde
- Café
- Canela
- Agar Sabouraud Dextrose Agar (SDA)
- Agar Acetobacter Aceti
- Gentamicina (Antibiótico).
- Inóculo (Kombucha madre)
- Azúcar blanca (sacarosa)

### **2.4. Tratamiento y diseño experimental**

Las unidades experimentales fueron modeladas bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA), en arreglo bifactorial considerándose tres tratamientos con 3 repeticiones, cada uno que se ajustó al siguiente modelo lineal aditivo.

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha_i * \beta_j + \epsilon_{ij}$$

Dónde

$Y_{ij}$  = Valor del parámetro en determinación.

$\mu$  = Efecto de la media por observación.

$\alpha_i$  = Efecto del tipo de bacteria

$\beta_j$  = Efecto de los sustratos

$\alpha_i * \beta_j$  = Efecto de la interacción del tipo de bacteria por tipo de sustrato

$\epsilon_{ij}$  = Efecto del error experimental.

En la tabla 3-2 se describe la nomenclatura que se escogió para identificar cada uno de los tratamientos en los que se dividió la investigación.

**Tabla 3-2:** Nomenclatura elegida para determinar el nombre para los tratamientos de la investigación.

Factor A	Factor B	
Tipo de bacterias	Tipo de sustrato utilizado	Código
<i>Acetobacter Aceti</i>	Canela	TAcanela
<i>Acetobacter Aceti</i>	Café	TAcafé
<i>Acetobacter Aceti</i>	Té verde	TAtéverde
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Canela	TSccanela
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Café	TSccafé
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Té verde	TSctéverde

Elaborado por: RICAURTE, Andrés. 2020.

En la tabla 4-2, se describe el esquema del experimento que se utilizó para comprobar las hipótesis de la presente investigación.



**Tabla 4-2:** Esquema del experimento

<b>Factor A</b>	<b>Factor B</b>	<b>Código</b>	<b>Repetición</b>	<b>TUE</b>	<b>Rep/trat</b>
<i>Acetobacter Aceti</i>	Canela	TAcanela	3	250 mL	3
<i>Acetobacter Aceti</i>	Café	TAcafé	3	250 mL	3
<i>Acetobacter Aceti</i>	Té Verde	TAtéverde	3	250 mL	3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Canela	TSccanela	3	250 mL	3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Café	TSccafé	3	250 mL	3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Té Verde	TSctéverde	3	250 mL	3
TOTAL		6	18		18

Elaborado por: RICAURTE, Andrés 2020.

## **2.5. Mediciones experimentales**

Las mediciones experimentales que se consideraron en esta investigación fueron:

### **2.5.1. Características físico-químicas de la materia prima (té, café y canela)**

- pH.
- Acidez
- Hidratos de carbono
- Azúcares

### **2.5.2. Características físico-químicas de los sustratos**

- pH
- Acidez
- Grados Bríx

### 2.5.3. Características físico-químicas del producto

- pH 0,24,48,72,96 y 120 horas
- Acidez 0,24,48,72,96 y 120 horas
- Contenido de alcohol 0,24,48,72,96 y 120 horas

### 2.5.4. Determinación de la viabilidad microbiológica del inóculo en el tiempo

- *Acetobacter aceti*
- *Saccharomyces cerevisiae*

### 2.6. Análisis estadísticos y pruebas de significancia

- Análisis de varianza para determinar la variabilidad ( $P < 0.05$ )
- Comparación de medias por Tukey al 5%.

Para determinar la varianza de la presente investigación se utilizará el siguiente esquema que se muestra en la tabla 5-2.

**Tabla 5-2:** Esquema del análisis de la varianza.

Fuente de variación	Grados de Libertad
Total	17
Factor A	1
Factor B	2
Interacción A*B	2
Error	12

Elaborado por: RICAURTE, Sebastián. 2019

## 2.7. Procedimiento experimental

Para determinar la viabilidad del uso de *Acetobacter aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* fue necesario dividir el procedimiento experimental en dos partes; la primera fue la elaboración del té Kombucha y la segunda la evaluación de las características físico químicas y microbiológicas de la bebida obtenida, en las etapas subsiguientes se mostraron las técnicas necesarias para realizar la presente investigación.

- Primero se realizó la recepción del hongo kombucha (solución madre del inóculo), el cual fue donado por un tesista de la Carrera de Ingeniería en Industrias Pecuarias, este inóculo tenía un tiempo de fermentación de 30 días, en donde al realizar el análisis microbiológico inicial de las especies en estudio, arrojó un resultado para *Saccharomyces cerevisiae* (ausente) y para el caso de *Acetobacter aceti* (incontable), todos los análisis respectivos se desarrollaron en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la ESPOCH.
- Para la preparación de cada uno de los sustratos se utilizó: 1.5 L de agua, 160 gr de azúcar blanca y 16.2 gr de cada planta utilizada; luego se llevó el agua a ebullición, y se añadió el azúcar blanco y se revolvió para disolver completamente, después de este proceso se añadió la planta té verde, para el tratamiento T1 café para el tratamiento T2 y canela para el tratamiento T3
- Luego se retiró del fuego y se dejó reposar por un lapso de 15 minutos, pasado este tiempo se eliminó las plantas y se dejó reposar hasta que se enfríe a temperatura ambiente.
- A continuación, se procedió a realizar la siembra del hongo en los diferentes sustratos, para este caso se utilizó 20 mL de inóculo inicial en 250 mL de sustrato (3 repeticiones), se mezcló y se tapa con una malla para evitar que ingresen agentes patógenos y de esta forma dar la oxigenación necesaria para el desarrollo del hongo.
- A continuación, se realizó los análisis microbiológicos a las 0, 24, 48, 73. 96 y 120 horas, realizando la preparación de los medios de cultivo, para el caso *Saccharomyces cerevisiae* utilizamos el agar SDA (Sabouraud Dextrose Agar), al cual una vez preparado se utilizó la cantidad de antibiótico recomendada por la misma empresa que fue de 0.4 mL de Gentamicina/ L de preparación, en donde se dio el crecimiento de esta levadura y se inhibió el crecimiento de otro tipo de microorganismo.

- Cabe recalcar que esta incubación se realizó en un ambiente anaeróbico; para el caso del *Acetobacter acetii* se empleó la cantidad recomendada por la empresa fabricante del agar adquirido y la incubación en un ambiente aeróbico (utilizando una relación de 10 mL de agar por cada placa, aplica para los dos casos).
- Los diferentes fabricantes recomiendan que se debe realizar el conteo de los microorganismos a las 72 horas después de realizada la siembra, esto aplica en el caso del análisis de los dos microorganismos.

## 2.8. Metodología de evaluación

### 2.8.1. Caracterización de la bebida

#### 2.8.1.1. Medición del pH

La Kombucha, conocida también como hongo manchuriano u hongo chino es un tipo de bebida fermentada que se obtiene a base de té endulzado y fermentado gracias a una colonia de microorganismos conocidos como *Medusomyces Gisevi*. El pH es la unidad de medida que describe el grado de acidez o alcalinidad, las informaciones cuantitativas dadas por el valor del pH expresan el grado de acidez de un ácido o de una base en términos de la actividad de los iones de hidrógeno. La escala de pH va de 0 a 14 y la neutralidad está en pH = 7. Las sustancias de pH < 7 se comportan como ácido y las sustancias de pH > 7 poseen naturaleza básica.

El pH fue un Indicativo de acidez o alcalinidad de una solución acuosa. Se define como el logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno en moles por litro. El valor de pH es de 1 a 14, que indica la concentración de iones hidrógeno presentes en una solución acuosa. En vista de que no existe normativa para la elaboración y análisis bromatológico de la Kombucha y para realizar este ensayo se hizo uso de norma NTE INEN 2 325:2002. Determinación de pH en bebidas alcohólicas. El método consiste en una determinación potenciométrica del pH en una muestra de Kombucha previamente desgasificada y atemperada de 20°C a 25°C.

**Tabla 6-2:** Determinación del pH

Materiales y Equipos	Reactivos
<b>Equipos</b> Potenciómetro con sus respectivos electrodos. Vaso de precipitación de 250 cm <sup>3</sup> Agitador.	Solución buffer, de pH 4,00. Solución buffer, de pH 7,00.

Termómetro.	
<b>Procedimiento</b>	
<p><b>Preparación de la muestra.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Desgasificar la cerveza mediante agitación constante, manteniendo la temperatura de la cerveza entre 20°C y 25°C y filtrarla a través de papel filtro.</li> <li>• Calibración mantener los electrodos del potenciómetro inmersos en una solución</li> <li>• Verificar el cero y ajustar si es necesario.</li> <li>• Lavar los electrodos con agua destilada y secar con papel absorbente.</li> <li>• Sumergir los electrodos en la solución Buffer de pH 7,0.</li> <li>• Remover los electrodos lavar y secar.</li> </ul> <p><b>DESCRIPTORES:</b> Bebidas espirituosas, alcoholes, fermentación, bebida alcohólica, bebida, cerveza, método, ensayo, pH</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sumergir los electrodos en la solución Buffer de pH 4,0.</li> <li>• Hacer la corrección a pH 4,0 si es necesario</li> <li>• a determinación debe efectuarse por duplicado sobre la misma muestra preparada.</li> <li>• Colocar en el vaso de precipitación aproximadamente 100 cm<sup>3</sup> de muestra de cerveza desgasificada</li> <li>• y temperatura de ensayo.</li> <li>• Determinar el pH de la cerveza introduciendo los electrodos del medidor de pH en el vaso de</li> <li>• precipitación con la muestra, cuidando que no toquen las paredes del recipiente.</li> <li>• Agitar y leer el valor del pH obtenido a 0,01 .</li> </ul> <p><b>Errores del método</b> La diferencia entre los resultados de las determinaciones efectuadas por duplicado no debe exceder de 0,05 unidades de pH; en caso contrario, se debe repetir la determinación.</p> <p><b>Informe de resultados</b> En el informe de resultados debe indicarse:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• La media aritmética de los resultados de la determinación.</li> <li>• Nombre del producto.</li> <li>• Identificación del lote</li> <li>• Tipo y número de la muestra. NTE INEN de referencia.</li> <li>• Fecha de muestreo y ensayo.</li> <li>• Debe mencionarse además cualquier condición no especificada en esta norma o considerada como opcional, así como cualquier circunstancia que pueda haber influido sobre el resultado. Deben incluirse todos los detalles para la completa identificación de la muestra.</li> </ul>	

Fuente:(INEN, 2014)

### 2.8.1.2. Medición de los grados Bríx

Los grados Bríx son una unidad de cantidad (símbolo °Bx) y sirvieron para determinar el cociente total de materia seca (generalmente azúcares) disuelta en un líquido. Una solución de 25 °Bx contiene 25 g de sólido disuelto por 100 g de disolución total. Los grados Bríx se cuantificaron con un refractómetro, detectores de horquillas vibratorias o con un caudalímetro másico. La escala Bríx fue un refinamiento de las tablas de la escala Balling, desarrollada ésta por el químico alemán Karl Balling. La escala Plato, que mide los grados Plato, también parte de la escala Balling. Se utilizaron las tres, a menudo alternativamente. Sus diferencias son de importancia menor. La escala Bríx se usa, sobre todo, en fabricación de zumos (jugos), de vinos de frutas y de azúcar a base de caña. La escala Plato se utiliza, sobre todo, en la elaboración de cerveza. La escala Balling es obsoleta, pero todavía aparece en los sacarímetros más viejos y se usa en las vinerías de Sudáfrica y en algunas cervecerías.

<b>Materiales</b>	<b>Reactivos</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Refractómetro</li> <li>• Piseta.</li> <li>• Vaso de precipitación.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solución tampón de pH4, pH7 y pH9.</li> <li>• Agua destilada.</li> </ul>
<b>Procedimiento</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Efectuar la determinación por duplicado sobre la muestra.</li> <li>• Lavar los electrodos del refractómetro con agua destilada y calibrar el aparato a la temperatura de la muestra, utilizando una solución de referencia cuyos grados Bríx sean similar al esperado para la muestra. En todo caso, deberán seguirse las instrucciones del fabricante.</li> <li>• Colocar la muestra sobre el cristal del refractómetro y efectuar la determinación de los grados Bríx.</li> </ul>	
<b>Cálculos</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Como resultado final, debe reportarse la media aritmética de los resultados de la determinación, en unidades de grados Bríx hasta la primera cifra decimal.</li> <li>• Debe indicarse la temperatura a la que se realizó la determinación.</li> <li>• En el informe de resultados, debe mencionarse, además, cualquier condición no especificada en esta norma, o considerada como opcional, así como cualquier circunstancia que pueda haber influido sobre el resultado.</li> <li>• Deben incluirse todos los datos necesarios para la completa identificación de la muestra.</li> </ul>	

**Tabla 7-2:** Determinación del contenido de grados Bríx por el método del refractómetro

Fuente: (INEN, 2014).

### 2.8.1.3. Determinación del contenido de Coliformes fecales

Debido a que un gran número de enfermedades son transmitidas por vía fecal-oral utilizando como vehículo los alimentos y el agua, es necesario contar con microorganismos que funcionen como indicador de contaminación fecal. Estos deben de ser constantes, abundantes y exclusivos de la materia fecal, deben tener una sobrevivencia similar a la de los patógenos intestinales y deben ser capaces de desarrollarse extra intestinalmente.

Para la Determinación del contenido de coliformes fecales en el té de Kombucha de acuerdo a la norma técnica NTE INEN 1529-8, se establecerá el siguiente procedimiento:

**Tabla 8-2:** Determinación del contenido de coliformes fecales en el té de Kombucha de acuerdo a la norma técnica NTE INEN 1529-8.

Materiales y Equipos	Reactivos
Placas porta objetos. Baño de agua regulable a $44 - 45,5 \pm 0,2^\circ \text{C}$ . Cajas petri Tubos de 150 x 16 mm y de 125 x 12 mm Tubos Durhan de 50 x 6 mm Erlenmeyer de 500 y 1 000 cm <sup>3</sup> Frascos de boca ancha de 250, 500 y 1 000 cm <sup>3</sup> con tapa de rosca autoclavable. Asa de inoculación Gradillas Balanza de capacidad no inferior a 2 500 g y de 0,1 g de sensibilidad Incubador regulable, rango de temperatura de $25 - 70 \pm 1^\circ \text{C}$ Autoclave pH-metro	Caldo verde brillante bilis-lactosa (BGBL) o similar Caldo triptona Agar eosina azul metileno (EMB) Agar de contage en placa (PCA) Caldo MR-VP Reactivos de Kovacs Solución de Rojo de metilo Solución de Creatina al 0,5% Solución alcohólica de $\alpha$ -naftol al 6% Solución de hidróxido de Potasio al 40% Agar citrato de Simons Solución alcohol-acetona Solución fenicada de cristal violeta al 1% Solución fenicada de fucsina básica al 1%.
<b>Procedimiento</b>	
Simultáneamente con el ensayo confirmatorio de la Norma INEN 1 529-6 inocular dos o tres asas de cada uno de los tubos presuntamente positivos en un tubo conteniendo 10 cm <sup>3</sup> de caldo BGBL y en otro que contenga aproximadamente 3 cm <sup>3</sup> de caldo triptona Incubar estos tubos a $45,5 \pm 0,2^\circ \text{C}$ (baño María) por 48 horas. Al cabo de este tiempo anotar la presencia de gas en los tubos de BGBL y añadir dos o tres gotas del reactivo de Kovacs a los tubos de agua triptona. La reacción es positiva para el indol si en cinco minutos se forma un anillo rojo en la superficie de la capa de alcohol amílico; en la prueba negativa el reactivo de Kovacs conserva el color original. Los cultivos gas positivos en caldo verde brillante bilis-lactosa incubados a $30$ ó $35^\circ \text{C}$ y a $45,5^\circ \text{C}$ y que producen indol a $45,5^\circ \text{C}$ son considerados coliformes fecales positivos.	
<b>Cálculos</b>	
Calcular la densidad de coliformes fecales sólo en base del número de tubos que a $45,5^\circ \text{C}$ presentan gas en el caldo BEGL e indol en el caldo triptona.	

Fuente:(INEN, 2014)

2.8.1.4. *Determinación del grado alcohólico del té Kombucha*

**Tabla 9-2:** Determinación del grado alcohólico en el té de Kombucha de acuerdo a la norma técnica NTE INEN 0360

Materiales y Equipos	Reactivos
Aparato de destilación Matraz volumétrico, de 200 cm <sup>3</sup> Picnómetro, de 50 cm <sup>3</sup> , de vidrio Pírex Núcleos de ebullición Baño de agua, con regulador de temperatura. Termómetro, graduado en décimas de grado Celsius (°C), con escala adecuada para el ensayo (de 10°C a 30°C). Balanza analítica, sensible al 0,1 mg.	Suspensión de hidróxido de calcio, que contenga 120 g de óxido de calcio por litro. Solución al 10 /o de fenolftaleína, en alcohol de 95%. Solución al 10% de ácido sulfúrico. Solución al 1% o de silicona. Agua destilada. Solución sulfocrómica. Etanol Éter etílico.
<b>Procedimiento</b>	
<p>La determinación debe efectuarse por duplicado sobre la misma muestra.</p> <p>Determinar y anotar la temperatura a la que se encuentra la muestra que debe analizarse.</p> <p>Transferir 200 cm<sup>3</sup> de muestra al matraz de destilación y colocar núcleos de ebullición.</p> <p>Agregar la suspensión de hidróxido de calcio para alcalinizar el medio, lo que puede comprobarse mediante el uso de la solución de fenolftaleína.</p> <p>Destilar la muestra, recibiendo el destilado en el matraz volumétrico de 200 cm<sup>3</sup>, al que se ha agregado previamente 10 cm<sup>3</sup> de agua destilada, en la que debe estar sumergido el extremo del tubo conductor del destilado; recoger hasta obtener un volumen aproximadamente igual a tres cuartas partes del volumen inicial de muestra.</p> <p>Desechar el líquido remanente del matraz de destilación y lavarlo; transferir a este matraz el destilado obtenido; lavar el matraz volumétrico colector con cinco porciones de agua destilada, transfiriendo los líquidos de lavado al matraz de destilación.</p> <p>Añadir 1 cm<sup>3</sup> de la solución al 10% de ácido sulfúrico y colocar núcleos de ebullición; armar el aparato.</p> <p>Destilar nuevamente, recibiendo el destilado en el matraz volumétrico de 200 cm<sup>3</sup>, al que se ha agregado previamente 10 cm<sup>3</sup> de agua destilada, en la que debe estar sumergido el extremo del tubo conductor del destilado.</p> <p>Agitar y llevar a volumen con agua destilada, a la misma temperatura con la que se midió la muestra inicial, con una tolerancia de <math>\pm 2^{\circ}\text{C}</math>; homogeneizar.</p>	



Lavar el picnómetro con agua corriente y luego, en forma rápida, con mezcla sulfocrómica. Después, lavar varias veces con agua destilada y finalmente con etanol y éter etílico.

Dejar escurrir el picnómetro y secarlo perfectamente, tanto por dentro como por fuera; taparlo.

Pesar el picnómetro limpio y seco con aproximación al 0,1 mg.

Colocar cuidadosamente la muestra destilada en el picnómetro hasta la marca, evitando la formación de burbujas de aire, y luego taparlo.

Sumergir el picnómetro en el baño de agua a  $20^{\circ} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos, comprobando al final que el nivel del producto alcance exactamente la marca.

Retirar el picnómetro del baño, secar exteriormente con papel filtro y pesar con aproximación al 0,1 mg.

Vaciar el picnómetro y limpiar; secarlo perfectamente y poner en él agua destilada hasta la marca respectiva, evitando la formación de burbujas de aire; tapar el picnómetro.

### Cálculos

La densidad relativa se determina mediante la ecuación siguiente:

$$d = \frac{m_2 - m_1}{m_3 - m_1}$$

Siendo:

d = densidad relativa.

$m_1$  = masa del picnómetro vacío, en gramos.

$m_2$  = masa del picnómetro con la muestra, en gramos.

$m_3$  = masa del picnómetro con agua destilada, en gramos

Fuente: ( IINSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACION., 2018)

## CAPITULO III

### 3. RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.1. Evaluación de las características físico-químicas de la materia prima (té, café y canela), para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha)

##### 3.1.1. pH

Al realizar el análisis estadístico del pH de las materias primas utilizadas para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), se registraron diferencias altamente significativas ( $p < 0.01$ ), entre medias estableciéndose una media de pH para el té verde de 7,15, como se aprecia en la tabla 2-3, que implica que es una solución apenas básica debido a que está más cerca del neutro en el rango de la escala del pH, siendo su punto de partida tanto para la basicidad o acidez el 7, como se indica en la tabla 10-3.

**Tabla 10-3:** Evaluación de las características físico-químicas de la materia prima (té, café y canela), para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha)

VARIABLES	MATERIA PRIMA			EE	Prob	Sign
	Té verde	Café	Canela			
Azúcares Totales (%)	59.44b	70.98a	55.29c	0.42	0.0000005	**
Carbohidratos Totales (%)	92ab	94.48a	90.29b	0.57	0.01	**
Acidez	0.13b	0.13b	0.33a	0.03	0.01	**
pH	7.15b	6.29c	7.9a	0.05	0.00	**

Elaborado por: RICAURTE, Andrés, 2020.

En tanto que, para el café, la media fue de 6,29 por lo que se puede decir que aun cuando es una sustancia que se encuentra en el rango de los elementos ácidos (0 a 7) se acerca más a la neutralidad que a la acidez, con una propiedad de amargo al probarlo. Para el caso de la canela el rango de pH fue de 7,90 por lo que se puede decir que es la materia prima que más se acerca al rango de los elementos alcalinos (7 a 14), con un aporte positivo para el cuerpo humano.

Al respecto (Brado, Patrick, 2017 pág. 34), menciona que se llama básica o alcalina a la solución cuya concentración de iones hidrógeno es menor que la de iones hidroxilo. Una solución es neutra cuando su concentración de iones hidrógeno es igual a la de iones hidroxilo. El agua pura es neutra porque en ella  $[H^+] = [OH^-]$ . Las moléculas del té se disocian en forma prácticamente total al ser disueltos en agua y esta es una característica propia de las soluciones base.

Las hojas del té verde se recogen cuando todavía están frescas, después se secan y trituran para ser comercializados en forma de infusión. Aunque el té contiene teína, que es la misma molécula que la cafeína, el té verde ejerce un impacto menor en el equilibrio del pH tras ingerirlo. La calidad final del producto utilizado como materia prima para la elaboración del té de kombucha depende de factores como el clima, el suelo, la altitud, los procesos de recolección y procesamiento, envasado, transporte y almacenamiento, (Calonge, 2014 pág. 67).

Además es importante mencionar que el café debe consumirse con moderación y de la forma adecuada a fin de que sus componentes no acidifiquen la sangre, ya que en exceso no es bueno para la salud, pues se convierte en una fuente de acidez para el cuerpo, lo que está relacionado con envejecimiento celular y enfermedades de tipo degenerativo, e incluso con el cáncer, por lo tanto al mezclarlo con otros productos como es el kombucha se mantiene sus cualidades pero descendiendo su efecto nocivo, ideal para aquellas personas que no pueden retirar su afición por esta bebida, (Calvo, 2013 pág. 45).

La medida de pH obtenida que fue de 7.15 en el caso del té verde que es el que más se acerca a la neutralidad es superior al reportado en la investigación de (Salamanca, 2014), quien al preparar tres diferentes sustratos determinó que las mezclas evaluadas, presentaban carácter ácido puesto que el pH oscilaba entre 3.70 a 4.01, con una acidez total que viene determinada en % p/p ácido, valores entre 0.70 a 1.77. Por lo tanto, se aprecia que el pH es menor a los de la presente investigación puesto que la naturaleza de los productos como fueron té verde especialmente provocan la elevación del pH porque es uno de los alimentos acidificantes saludables y recomendables para incluir en nuestra dieta dentro del 20%.

### 3.1.2. Acidez

Según (Brado, Patrick, 2017 pág. 34), la acidez es un sabor básico y una de las principales características del sabor del café, junto con cuerpo, fragancia y dulzura. Estas cualidades son utilizadas por los catadores (catadores profesionales) para evaluar los cafés y comparar las cualidades de los diferentes tipos. La calidad deseable de la acidez se debe a que los ácidos del café se combinan con los azúcares y aumentan la dulzura general del café, a la vez que le agregan cierto vigor al café.

La valoración estadística de la acidez de la diferente materia prima que formara parte de los sustratos en el que se desarrollará el hongo kombucha, determinó diferencias altamente significativamente ( $p \leq 0.01$ ), entre medias estableciéndose que para el café se reportó una media de acidez de 0,13 que implica que es una solución bastante acida con un sabor agrio o amargo al no ser endulzada con algún edulcorante, azúcar o sustituto natural o artificial de la misma, en tanto que para el café (acidez), la media fue de 0,33.

Mientras tanto que la acidez de la canela, reportó una media de 0,13 que implica que es una solución altamente acida, tomando en cuenta que su consumo neto sin ser diluido es casi imposible debido a su picor.

Al respecto (Calvo, 2013 pág. 78), manifiesta que se debe tomar la infusión de canela puesto que ayuda a prevenir la acidez estomacal, la bebida natural es un remedio digestivo y antiinflamatorio que también ayuda a reducir la producción de gases en el intestino para reducir el malestar. Sus propiedades mejoran el proceso de digestión de los alimentos y contra el exceso de acidez en el intestino.

El contenido de ácidos en una infusión también depende mucho del grado de tueste, tipo de tostador y la manera en cual se hace la infusión. Los degustadores utilizan una escala de 0 a 9 para describir la acidez de un café, y una puntuación de 6-7 es altamente ácido. El ácido está naturalmente presente en gran cantidad de alimentos como los limones, el vinagre, el yogurt y hasta el café. Existen, literalmente, cientos de componentes ácidos, partiendo de los más familiares (como la acidez cítrica), el café y el té verde hasta el poco ácido como la canela, (Carminiano, 2019 pág. 5).

Los resultados de la presente investigación son superiores a los reportes (Salamanca, 2014 pág. 68), quien al realizar la evaluación de un proceso de fermentación acética inducido por kombucha sobre sustrato de glucosa y fructosa registro una acidez total de 1.12% (p/p como ácido

láctico).que es mayor a la presente investigación y que se debe a la naturaleza de los productos que forman el sustrato.

### **3.1.3. Hidratos de carbono**

La evaluación estadística del contenido de hidratos de carbono presentes en la materia prima con la que se elaborará el té de kombucha se registraron diferencias altamente significativas ( $p < 0.01$ ), con una media de 92, para el caso del té verde siendo estos hidratos la fuente más eficaz de obtener energía, el té se puede decir que no posee un aporte mayoritario en esta adquisición energética. Para el café se reportó una media de 94,48 % que significa que el café tiene una significativa presencia de carbohidratos en su composición.

Mientras tanto que el contenido de hidratos de carbono en la canela registró una media de 90,29% de acuerdo a los reportes analizados se indica que el producto que más contenido de hidratos de carbono reportó fue el café, los hidratos de carbono son componentes de los alimentos que, aunque no es asimilado por el organismo ya que no se digiere en el aparato digestivo, tiene una gran importancia en la regulación de la motilidad del sistema digestivo y en otras funciones como en la absorción de colesterol. Su presencia en la dieta, en determinadas cantidades, es necesaria para el mantenimiento de la salud y la prevención de ciertas enfermedades (Calvo, 2013 pág. 23).

El café no ayuda al aumento de peso corporal pese a su contenido de hidratos de carbono, más bien si se toma un par de cafés antes de hacer deporte, mejorará el rendimiento y posteriormente los dolores musculares se reducirán considerablemente. También es una buena fuente de fibra, y curiosamente, los niveles más altos se encuentran en el café instantáneo, no en el café molido fresco. (Artemio, 2017 pág. 23)

Los hidratos de carbono dentro de sus principales funciones producen una combustión más limpia en nuestras células y dejan menos residuos tóxicos en el cuerpo y como antes ya lo mencionamos son la fuente de energía más rápida que se encuentra en la naturaleza (Calonge, 2003 pág. 12).

El consumo de té verde se ha relacionado con una reducción en la grasa y el peso corporal. Sin embargo, las investigaciones realizadas con el té verde han sido muy diversas. El contenido alto de galato de epigallocatequina (EGCG), convierte al té verde en una fuente alta de carbohidratos, sobre todo los refinados mientras que las harinas blancas, el azúcar o el arroz no integral, son considerados hoy día como los peores alimentos que puedes incluir en una dieta. Sobre todo, si lo haces en forma desmedida. Es que es energía de absorción muy rápida, que, si no es utilizada

por el organismo de forma rápida, se almacena en tu cuerpo en forma de grasa, (Carminiano, 2019 pág. 12).

La medida del contenido de carbohidratos los cuales son los componentes principales utilizados en la elaboración de la bebida obtenida fue del 92% y es superior a la obtenida en la investigación de (Quezada, 2014), quien menciona que al elaborar un sustrato a base de linaza la concentración de carbohidratos fue del 48%. Por lo tanto, los sustratos empleados en la elaboración del té de kombucha de la presente investigación son más ricos en carbohidratos por ende se permite una mayor dilución para proporcionar mayor efecto energético.

### **3.1.4. Azúcares**

Al realizar el análisis del contenido de azúcares presente en la materia prima, se registraron diferencias altamente significativas ( $p \leq 0.01$ ), con una media de 59,44% que quiere decir que el azúcar presente en este producto es bajo, para la materia prima café, se aprecia una media de 70,98% y en la canela, se reportó una media de 55,29 % que quiere decir que el azúcar presente está en una proporción considerable.

Es decir que en el café existe la mayor presencia de azúcares de las tres materias primas evaluadas lo que tiene que ver con lo reportado por (Carminiano, 2019), quien menciona que en las personas con diabetes el páncreas no produce suficiente hormona insulina o las células no responden adecuadamente a su acción, lo que provoca que los niveles de azúcar en la sangre se eleven. La canela reduce el azúcar en la sangre y combate la diabetes porque imita los efectos de la insulina y facilita el transporte de glucosa a las células, lo que quiere decir que es un perfecto sucedáneo del azúcar común, (Carminiano, 2019 pág. 17).

Para contrarrestar los efectos de la vejez, la canela aporta una importante cantidad de antioxidantes gracias a su concentración de compuestos fenólicos. El aceite de canela y sus propiedades fungicidas como antibacterianas, lo ha hecho merecedor de un puesto en la industria cosmética, (Carminiano, 2019 pág. 17).

Sin embargo, la cafeína presente en el café actúa en el cerebro, bloqueando un neurotransmisor, la adenosina, que hace que aumenten otras sustancias como la dopamina o la norepinefrina, que aceleran la actividad cerebral, mejorando varios aspectos que incluyen la memoria, el ánimo, la vigilancia, los niveles de energía, los tiempos de reacción y la función cognitiva general. Su abuso puede provocar trastornos del sueño, por lo que se recomiendan no más de cuatro tazas al día, (Carminiano, 2019 pág. 14).

La principal función del azúcar es proporcionar la energía suficiente para órganos del cuerpo como el cerebro y los músculos. Solo el cerebro es responsable del 20% del consumo de energía procedente de la glucosa, aunque también es necesaria como fuente de energía para todos los tejidos del organismo. Pero en el té es mínimo el aporte, (Lescano, 2015 pág. 19).

El té verde es una de las infusiones más populares, tanto para proporcionar energía como para mejorar la salud de los consumidores como a la hora de perder peso. Los nutricionistas suelen recomendar la ingesta de té verde en forma de infusión por las múltiples propiedades que ofrece y su escaso aporte calórico, (Fontana, 2011 pág. 14).

Las respuestas alcanzadas de los azúcares en la presente investigación que establecieron una media de 59,44 %, guarda concordancia con la investigación de (Fula, 2010), que menciona que al preparar el sustrato con canela para la obtención de bebidas funcionales alcanzó contenido de azúcares de 58,78 %. La medida de azúcar obtenida brindó un efecto positivo y fue necesaria para llevar el proceso a cabo el proceso de fermentación de la bebida.

### **3.2. Evaluación de las características físico-químicas de los sustratos o líquidos (té, café y canela), para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha)**

#### **3.2.1. pH**

Al realizar el análisis de la variable pH de los sustratos que servirán para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha) se aprecia diferencias significativas entre medias ( $P < 005$ ), por efecto del tipo de sustrato, estableciéndose que para el sustrato té, se reportó una media de pH de 4,37 por lo que se puede decir que es una solución con un carácter ácido en la escala del pH.

Mientras que para el café el pH fue de 4,53 infiriendo por tanto que su acidez aumenta sin el debido aditamento de algún tipo de azúcar. Finalmente, para la canela el pH, fue de 4,55 que quiere decir que la solución va en ascendencia hacia la acidez, como se indica en la tabla 2-3.

**Tabla 2-3:** Evaluación del sustrato utilizado para la determinación de la viabilidad del *Acetobacter aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomycesgisevi* (HONGO KOMBUCHA) para una posible aplicación en la agroindustria,

VARIABLES	TIPO DE SUSTRATO					
	Té verde	Café	Canela	EE	Prob	Sign
pH	4.37b	4.53a	4.55a	0.03	0.01	*
Acidez	0.3c	0.73a	0.4b	0.02	0.03	*
Grados Bríx	12.13b	12.53ab	13.33a	0.24	0.03	*

Elaborado por: RICAURTE, Andrés, 2020.

De los resultados expuestos se aprecia que el sustrato menos ácido fue el preparado con canela denotando en la elevación de acidez que exista entorno a los sustratos examinados. Ya que según (Parales, 2019 pág. 1), como particularidades propias del café tenemos su sabor amargo y un olor agradable característico que corroboran la media antes mencionada y considerando también que el nivel de pH está en descenso esto puede ser una ventaja o desventaja de consumo en el cuerpo que se basa en el modo de consumo y en la cantidad de veces al día que se lo tome, aunque al ser mezclada o disuelta en agua y agregándole algún tipo de azúcar su acidez regresa a la neutralidad y permite que su sabor y propiedades para el cuerpo humano sean absorbidas de forma más comestible.

Mientras que la canela es excelente para aliviar molestias digestivas e intestinales y elimina flatulencias junto a otros males del estómago como la acidez o la falta de apetito. Adicional a esto su componente de fibra dietética, hierro y calcio disminuyen el riesgo de sufrir padecimientos del colon, (Brado, Patrick, 2017 pág. 34).

La medida de pH obtenida que es de 4.55 en el caso de la canela en concordancia con la investigación de (Fula, 2010), que menciona que al preparar el sustrato con canela para la obtención de bebidas funcionales alcanzó un pH de 6.96. La medida de pH obtenida brindó un efecto protector evitando que se produjera cambios en el producto, evitando la sedimentación, la producción de CO<sub>2</sub> y la transformación de sólidos totales en sólidos solubles, (Calvo, 2013 pág. 45).



### 3.2.2. *Acidez*

Al realizar el análisis de la acidez de los sustratos, se registraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ), estableciéndose que para el té verde una media de acidez de 0,3 así como en el café la acidez fue de 0,73 correspondiendo a una solución bastante ácida. Mientras tanto que para la canela la acidez, media fue de 0,4 siendo una solución ácida, ya que se aleja de su nivel de neutralidad.

Al evaluar los resultados de acidez de los sustratos se aprecia la media más ácida se reportó en el café y menos ácida en el té, nos permite deducir que tiene más ventajas nutricionales y que aporta grandes beneficios para la salud del cuerpo humano dependiendo el ritmo de consumo que tenga en nuestro día a día.

Al respecto (Palate, 2009 pág. 1), indica que la acidez, al igual que el pH es una propiedad de suma importancia debido a que es un indicador de los microorganismos que pueden estar presentes, desarrollarse o deteriorar el alimento el nivel de acidez se incrementa al aumentar el tiempo de obtención o bien fuera de refrigeración, por lo que el control de esta variable resulta importante en el agrado del consumidor.; el valor de acidez obtenidos refleja que se encuentra dentro del parámetro establecido, es importante mencionar que dependiendo de la producción de ácido afectara la textura y el sabor del producto

### 3.2.3. *Grados Bríx*

Al realizar el análisis de los grados Bríx de los sustratos para la determinación de la viabilidad del *Acetobacter aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha) para una posible aplicación en la agroindustria se registraron diferencias significativas entre medias ( $P < 0.05$ ), establecidos que para el sustrato té, la media fue de 12,13 grados Bríx, tomándose como referencia que los grados Bríx miden el cociente total de sacarosa disuelta en un líquido y en este caso se encuentra en un porcentaje bajo.

En el sustrato café se registraron una media de 12,53 grados Bríx, quiere decir que contiene más sacarosa que el té verde en unos 0,4 grados de ventaja, mientras que, en la canela, se registró una media de 13,13 grados Bríx, de lo cual podemos deducir que se encuentra en una cantidad considerable en la solución.

Comparando los grados Bríx del café, el té y la canela se puede concluir que la canela posee un nivel de sacarosa más alto que los dos anteriores, convirtiéndola como antes ya lo mencionamos

en un sustituto perfecto para la azúcar común que consumimos a diario y nos aporta menos valor nutricional y perjudica nuestra salud con el paso del tiempo.

Al respecto (Stevens, 2002 pág. 1), manifiesta que el café es menos ácido que el té verde y por ende tiene un sabor un poco más dulce, que según expertos depende mucho también del tipo de tueste que tenga el grano para su consumo y el tipo de líquidos con los que se lo mezcle, puede ser leche, agua, agregándole miel o azúcar, etc.

La sacarosa aporta la energía necesaria para el metabolismo de los microorganismos, mientras que el té verde aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo de dichos microorganismos. Al existir mayor cantidad de sacarosa va existir mayor cantidad de azúcar en disolución, pero con el té se encuentra en menor cantidad razón por lo cual la cantidad de azúcar en disolución es menor, produciéndose un descenso en los grados Bríx.

### **3.3. Evaluación de las características físico-químicas del producto para la determinación de la viabilidad del *Acetobacter aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el hongo kombucha**

#### **3.3.1. pH 0,24,48,72,96 y 120 horas**

Al realizar el análisis estadístico del pH del té de kombucha en base a 6 horas distintas de (0,24,48,72,96,120 horas), observación se registraron diferencias altamente significativas ( $p < 0.01$ ), entre medias estableciéndose que para el caso del té verde se observó una media inicial de 4,42; en tanto que a las 24 horas de 4,37, a las 48 horas de 4,46, a las 72 horas de 3,52, a las 96 horas de 3,56 y a las 120 horas de 3,47, de lo cual podemos concluir que paulatinamente los valores del pH van en dirección a su acidez.

Para el caso del café se aprecia medias de pH a las 0 horas de 4,53, a las 24 horas de 4,42, a las 48 horas de 4,42, a las 72 horas de 3,6, a las 96 horas de 3,64 y a las 120 horas de 3,38, de lo cual podemos concluir que paulatinamente los valores del pH van en dirección a su aumento de acidez, como se aprecia en la tabla 11-3.

**Tabla 11-3:** Evaluación de las características físico químicas del té de Kombucha para una posible aplicación en la agroindustria, mediante la utilización de tres sustratos.

VARIABLES	TIPO DE SUSTRATO						EE	Prob	Sign
	Té verde	Café	Canela						
pH 0 horas	4.42	b	4.53	a	4.55	a	0.03	1.7E-02	*
pH 24 horas	4.37	a	4.42	a	4.38	a	0.03	3.9E-01	ns
pH 48 horas	4.46	a	4.42	a	4.36	a	0.07	6.1E-01	ns
pH 72 horas	3.52	b	3.6	b	4.36	a	0.04	9.0E-09	**
pH 96 horas	3.56	c	3.64	b	4.36	a	0.01	3.8E-16	**
pH120 horas	3.47	b	3.38	b	4.46	a	0.05	1.5E-09	**
Acidez 0 horas	0.43	b	0.73	a	0.4	b	0.03	8.0E-06	**
Acidez 24 horas	0.55	b	0.82	a	0.3	c	0.02	4.1E-09	**
Acidez 48 horas	0.57	b	0.77	a	0.3	c	0.03	6.1E-07	**
Acidez 72 horas	1.1	a	1.1	a	0.37	b	0.04	5.2E-09	**
Acidez 96 horas	1.27	a	1.23	a	0.3	b	0.05	1.4E-08	**
Acidez 120 horas	1.27	a	1.33	a	0.3	b	0.03	1.9E-11	**
Alcohol 24 horas	0.43	a	0.47	a	0	b	0.02	1.0E-09	**
Alcohol 48 horas	0.87	a	0.9	a	0	b	0.01	5.9E-15	**
Alcohol 72 horas	0.67	a	0.63	a	0	b	0.02	1.4E-11	**
Alcohol 96 horas	0.60	a	0.63	a	0	b	0.01	4.2E-13	**

Elaborado por: RICAURTE, Andrés, 2020.

Mientras tanto que para la canela el pH en base a 6 horas diferentes (0, 24, 48, 72, 96, 120 horas), de observación reportaron valores de 0 horas de 4,55, a las 24 horas de 4,38, a las 48 horas de 4,36, a las 72 horas de 4,36, a las 96 horas de 4,36 y a las 120 horas de 4,46, de lo cual se deduce que este producto está dentro de los parámetros de acidez y no la alcalinidad.

Se puede decir por lo tanto que entre más aumente el tiempo en el que se mida el pH del té verde, este decrecerá considerablemente, lo que implica que a las 0 horas él te tendrá un sabor menos amargo que cuando se lo consuma a las 120 horas, si consideramos los valores que arrojaron las pruebas realizadas.

Al decrecer su pH su tiempo de consumo es menor, sin embargo, al ser un producto de consumo rápido, sus efectos en la salud no son nocivos, permitiendo hasta un poco más del mes para ser disuelto y acabado.

Los valores de medias que nos han arrojado los análisis se mantienen en 4, sin embargo, sus decimas nos permiten saber en qué tiempo existe un descenso o aumento del pH en cuanto a acidez, en este caso aumenta la acidez hasta el último tiempo considerado y es ahí donde aumenta, pero no al mismo nivel del primero, es decir, es más ácido

(Salamanca, 2014), reporta que el pH final de la fermentación después de 4 días registró un resultado que fluctuaba entre 3.8 y 4, teniendo un pH inicial de 6.29 y 6.79. Así como de (Gonsalez, 2019) quien manifiesta que la fermentación de una bebida en base a hongo kombucha termina el proceso de fermentación cuando las bebidas presentaban un pH de 3.8-4.0.

### **3.3.2. Acidez 0,24,48,72,96 y 120 horas**

Al realizar el análisis de la acidez del té de kombucha se aprecian diferencias altamente significativas ( $P < 0.01$ ), entre medias estableciéndose que para el té de kombucha que se prepara con sustrato té la acidez en base a 6 horas diferentes (0,24,48,72,96,120 horas), de observación fue a las 0 horas de 0,43, a las 24 horas de 0,55, a las 48 horas de 0,57, a las 72 horas de 1,1, a las 96 horas de 1,27 y a las 120 horas de 1,27, por lo que se denota un aumento de acidez.

En tanto que para el té de kombucha elaborado con sustrato café la acidez estableció promedios a las 0 horas de 0,73, a las 24 horas de 0,82, a las 48 horas de 0,77, a las 72 horas de 1,1, a las 96 horas de 1,23 y a las 120 horas de 1,33.

Finalmente, cuando se evaluó el té de kombucha con sustrato canela las acideces en base a 6 horas diferentes fueron a las 0 horas de 0,4, a las 24 horas de 0,3, a las 48 horas de 0,3, a las 72 horas de 0,37, a las 96 horas de 0,3 y a las 120 horas de 0,3, por lo que se denota un aumento de acidez.

Al respecto (Calonge, 2014), menciona que la acidez al ir en aumento, quiere decir que entre más pase el tiempo el nivel de azúcar o sus sucedáneos, que se deba añadir para que sea consumible será mayor y por ende los problemas en la salud de nuestro cuerpo también serán mayores. Si se toma en cuenta las medias antes mencionadas, la información que se obtiene es que en el primer tiempo reduce la acidez, en el segundo aumenta más la acidez y en los siguientes tiempos se reduce aún más esta característica.

Que como mencionamos anteriormente inferirá en su sabor más que en otros aspectos o propiedades de este producto y por supuesto al ascender su acidez también debe por ende tratar de ser consumido en un lapso de tiempo no muy grande debido a sus efectos en la salud del cuerpo.

El té de kombucha es una bebida fermentada de ligero sabor ácido, que se prepara mediante té endulzado que se fermenta mediante una gelatinosa colonia de microorganismos de nombre latino *Medusomyces gisevi* (consistente principalmente, (Brado, 2017 pág. 67).

El complejo gelatinoso de kombucha, que trabaja de manera simbiótica con cepas de bacterias y levaduras en condiciones anaerobias obtiene margen energético de ganancia de la oxidación de la fructosa que es usada como fuente de carbono. Cada agente microbiano asociado a un sistema fermentativo, tiene un intervalo típico de pH dentro del cual es posible su crecimiento, éste parámetro juega un papel importante en la actividad de microbiana, (Martinez, 2002 pág. 56).

Los resultados expuestos en la presente investigación son superiores a los indicados por (González, 2014) quien al elaborar Bebidas fermentadas nutraceuticas elaboradas a partir del hongo Kombucha y su uso potencial en el tratamiento de Síndrome metabólico, registró una acidez titulable de 0.3-0.45%. Así como de (Lescano, 2015) quien al evaluar las características físico-químicas y capacidad antioxidante de “kombucha” expuso que los resultados obtenidos referente a los aspectos físico-químicos del té de kombucha fueron: pH de 3.4 y de , acidez titulable de 0.38 %.

### **3.3.3. Contenido de alcohol 24,48,72 y 96 horas**

Al realizar el análisis del contenido de alcohol del producto té ( té de kombucha), al utilizar el sustrato té se determinaron diferencias altamente significativas ( $P < 0.01$ ), por efecto del tipo de sustrato empleado en base a 6 horas diferentes (24,48,72,96horas), de observación reportándose , una media de contenido de alcohol en la bebida preparada a las 24 horas de 0,43, a las 48 horas de 0,87, a las 72 horas de 0,67 y a las 96 horas de 0,60, por lo que en base a estos valores se aprecia que esta variable disminuye a medida que pasa el tiempo.

En tanto que para el té de kombucha elaborado con sustrato de café el contenido de alcohol registró una media de 0,47 a las 24 horas, a las 48 horas de 0,9, a las 72 y 96 horas de 0,63. Finalmente, cuando se evaluó el té de kombucha con sustrato canela no se registró la presencia de alcohol en las horas de observación.

Al ser 0 todos sus valores, esto quiere decir que no hay presencia de contenido de alcohol en la canela como en sus otros dos productos de análisis como el té o el café y por lo tanto no se puede realizar más conclusiones claras de esta variable.

Por lo tanto, el contenido de alcohol presente en este producto varía de menos a más y de más a menos, sin una secuencia clara dentro del tiempo de medición, sin embargo, en sus últimos dos tiempos no disminuye ni aumenta, presentando el mismo valor de alcohol 0,63.

Al respecto (Calvo, 2013 pág. 45), manifiesta que hay muchas dudas sobre este tema: unos dicen que la kombucha tiene alcohol, y otros que no. El alcohol se origina en la fermentación. Por esta razón, hay fermentos como el vino o la cerveza que son bebidas alcohólicas. La kombucha también es un fermento, así que puede tener alcohol. Pero esto depende cómo se prepare. En realidad, hay que tener en cuenta varios factores. Por ejemplo, algunos Scoby no producen alcohol, da igual cuánto tiempo estén fermentando, los ingredientes usados, es decir los sustratos, así como el tiempo de fermentado debido a que, a mayor tiempo, más alcohol puede tener.

Lo normal es que la kombucha casera tampoco tenga alcohol, aunque hay que tener cuidado en la elaboración. Aun así, tendría como mucho un 3% de alcohol, más o menos. Esto sigue siendo una cantidad muy baja, (Palate, 2009 pág. 59).

La medida del contenido de alcohol en el té de kombucha fue de 0,43 a 0,84 a las 0 y 24 horas guardan concordancia con la investigación de (Rubio, A. 2012), quien menciona que el té fermentado contiene entre 0,4% y 0,5% de etanol, dependiendo del tiempo y de las condiciones de fermentación. Según la ley, toda bebida con un contenido de alcohol inferior a 0,5% puede denominarse bebida "sin alcohol, sin embargo, el té de la presente investigación supera este límite sin embargo se puede considerar dentro de este grupo ya que, como resultado de la fermentación alcohólica, algunas versiones pueden contener trazas de alcohol que van desde el 0,4 al 0,9 %.

### **3.4. Determinación de la viabilidad microbiológica del inóculo en el tiempo (té, café y canela)**

#### **3.4.1. Por efecto del tipo de microorganismo**

Al realizar el análisis de la viabilidad microbiológica del inóculo en el tiempo se aprecia que para el contenido de *Saccharomyces cerevisiae* por efecto del tipo de bacterias, se registraron diferencias altamente significativamente ( $p < 0.01$ ), estableciéndose una media a las 24 horas de 42.22 UFC/mL, y las 48 horas de 17.78 UFC/mL, mientras que a partir de las 42 horas se evidencia ausencia total, como se aprecia en la tabla 12-3.

En el caso de la viabilidad de la bacteria *Acetobacter acet* presente en el té de kombucha, se aprecia una media inicial de 41.67 UFC/mL, a las 24 horas de 116.67 UFC/mL, a las 48 horas de

114.44 UFC/mL, a las 72 horas de 115.56 UFC/mL, a las 96 horas de 124.44 UFC/mL y a las 120 horas de 147.78 UFC/mL, por lo que se aprecia que existe un aumento de *Acetobacter aceti* con el tiempo.

**Tabla 12-3:** Determinación de la viabilidad microbiológica del inóculo en el tiempo (té, café y canela) por efecto del tipo de microorganismo.

VARIABLE	TIPO DE MICROORGANISMO		EE	PROB	SIGN
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Acetobacter aceti</i>			
Presencia a las 0 horas.	0b	41.67a	4.66	<0.0001	**
Presencia a las 24 horas.	42.22b	116.67a	2.94	5.1E-10	**
Presencia a las 48 horas.	17.78b	114.44a	7.11	5.5E-07	**
Presencia a las 72 horas.	0b	115.56b	1.57	1.7E-15	**
Presencia a las 96 horas.	0b	124.44a	2.08	2.0E-14	**
Presencia a las 120 horas.	0b	147.78a	1.57	8.9E-17	**

Elaborado por: RICAURTE, Andrés, 2020.

Al respecto (Calonge, 2003), menciona que el hongo Kombucha esta formado por un consorcio de levaduras y bacterias y se utiliza para dar origen a una bebida fermentada a la cual se atribuyen propiedades hipoglucemiantes, antiinflamatorias, antihipertensivas, antioxidantes, etc., ésta bebida se obtiene de la fermentación de una infusión de diversos sustratos.

Los productos de fermentación identificados han sido distintos ácidos (láctico, acético, glucónico y glucurónico) etanol y glicerol. También se han detectado vitaminas, antibióticos y aminoácidos. La concentración de estos productos dependerá del tiempo y del lugar en el que se lleve a cabo la fermentación.

El *Acetobacter aceti* se trata de una bacteria que presenta movimiento gracias a sus flagelos, no tiene la capacidad de producir enzimas de tipo proteolíticas (gelatinasas) que hidrolizan la

gelatina. Su proceso metabólico es bien conocido por producir ácido acético en grandes cantidades. es una bacteria con la capacidad de producir celulosa a partir de glucosa y a esta se le atribuye la formación de la matriz celulósica característica del hongo kombucha, (Bacardit, 2012 pág. 34).

### 3.4.2. Por efecto del tipo de sustrato

Al realizar el análisis de la viabilidad microbiológica del inóculo en el tiempo por efecto del tipo de sustrato empleado (té, café y canela) se estableció que al ser preparado con el sustrato té se registraron diferencias altamente significativas ( $p < 0.01$ ), con una media inicial de 18.33 UFC/mL, a las 24 horas de 113.33 UFC/mL, a las 48 y 72 horas de 93.33 UFC/mL, y a partir de las 96 horas se evidenciaron crecimiento a 100 UFC/mL, como se puede observar en la tabla 13-3.

**Tabla 13-3: Determinación de la viabilidad microbiológica del inóculo en el tiempo (té, café y canela) por efecto del sustrato**

VARIABLE	TIPO DE SUSTRATOS			EE	PROB	SIGN
	CANELA	CAFÉ	TE VERDE			
Presencia a las 0 horas.	20a	23a	18a	5.71	0.035	ns
Presencia a las 24 horas.	43c	82b	113a	3.6	4.45E-08	**
Presencia a las 48 horas.	22c	83b	93a	8.71	1.57E-04	**
Presencia a las 72 horas.	0	80b	93a	1.92	4.18E-13	**
Presencia a las 96 horas.	0	87b	100a	2.55	4.87E-12	**
Presencia a las 120 horas.	0	122a	100b	1.92	2.09E-14	**

**Elaborado por:** Ricaurte, Andrés. 2020.

En tanto que la determinación de presencia de microorganismos en el té de kombucha al utilizar como sustrato la canela se presentó una media inicial de 20.83 UFC/mL, a las 24 horas de 43.33 UFC/mL, a las 48 horas de 21.67 UFC/mL, en tanto que, a partir de las 72 horas, se aprecia ausencia total de esta bacteria en el té de kombucha



Una vez que se evaluó el té de kombucha se aprecia que al utilizar el sustrato café la viabilidad microbiológica fue al inicio de 23.33 UFC/mL; presencia a las 24 horas de 81.67 UFC/mL, a las 48 horas de 83.33 UFC/mL a las 72 horas de 80 UFC/mL; a las 96 horas de 86.67 UFC/mL y finalmente a las 120 Horas de 121.67 UFC/mL,

### **3.4.3. Por efecto de la interacción entre el tipo de microorganismo y tipo de sustrato**

La evaluación de la viabilidad microbiológica del té de kombucha reporto diferencias altamente significativas por efecto de la interacción entre los tipos de las bacterias versus los tipos de sustrato estableciéndose que inicialmente la presencia del *Acetobacter Aceti* al utilizar el sustrato canela el comportamiento al inicio fue de 41.67 UFC/mL, a las 24 horas de 63.33 UFC/mL, a las 48 horas de 43.33 UFC/mL a las 72 y 96 horas ausencia total mientras que a las 120 horas existió un crecimiento elevado con valores de 243.33 UFC / mL.

Para el caso de *Acetobacter Aceti* en el té de kombucha preparado con sustrato café las respuestas fueron al inicio de 46.67 UFC/mL, a las 24 horas de 133.33 UFC/mL, a las 48 horas de 143.33 UFC/mL, a las 72 horas 160 UFC/mL, a las 96 horas 173.33 UFC/mL y finalmente al final de la evaluación (120 días) la presencia de *Acetobacter Aceti* fue nula.

En la valoración de la presencia del *Acetobacter Aceti* al utilizar el sustrato té verde el comportamiento al inicio fue de 36.67 UFC/mL, a las 24 horas de 153.33 UFC/mL, a las 48 horas de 156.67 UFC/mL, a las 72 de 186.67 UFC/mL, y a las 96 y 120 horas de 200 UFC / mL.

El análisis de la viabilidad del *saccharomyces cerevisiae*, en el té de kombucha preparado con el sustrato canela se aprecia una media a las 24 horas de 23,33 UFC /mL, mientras que a partir de las, 48 horas la ausencia es total de este tipo de bacterias, como se aprecia en la tabla 12-3.

La presencia de la bacteria *Saccharomyces cerevisiae*, en el té de kombucha preparado con el sustrato café se registraron medias a las 24 horas de 30 UFC/mL, y las 48 horas de 23,33 UFC/mL, mientras tanto que a partir de las 72 horas se aprecia ausencia total hasta a finalización de las horas de investigación.

Al valorar la viabilidad de la bacteria *Saccharomyces cerevisiae*, en el té de kombucha preparado con el sustrato té se registraron medias a las 24 horas de 73.33 UFC/mL, y las 48 horas de 30 UFC/mL, mientras tanto que a partir de las 72 horas se aprecia ausencia total hasta a finalización de las horas de investigación.

**Tabla 13-3: Determinación de la viabilidad microbiológica del inóculo en el tiempo (té, café y canela) por efecto de la interacción entre el tipo de materia prima y sustrato**

Variable	INTERACCIÓN ENTRE EL TIPO DE MICROORGANISMO Y EL TIPO DE SUSTRATO											EE	Prob	Sign	
	<i>Acetobacter Aceti</i> CANELA	<i>Acetobacter Aceti</i> CAFÉ	<i>Acetobacter Aceti</i> TE VERDE	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CANELA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAFE	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> TE VERDE									
Presencia 0 UFC/mL.	41.67	a	46.67	a	36.67	a	0	a	0	a	0	a	8.08	0.8282	ns
Presencia 24 UFC /mL.	63.33	b	133.33	a	153.33	a	23.33	c	30	c	73.33	b	5.09	0.0002	**
Presencia 48 UFC /mL.	43.33	b	143.33	a	156.67	a	0	b	23.33	b	30	b	12.32	0.0094	**
Presencia 72 UFC /mL.	0	c	160	b	186.67	a	0	c	0	c	0	c	2.72	<0.0001	**
Presencia 96 UFC /mL.	0	c	173.33	b	200	a	0	c	0	c	0	c	2.72	<0.0001	**

Elaborado por: Ricaurte, Andrés. 2020

## CONCLUSIONES:

- El sustrato elaborado con canela, no es recomendable para la utilización en la elaboración de kombucha, ya que por sus propiedades antibióticas no permite el crecimiento de los diferentes microorganismos.
- Para la materia prima se determinó los resultados más altos en el caso del café, con azúcares totales de 70.98%, carbohidratos 94.48%, acidez de 0.13 y pH de 6.29.
- El mejor sustrato para la elaboración de té de kombucha, se desarrolló en el sustrato elaborado con té verde, por la gran cantidad de taninos presentes en las hojas del mismo, por lo que sirve como alimento para el desarrollo de los microorganismos.
- El análisis físico químico del producto de la fermentación del Kombucha, determinó que la calidad depende tanto del sustrato utilizado como el tiempo de fermentación, registrándose que al utilizar el té verde el valor inicial de pH fue de 4.42, acidez de 0.43 y alcohol de 0.43 sufriendo cambios, hasta obtener los valores finales, pasadas 120 H de análisis con un valor de pH de 3.47, de acidez de 1.27 y alcohol de 0.60; de la misma forma para el café los valores iniciales fueron pH de 4.53 de acidez 0.73 y alcohol de 0.47 y, pasadas 120 H de análisis el un valor de pH de 3.38 de acidez de 1.33 y alcohol de 0.63.
- Se evaluó la actividad microbiológica de dos especies de microorganismos, en el caso del café y el té verde, se tuvo crecimiento de *saccharomyces cerevisiae* en un lapso de entre 24 y 48 H, mientras que para el *acetobacter aceti*, el crecimiento fue desde las 0 H hasta las 120 H, esto se debe a que el alcohol que produce el *Saccharomyces cerevisiae* sirve como ruta metabólica para el desarrollo del *Acetobacter aceti*.

## RECOMENDACIONES:

- Se recomienda al elaborar la bebida fermentada a base de *Medusomyces gisevi* aplicar condiciones estrictas de limpieza y desinfección de materiales y equipos para evitar la contaminación de la biomasa, ya que si esta se contamina se origina el moho de *Aspergillus* que es perjudicial para la salud.
- Se recomienda aplicar procesos tecnológicos agroindustriales, para la elaboración de la bebida de Kombucha ya que de esta forma se puede colocar un nuevo producto en el mercado y darle mayor tiempo de vida útil sin que pierda sus características.
- En futuras investigaciones se deben realizar ya producciones de té de kombucha, realizando pruebas a gran escala y observar los cambios que se van dando durante el proceso; además de darle una posible utilización a la biomasa (formación mucosa) del Hongo kombucha, resultante de la fermentación.

## BIBLIOGRAFÍA

**ARTEMIO, G.** *Acetobacter: características, hábitat y especies principales*. [En línea] 2017. [Citado el: Junio de 22 de 2019.] <https://www.lifeder.com/acetobacter/>.

**BACARDIT, A.** *La levadura de la cerveza y. del laboratorio*. [En línea] 2012. [Citado el: Julio de 17 de 2019.] <http://seresmodelicos.csic.es/llevat.html>.

**BELLOZO, J.** "Manufacture of a beverage from cheese whey using a "tea fungus" fermentation" *Revista Latinoamericana*, [en línea].2003,45 (1-2) 3a. Lisboa. pp 5-11. [ consulta 4 de febrero de 2020]. .Disponible en:[https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2003/mi03-1\\_2a.pdf](https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2003/mi03-1_2a.pdf)

**BRADO, B.** *Curcuma longa L. essential oil composition, antioxidant effect, and effect on Fusarium verticillioides and fumonisin production*.2a. Saskatoon : Food Control, 2017. ISSN 73.

**CALONGE, F.** *Hongos medicinales*. 1a.ed. Madrid : Bol. Soc. Micol, 2003. pp. 179-188.

**CALONGE, M.** *Hongos medicinales*.4a.ed. Madrid : Bol Soc, 2014. pp. 61-89. ISSN 188.

**CALVO, B.** *Nutrición, Salud y Alimentos funcionales*. 1a.ed. Barcelona : Arazandi., 2013. pp. 57-89.

**CARMINIANO, R.** *La fermentacion*. [En línea] 12 de Agosto de 2019. <https://concepto.de/fermentacion/#ixzz5z8RIe0bY>.

**CORTEZ, M.** "Alimentos funcionales una hostoria con mucho presente y futuro", *Revista de la Facultad de Química Farmaceutica*, 2005.(Medellín : Universidad de Antioquia) 12(1), pp. 5-14.[ consulta: 10 agosto 2019). ISSN 0121-4004. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v12n1/v12n1a01.pdf>.

**DUFRESNE, F.** "Tea, Kombucha, and health": a review. *revista ScienceDirect*[en línea], 2000, (Boston) 33, pp 409-421.[Consulta: 19 agosto 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996900000673>

**ERNITO, P.** *Kombucha: a systematic review of the clinical evidence*. 1a.ed. Berlin : Forsch Komplementärmed Klass Naturheilkd, 2014.

**FONTANA, M.** *Nature of plants stimulators in the production of Acetobacter xylinum* ("tea fungus"). New Jersey : Biochem, 2011.

**FULA, A** Desarrollo de una bebida fermentada con cocción de maíz.[en línea] (Trabajo de Grado) (Especialista en ciencia y tecnología de los alimentos.Universidad nacional de Colombia, Bogota, Colombia. 2010. pp 8-14.Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/2387/1/107391.2010.pdf>

**GOMEZ, J.** *Alimentos funcionales*. [En línea] 2017. [Citado el: 22 de Julio de 2019.] <https://www.vivosano.org/alimentos-funcionales/>.

**GONSALEZ, S.**"Estudio comparativo de la microbiota aislada del Hongo Kombucha y su uso en la elaboración de alimentos fermentados para síndrome metabólico".*Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos* en línea],2019 , (Mexico DF) 4(1), pp 1-11. Disponible en: <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume4/4/2/33.pdf>.

**GONZALEZ, A& VALENZUELA, L.** *Saccharomyces cerevisiae*.Mexico D.F. C : Universidad Nacional Autonoma De Mexico., 2010, pp. 12,56,89.

**GONZÁLEZ; et al.**"Bebidas fermentadas nutraceuticas elaboradas a partir del hongo Kombucha y su uso potencial en el tratamiento de Síndrome metabólico".*Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*[en línea], 2018,(México)3(1), pp.1-6 [Consulta: 20 agosto 2019]. Disponible en: <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume3/4/4/56.pdf>.

**GREENWALT, J.** "Kombucha, the ferment tea: Microbiology, composition and claimed health effects". *Journal of Food Protection*[en línea], 2000, (New York) 63(7), pp 976-981. [Consulta: 20 agosto 2019].Disponible en: <https://meridian.allenpress.com/jfp/article/63/7/976/168061/Kombucha-the-Fermented-Tea-Microbiology>

**INEN 3062.** *Análisis de materias primas y productos*.

**INEN 10523.***Agua. Determinación del pH*.

**INEN 1529-2.***Control microbiológico de los alimentos*.

**INEN 475.** *Bebidas alcohólicas. Determinación del grado alcohólico.*

**JACOME, E.** *Componentes el té verde* . [En línea] 2018. [Citado el: 22 de Agosto de 2019.]  
[https://www.clubplaneta.com.mx/componentes\\_del\\_te\\_verde.htm](https://www.clubplaneta.com.mx/componentes_del_te_verde.htm).

**JARAMILLO, N.** *Valor nutricional del Homgo Kombucha.* [En línea] 25 de Enero de 2016.  
[Citado el: 07 de Octubre de 2018.]  
<https://www.accuweather.com/es/ec/ambato/126320/weather-forecast/126320>.

**LAJOLO, F.** *Functional foods: Latin American perspectives.* Boston : British Journal of Nutrition, 2002. pp. 145–150.

**LESCANO, D.** Características físico-químicas y capacidad antioxidante de “kombucha” [En línea] (trabajo de titulación). (Biólogo) Universidad nacional de Trujillo, Trujillo, Perú. 2015. 1-4. [Consulta: 23 agosto 2019]. Disponible en:  
<http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/8783/Lescano%20Jim%c3%a9nez%2c%20Ary%20Daniel.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

**LOZANO, M.** *La canela sus composicion y usos.* [En línea] 2018. [Citado el: 14 de Agosto de 2019.] <https://steemit.com/spanish/@yanethlopez/canela-composicion-usos-medicos-y-gastronomicos>.

**MARTÍNEZ, D; et al.** Propiedades funcionales agregadas al Tequila, otros mezcales y destilados de Agave convencionales, derivadas del extracto de un hongo comestible de uso tradicional en México (*Lentinula boryana*). Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, Mexico : 2009.

**MARTÍNEZ, R; et al.** *Uso de aceites esenciales en animales de granja. San Jose de Costa Rica :* interciencia, 2009.

**MARTINEZ, S.** *Estudio de la importancia del desarrollo de nuevos productos alimenticios funcionales en Europa.* Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España. : 2002.

**O'BRIE; et al.** *Nutricéuticos: suplementos nutricionales, vitaminas, minerales, oligoelementos y alimentos curativos.* Budapest : Robinbook, 2003.

**PALATE, J.** *Incidencia del proceso de elaboración en las características organolépticas de una bebida artificial en la empresa Nueva Esperanza.* . Ambato, Ecuador : Proyecto de investigación, 2009.

**PARALES, M.** *Ciencia del Café: ¿Qué es la acidez?* [En línea] 12 de Diciembre de 2019. <https://www.perfectdailygrind.com/2016/10/ciencia-del-cafe-que-es-la-acidez/>.

**QUEZADA, K.** Elaboración de una bebida funcional tipo “refrescante” a base de linaza saborizada con piña: estudio de vida útil y aporte nutricional de la formulación”. [En línea](trabajo de titulación) (ingeniería en alimentos) Universidad Técnica De Machala, Machala, Ecuador. 2014.pp 5-7. [Consulta 23 agosto 2019]. Disponible en: <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/1581/7/CD00007-TESIS.pdf>

**RODRIGUEZ, A.** Elaboración de una bebida a base del fruto falso de Marañón adicionado con betalainas.[En línea] (trabajo de titulación) (maestro en ciencias Alimentarias)Universidad Veracruzana, Veracruz, Mexico. 2011. pp 2-9. [Consulta 23 agosto 2019]. Disponible en: <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/46949/RodriguezEsquivelAnaOlivia.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

**RODRÍGUEZ, K.** "(Heterotheca inuloides Cass. Asteraceae: Astereae)": Ethnomedical uses, chemical constituents and biological properties..*Journal of Ethnopharmacology*. [En línea],2017, (México) 195(1) , pp. 39-63. ISSN 195. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874116318347?via%3Dihub>.

**RUBIO, A.** “Té de kombucha y sus beneficios para el sistema”.1a. Cuenca : UPE, 2007. pp. 2-5.

**SALAMANCA, G; et al.** "Evaluación de un proceso de fermentación acética inducido por kombucha sobre sustrato de glucosa y fructosa"*Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*[En línea], 2014,(Colombia) 67(2), pp 3-4. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/265089078\\_Evaluacion\\_de\\_un\\_proceso\\_de\\_fermentacion\\_acetica\\_inducido\\_por\\_kombucha\\_sobre\\_sustrato\\_de\\_glucosa\\_y\\_fructosa](https://www.researchgate.net/publication/265089078_Evaluacion_de_un_proceso_de_fermentacion_acetica_inducido_por_kombucha_sobre_sustrato_de_glucosa_y_fructosa)

**SZYMANSKY, S.** “Magnetic Equivalence between Nuclei of Spin Greater than ½ in Presence of Relaxation”. *Journal of Magnetic Resonance* [en línea], 1997, (United State of America) 127(2), pp. 199-205. [Consulta: 20 agosto 2009]. ISSN 1090-7807. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1006/jmre.1997.1203>

**SOLARTE, A.** "Aplicación de aceites esenciales para el control de Salmonella typhimurium aislada de casos clínicos en diferentes especies animales"(trabajo de titulación)( Maestría) Universidad de Córdoba., Córdoba, España. 2015.pp. 3-18. [Consulta 11 de octubre 2019].



Disponível em: [https://helvia.uco.es/bitstream/handle/10396/14083/TFM\\_Ana\\_Luc%\*c3\*%\*ada\*\\_Solarte\\_Portilla.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://helvia.uco.es/bitstream/handle/10396/14083/TFM_Ana_Luc%c3%ada_Solarte_Portilla.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

**SREERAMULU, G; et al.** "Characterization of antimicrobial activity in kombucha fermentation". *TNO Nutrition and Food Research* [En línea], 21(1), 2001, pp. 71 - 79. [Consulta: 11 Octubre 2019]. ISSN 21. [Consulta: 20 agosto 2009] Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/1521.3846%28200102%2921%3A1%3C49%3A%3AAID-ABIO49%3E3.0.CO%3B2-G>

**STEVENS, N.** *La Kombucha. El té extraordinario*. Barcelona : Luperty, 2002.

**VITTORIO, V.** "Divulgação estudo do consumo de plantas medicinais na região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro/ : aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população". *Rev. bras. farmacogn.* [En línea], 18(2), 2008, pp. 308-313. [Consulta: 20 agosto 2009]. ISSN 0102-695X. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102695X2008000200027&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102695X2008000200027&lng=en&nrm=iso).

## ANEXOS

**Anexo A.** Determinación del pH de los diferentes sustratos para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha).

### A. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Sustrato	Repeticiones			zX
	I	II	II	
Té verde	4.36	4.38	4.38	4.37
Café	4.47	4.57	4.56	4.53
Canela	4.52	4.49	4.63	4.55

CV. 1.19%  
X= 4.48

### B. ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	Grados de Libertad			Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Fisher Calculado	Fisher 0.05	Fisher 0.01	Prob	Sign
	de	de	de							
Total		8		0.07	0.009					
Tratamiento		2		0.06	0.028	9.74	5.14	10.92	0.01	*
Error		6		0.02	0.003					

### C. SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY

Sustratos	Medias	Rango	E.E.
Té verde	4.37	b	0.03
Café	4.53	a	0.03
Canela	4.55	a	0.03

**Anexo B.** Determinación de la acidez de los diferentes sustratos para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha).

### A. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Sustrato	Repeticiones			
	I	II	II	X
Té verde	0.3	0.3	0.3	0.3
Café	0.8	0.7	0.7	0.7
Canela	0.4	0.4	0.4	0.4

CV: 6.98

X= 0.46

### B. ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	Grados de Libertad		Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Fisher Calculado	Fisher 0.05	Fisher 0.01	Prob	Sign
	de	de							
Total	8		0.32	0.04					
Tratamiento	2		0.31	0.15	139.00	5.14	10.92	0.00	*
Error	6		0.01	0.00					

### C. SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY

Sustratos	Medias	Rango	E.E.
Té verde	0.30	c	0.02
Canela	0.40	b	0.02
Café	0.73	a	0.02

**Anexo C.** Determinación de los grados Bríx de los diferentes sustratos para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha).

#### A. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Sustrato	Repeticiones			
	I	II	II	X
Té verde	12.1	12.3	12	12.13
Café	12.2	12.4	13	12.53
Canela	14	13	13	13.33

CV: 3.32

X= 12.66

#### B. ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Fisher Calculado	Fisher 0.05	Fisher 0.01	Fisher Prob	Sign
Tratamiento	2	2.24	1.12	6.34	5.14	10.92	0.03	*
Error	6	1.06	0.177					

#### C. SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY

Sustratos	Medias	Rango	E.E.
Té verde	12.13	b	0.24
Canela	12.53	ab	0.24
Café	13.33	a	0.24

**Anexo D.** Determinación de los de los azúcares totales de la materia prima para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos.

### A. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Sustrato	Repeticiones			
	I	II	II	X
Té verde	59.81	58.70	59.81	59.44
Café	72.05	70.44	70.44	70.98
Canela	55.61	55.61	54.65	55.29

CV: 1.17

X= 61.9

### B. ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Fisher Calculado	Fisher			Sign
					0.05	0.01	Prob	
Total	8	399.55	49.944					
Tratamiento	2	396.39	198.194	375.86	5.14	10.92	0.00	*
Error	6	3.16	0.527					

### C. SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY

Sustratos	Medias	Rango	E.E.
Canela	55.29 c		0.42
Té verde	59.44 b		0.42
Café	70.98 a		0.42

**Anexo E.** Determinación de los carbohidratos solubles de la materia prima para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos.

#### A. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Sustrato	Repeticiones			
	I	II	II	X
Té verde	92.57	92.77	90.65	92
Café	93.06	95.28	95.11	94.48
Canela	90.29	90.21	90.36	90.29

Coefficiente de Variación (CV): 1.07

X= 92.25

#### B. ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Fisher Calculado	Fisher 0.05	Fisher 0.01	Prob	Sign
Total	8	32.52	4.07					
Tratamiento	2	26.72	13.36	13.81	5.14	10.92	0.01	**
Error	6	5.80	0.97					

#### C. SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY

Sustratos	Medias	Rango	E.E.
canela	90.29	b	0.57
Té verde	92	ab	0.57
Café	94.48	a	0.57

**Anexo F:** Determinación de la acidez de la materia prima para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos.

### A. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Sustrato	Repeticiones			X
	I	II	II	
Té verde	0.10	0.20	0.10	0.13
Café	0.30	0.40	0.30	0.13
Canela	0.10	0.20	0.10	0.13

Coefficiente de Variación (CV):28.87 %

X= 0.13

### B. ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Fisher Calculado	Fisher		
					0.05	0.01	Prob Sign
Total	8	0.10	0.0125				
Tratamiento	2	0.08	0.04	12.00	5.14	10.92	0.01 *
Error	6	0.02	0.003				

### C. SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY

Sustratos	Medias	Rango	E.E.
canela	0.13	b	0.03
Té verde	0.13	b	0.03
Café	0.33	a	0.03

**Anexo G:** Determinación del pH de la materia prima para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos.

#### A. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Sustrato	Repeticiones			X
	I	II	II	
Té verde	7.14	7.15	7.15	7.15
Café	6.28	6.30	6.28	6.29
Canela	7.90	7.91	7.90	7.9

Coefficiente de Variación (CV): 0.11

X= 7.11

#### B. ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Fisher Calculado	Fisher 0.05	Fisher 0.01	Prob	Sign
Total	8	3.93	0.491					
Tratamiento	2	3.93	1.963	29443.17	5.14	10.92	0.00	**
Error	6	0.00	0.00007					

#### C. SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY

Sustratos	Medias	Rango	E.E.
Canela	6.29	c	4.70E-03
Té verde	7.15	b	4.70E-03
Café	7.9	a	4.70E-03



**Anexo H:** Determinación del pH inicial del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos.

### A. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Factor A	Factor B	REPETICIONES			
		I	II	III	X
<i>Acetobacter</i>	Té verde	4.51	4.38	4.38	4.42
<i>Acetobacter</i>	Café	4.47	4.57	4.56	4.53
<i>Acetobacter</i>	Canela	4.52	4.49	4.63	4.55
<i>Saccharomyces</i>	Té verde	4.51	4.38	4.38	4.42
<i>Saccharomyces</i>	Café	4.47	4.57	4.56	4.53
<i>Saccharomyces</i>	Canela	4.52	4.49	4.63	4.55

Coefficiente de Variación (CV): 1.52

X= 4.53

### B. ANALISIS DE VARIANZA

Grados								
Fuente de variación	de Libertad	Suma de Cuadrados	de Cuadrado medio	Fisher Calculado	Fisher 0.05	Fisher 0.01	Fisher Prob	Sign
Total	17.0	0.1						
Factor A	1.0	0.0	0.0	0.0	4.7	9.3	1.0	ns
Factor B	2.0	0.1	0.0	5.85	3.9	6.9	0.02	*
Int A*B	2.0	0.0	0.0	0.0	3.9	6.9	1.0	ns
Error	12.00	0.06	0.005					

### C. SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY

Sustrato	Medias	E.E.	Rango
Té verde	4.42	0.03	b
Café	4.53	0.03	a
Canela	4.55	0.03	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Anexo I:** Determinación del pH a las 24 horas del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

### A. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Factor A	Factor B	REPETICIONES			
		I	II	III	X
<i>Acetobacter</i>	Té verde	4.45	4.24	4.42	4.37
<i>Acetobacter</i>	Café	4.44	4.40	4.43	4.38
<i>Acetobacter</i>	Canela	4.42	4.37	4.34	4.42
<i>Saccharomyces</i>	Té verde	4.45	4.24	4.42	4.37
<i>Saccharomyces</i>	Café	4.44	4.40	4.43	4.38
<i>Saccharomyces</i>	Canela	4.42	4.37	4.34	4.42

Coefficiente de Variación (CV): 1.61

X= 4.39

### B. ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Fisher Calculado	Fisher 0.05	Fisher 0.01	Fisher Prob	Sign
Total	17	0.07						
Factor A	1	0.00	0.000	0.00	4.75	9.33	1.000	ns
Factor B	2	0.01	0.005	1.02	3.89	6.93	0.391	ns
Int A*B	2	0.00	0.000	0.00	3.89	6.93	1.000	ns
Error	12.00	0.06	0.005					

### C. SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY

Sustrato	Medias	E.E.	Rango
Té verde	4.37	0.03	a
Canela	4.38	0.03	a
Café	4.42	0.03	a

**Anexo J:** Determinación del pH a las 48 horas del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos.

### A. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Factor A	Factor B	REPETICIONES			
		I	II	III	X
<i>Acetobacter</i>	Té verde	4.80	4.21	4.38	4.36
<i>Acetobacter</i>	Café	4.43	4.41	4.42	4.42
<i>Acetobacter</i>	Canela	4.38	4.36	4.34	4.46
<i>Saccharomyces</i>	Té verde	4.80	4.21	4.38	4.36
<i>Saccharomyces</i>	Café	4.43	4.41	4.42	4.42
<i>Saccharomyces</i>	Canela	4.38	4.36	4.34	4.46

Coefficiente de Variación (CV): 3.98

X= 4.41

### B. ANALISIS DE VARIANZA

Grados								
Fuente de variación	de Libertad	Suma de Cuadrados	de Cuadrado medio	Fisher Calculado	Fisher 0.05	Fisher 0.01	Prob	Sign
Total	17	0.40						
Factor A	1	0.00	0.000	0.00	4.75	9.33	1.000	ns
Factor B	2	0.03	0.016	0.52	3.89	6.93	0.61	**
Int A*B	2	0.00	0.000	0.00	3.89	6.93	1.000	ns
Error	12	0.37	0.031					

### C. SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY

Sustrato	Medias	E.E.	Rango
Canela	4.36	0.07	a
Café	4.42	0.07	a
Té verde	4.46	0.07	a

**Anexo K:** Determinación del pH a las 72 horas del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

### A. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Factor A	Factor B	REPETICIONES			
		I	II	III	X
<i>Acetobacter</i>	Té verde	3.35	3.60	3.60	3.52
<i>Acetobacter</i>	Café	3.60	3.70	3.50	3.6
<i>Acetobacter</i>	Canela	4.37	4.36	4.35	4.36
<i>Saccharomyces</i>	Té verde	3.35	3.60	3.60	3.52
<i>Saccharomyces</i>	Café	3.60	3.70	3.50	3.6
<i>Saccharomyces</i>	Canela	4.37	4.36	4.35	4.36

Coefficiente de Variación (CV): 2.65

X= 3.83

### B. ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Fisher Calculado	Fisher 0.05	Fisher 0.01	Prob	Sign
Total	17	2.72	0.16					
Factor A	1	0.00	0.000	0.00	4.75	9.33	1.000	ns
Factor B	2	2.59	1.296	125.67	3.89	6.93	0.000	**
Int A*B	2	0.00	0.000	0.00	3.89	6.93	1.000	ns
Error	12	0.12	0.010					

### C. SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY

Sustrato	Medias	E.E.	Rango
Té verde	3.52	0.04	b
Café	3.6	0.04	b
Canela	4.36	0.04	a

**Anexo L:** Determinación del pH a las 96 horas del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

## A. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Factor A	Factor B	REPETICIONES			
		I	II	III	X
<i>Acetobacter</i>	Té verde	3.56	3.55	3.57	3.56
<i>Acetobacter</i>	Café	3.66	3.60	3.65	3.64
<i>Acetobacter</i>	Canela	4.38	4.35	4.34	4.36
<i>Saccharomyces</i>	Té verde	3.56	3.55	3.57	3.56
<i>Saccharomyces</i>	Café	3.66	3.60	3.65	3.64
<i>Saccharomyces</i>	Canela	4.38	4.35	4.34	4.36

Coefficiente de Variación (CV): 0.59

X= 3.85

## B. ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	de Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	de Cuadrado medio	Fisher Calculado	Fisher 0.05	Fisher 0.01	Prob	Sign
Total	17	2.32						
Factor A	1	0.00	0.000	0.00	4.75	9.33	1.000	ns
Factor B	2	2.32	1.159	2219.28	3.89	6.93	0.000	**
Int A*B	2	0.00	0.000	0.00	3.89	6.93		
Error	12	0.01	0.001					

## C. SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY

Sustrato	Medias	E.E.	Rango
Té verde	3.56	0.01	c
Café	3.64	0.01	b
Canela	4.36	0.01	a

**Anexo M:** Determinación del pH a las 120 horas del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

### A. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Factor A	Factor B	REPETICIONES			
		I	II	III	X
<i>Acetobacter</i>	Té verde	3.50	3.40	3.50	3.38
<i>Acetobacter</i>	Café	3.40	3.45	3.30	3.47
<i>Acetobacter</i>	Canela	4.37	4.35	4.65	4.46
<i>Saccharomyces</i>	Té verde	3.50	3.40	3.50	3.38
<i>Saccharomyces</i>	Café	3.40	3.45	3.30	3.47
<i>Saccharomyces</i>	Canela	4.37	4.35	4.65	4.46

Coefficiente de Variación (CV): 2.96

X= 3.77

### B. ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Fisher Calculado	Fisher 0.05	Fisher 0.01	Prob	Sign
Total	17	4.43						
Factor A	1	0.00	0.000	0.00	4.75	9.33	1.000	ns
Factor B	2	4.28	2.139	172.04	3.89	6.93	0.000	**
Int A*B	2	0.00	0.000	0.00	3.89	6.93	1.000	ns
Error	12	0.15	0.012					

### C. SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY

Sustrato	Medias	E.E.	Rango
Café	3.38	0.05	b
Té verde	3.47	0.05	b
Canela	4.46	0.05	a

**Anexo N:** Determinación de la acidez inicial del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

## A. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Factor A	Factor B	REPETICIONES			
		I	II	III	X
<i>Acetobacter</i>	Té verde	0.30	0.50	0.50	0.43
<i>Acetobacter</i>	Café	0.80	0.70	0.70	0.73
<i>Acetobacter</i>	Canela	0.40	0.40	0.40	0.40
<i>Saccharomyces</i>	Té verde	0.30	0.50	0.50	0.43
<i>Saccharomyces</i>	Café	0.80	0.70	0.70	0.73
<i>Saccharomyces</i>	Canela	0.40	0.40	0.40	0.40

Coefficiente de Variación (CV): 14.27

X= 0.52

## B. ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Fisher Calculado	Fisher 0.05	Fisher 0.01	Prob	Sign
Total	17	0.47						
Factor A	1	0.00	0.000	0.00	4.75	9.33	1.000	ns
Factor B	2	0.40	0.202	36.40	3.89	6.93	0.000	**
Int A*B	2	0.00	0.000	0.00	3.89	6.93	1.000	ns
Error	12	0.07	0.006					

## C. SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY

Sustrato	Medias	E.E.	Rango
Café	0.40	0.03	b
Té verde	0.43	0.03	b
Canela	0.73	0.03	a

**Anexo O:** Determinación de la acidez a las 24 horas del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

### A. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Factor A	Factor B	REPETICIONES			
		I	II	III	X
<i>Acetobacter</i>	Té verde	0.65	0.50	0.50	0.55
<i>Acetobacter</i>	Café	0.85	0.80	0.80	0.82
<i>Acetobacter</i>	Canela	0.30	0.30	0.30	0.3
<i>Saccharomyces</i>	Té verde	0.65	0.50	0.50	0.55
<i>Saccharomyces</i>	Café	0.85	0.80	0.80	0.82
<i>Saccharomyces</i>	Canela	0.30	0.30	0.30	0.3

Coefficiente de Variación (CV): 9.49

X= 0.56

### B. ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Fisher Calculado	Fisher			Sign
					0.05	0.01	Prob	
Total	17	0.83						
Factor A	1	0.00	0.000	0.00	4.75	9.33	1.000	ns
Factor B	2	0.80	0.401	144.20	3.89	6.93	0.000	**
Int A*B	2	0.00	0.000	0.00	3.89	6.93	1.000	ns
Error	12	0.03	0.003					

### C. SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY

Sustrato	Medias	E.E.	Rango
Canela	0.3	0.02	c
Té verde	0.55	0.02	b
Café	0.82	0.02	a



**Anexo P:** Determinación de la acidez a las 48 horas del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

### A. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Factor A	Factor B	REPETICIONES			
		I	II	III	X
<i>Acetobacter</i>	Té verde	0.70	0.50	0.50	0.57
<i>Acetobacter</i>	Café	0.80	0.70	0.80	0.77
<i>Acetobacter</i>	Canela	0.30	0.30	0.30	0.3
<i>Saccharomyces</i>	Té verde	0.70	0.50	0.50	0.57
<i>Saccharomyces</i>	Café	0.80	0.70	0.80	0.77
<i>Saccharomyces</i>	Canela	0.30	0.30	0.30	0.3

Coefficiente de Variación (CV):. 13.69

X= 0.55

### B. ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Fisher Calculado	Fisher			Sign
					0.05	0.01	Prob	
Total	17	0.72						
Factor A	1	0.00	0.000	0.00	4.75	9.33	1.000	ns
Factor B	2	0.66	0.329	59.20	3.89	6.93	0.000	**
Int A*B	2	0.00	0.000	0.00	3.89	6.93		
Error	12	0.07	0.006					

### C. SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY

Sustrato	Medias	E.E.	Rango
Canela	0.3	0.03	c
Té verde	0.57	0.03	b
Café	0.77	0.03	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Anexo Q:** Determinación de la acidez a las 72 horas del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos.

### A. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Factor A	Factor B	REPETICIONES			
		I	II	III	X
Acetobacter	Té verde	1.20	1.10	1.00	1.1
Acetobacter	Café	1.10	1.10	1.10	1.1
Acetobacter	Canela	0.30	0.50	0.30	0.37
<i>Saccharomyces</i>	Té verde	1.20	1.10	1.00	1.1
<i>Saccharomyces</i>	Café	1.10	1.10	1.10	1.1
<i>Saccharomyces</i>	Canela	0.30	0.50	0.30	0.37

Coefficiente de Variación (CV): 10.31

X= 0.86

### B. ANALISIS DE VARIANZA

Grados								
Fuente de variación	de Libertad	Suma de Cuadrados	de Cuadrado medio	Fisher Calculado	Fisher 0.05	Fisher 0.01	Prob	Sign
Total	17	2.24						
Factor A	1	0.00	0.000	0.00	4.75	9.33	1.000	ns
Factor B	2	2.15	1.076	138.29	3.89	6.93	0.000	**
Int A*B	2	0.00	0.000	0.00	3.89	6.93	1.000	ns
Error	12	0.09	0.008					

### C. SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY

Sustrato	Medias	E.E.	Rango
Canela	0.37	0.04	b
Té verde	1.1	0.04	a
Café	1.1	0.04	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Anexo R:** Determinación de la acidez a las 96 horas del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

## A. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Factor A	Factor B	REPETICIONES			
		I	II	III	X
<i>Acetobacter</i>	Té verde	1.50	1.10	1.20	1.27
<i>Acetobacter</i>	Café	1.30	1.20	1.20	1.23
<i>Acetobacter</i>	Canela	0.30	0.30	0.30	0.3
<i>Saccharomyces</i>	Té verde	1.50	1.10	1.20	1.27
<i>Saccharomyces</i>	Café	1.30	1.20	1.20	1.23
<i>Saccharomyces</i>	Canela	0.30	0.30	0.30	0.3

Coefficiente de Variación (CV):13.36

X= 0.93

## B. ANALISIS DE VARIANZA

Grados								
Fuente de variación	de Libertad	Suma de Cuadrados	de Cuadrado medio	Fisher Calculado	Fisher 0.05	Fisher 0.01	Fisher Prob	Sign
Total	17	3.80						
Factor A	1	0.00	0.000	0.00	4.75	9.33	1.000	ns
Factor B	2	3.61	1.807	116.14	3.89	6.93	0.000	**
Int A*B	2	0.00	0.000	0.00	3.89	6.93	1.000	ns
Error	12	0.19	0.016					

## C. SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY

Sustrato	Medias	E.E.	Rango
Canela	0.3	0.05	b
Té verde	1.23	0.05	a
Café	1.27	0.05	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Anexo S:** Determinación de la acidez a las 120 horas del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

### A. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Factor A	Factor B	REPETICIONES			
		I	II	III	X
<i>Acetobacter</i>	Té verde	1.40	1.20	1.20	1.27
<i>Acetobacter</i>	Café	1.30	1.30	1.40	1.33
<i>Acetobacter</i>	Canela	0.30	0.30	0.30	0.3
<i>Saccharomyces</i>	Té verde	1.40	1.20	1.20	1.27
<i>Saccharomyces</i>	Café	1.30	1.30	1.40	1.33
<i>Saccharomyces</i>	Canela	0.30	0.30	0.30	0.3

Coefficiente de Variación (CV): 7.71

X= 0.97

### B. ANALISIS DE VARIANZA

Grados								
Fuente de de variación	Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Fisher Calculado	Fisher 0.05	Fisher 0.01	Fisher Prob	Sign
Total	17	4.08						
Factor A	1	0.00	0.000	0.00	4.75	9.33	1.000	ns
Factor B	2	4.01	2.007	361.20	3.89	6.93	0.000	**
Int A*B	2	0.00	0.000	0.00	3.89	6.93	1.000	ns
Error	12	0.07	0.006					

### C. SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY

Sustrato	Medias	E.E.	Rango
Canela	0.3	0.03	b
Té verde	1.27	0.03	a
Café	1.33	0.03	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Anexo T:** . Determinación del alcohol a las 24 horas del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

### A. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Factor A	Factor B	REPETICIONES			
		I	II	III	X
Acetobacter	Té verde	0.50	0.40	0.40	0.43
Acetobacter	Café	0.50	0.50	0.40	0.47
Acetobacter	Canela	0.00	0.00	0.00	0
<i>Saccharomyces</i>	Té verde	0.50	0.40	0.40	0.43
<i>Saccharomyces</i>	Café	0.50	0.50	0.40	0.47
<i>Saccharomyces</i>	Canela	0.00	0.00	0.00	0

Coefficiente de Variación (CV):15.71

X= 0.3

### B. ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Fisher Calculado	Fisher 0.05	Fisher 0.01	Prob	Sign
Total	17	0.84						
Factor A	1	0.00	0.000	0.00	4.75	9.33	1.000	ns
Factor B	2	0.81	0.407	183.00	3.89	6.93	0.000	**
Int A*B	2	0.00	0.000	0.00	3.89	6.93	1.000	ns
Error	12	0.03	0.002					

### C. SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY

Sustrato	Medias	E.E.	Rango
Canela	0	0.02	b
Té verde	0.43	0.02	a
Café	0.47	0.02	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Anexo U:** Determinación del alcohol a las 48 horas del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

### A. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Factor A	Factor B	REPETICIONES				X
		I	II	III		
Acetobacter	Té verde	0.80	0.90	0.90	0.87	
Acetobacter	Café	0.90	0.90	0.90	0.9	
Acetobacter	Canela	0.00	0.00	0.00	0	
Saccharomyces	Té verde	0.80	0.90	0.90	0.87	
Saccharomyces	Café	0.90	0.90	0.90	0.9	
Saccharomyces	Canela	0.00	0.00	0.00	0	

Coefficiente de Variación (CV): 5.66

X= 0.6

### B. ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Fisher Calculado	Fisher			Sign
					0.05	0.01	Prob	
Total	17	3.14						
Factor A	1	0.00	0.000	0.00	4.75	9.33	1.000	ns
Factor B	2	3.12	1.562	1406.00	3.89	6.93	0.000	**
Int A*B	2	0.00	0.000	0.00	3.89	6.93	1.000	ns
Error	12	0.01	0.001					

### C. SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY

Sustrato	Medias	E.E.	Rango
Canela	0	0.01	b
Té verde	0.87	0.01	a
Café	0.9	0.01	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Anexo V:** Determinación del alcohol a las 72 horas del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos.

### A. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Factor A	Factor B	REPETICIONES			
		I	II	III	X
<i>Acetobacter</i>	Té verde	0.60	0.70	0.70	0.67
<i>Acetobacter</i>	Café	0.60	0.70	0.60	0.63
<i>Acetobacter</i>	Canela	0.00	0.00	0.00	0
<i>Saccharomyces</i>	Té verde	0.60	0.70	0.70	0.67
<i>Saccharomyces</i>	Café	0.60	0.70	0.60	0.63
<i>Saccharomyces</i>	Canela	0.00	0.00	0.00	0

Coefficiente de Variación (CV): 10.88%

X= 0.43

### B. ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Fisher Calculado	Fisher 0.05	Fisher 0.01	Fisher Prob	Sign
Factor A	1	0.00	0.000	0.00	4.75	9.33	1.000	ns
Factor B	2	1.69	0.847	381.00	3.89	6.93	0.000	**
Int A*B	2	0.00	0.000	0.00	3.89	6.93	1.000	ns
Error	12.00	0.03	0.002					

### C. SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY

Sustrato	Medias	E.E.	Rango
Canela	0	0.02	b
Té verde	0.63	0.02	a
Café	0.67	0.02	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Anexo W:** . Determinación del alcohol a las 96 horas del producto para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos.

### A. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Factor A	Factor B	REPETICIONES			
		I	II	III	X
<i>Acetobacter</i>	Té verde	0.60	0.60	0.60	0.6
<i>Acetobacter</i>	Café	0.60	0.60	0.70	0.63
<i>Acetobacter</i>	Canela	0.00	0.00	0.00	0
<i>Saccharomyces</i>	Té verde	0.60	0.60	0.60	0.6
<i>Saccharomyces</i>	Café	0.60	0.60	0.70	0.63
<i>Saccharomyces</i>	Canela	0.00	0.00	0.00	0

Coefficiente de Variación (CV): 8.11%

X= 0.41

### B. ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Fisher Calculado	Fisher 0.05	Fisher 0.01	Fisher Prob	Sign
Factor A	1	0.00	0.000	0.00	4.75	9.33	1.000	ns
Factor B	2	1.52	0.762	686.00	3.89	6.93	0.000	**
Int A*B	2	0.00	0.000	0.00	3.89	6.93	1.000	ns
Error	12	0.01	0.001					

### C. SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY

Sustrato	Medias	E.E.	Rango
Canela	0	0.01	b
Té verde	0.6	0.01	a
Café	0.63	0.01	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )



**Anexo X:** Determinación de la viabilidad microbiológica del inóculo en el tiempo inicial para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

### A. RESULTADOS EXPERIMENTALES

TIPO MIROORGANISMO	DE SUSTRATO	REPETICIONES			
		I	II	III	X
<i>Acetobacter aceti</i>	Canela	70	50	50	56.66
<i>Acetobacter aceti</i>	Café	50	50	40	46.66
<i>Acetobacter aceti</i>	Te	30	40	40	36.66
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Canela	0	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Café	0	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Te	0	0	0	0

Coefficiente de Variación (CV): 67.17 %

X= 23.33

### B. ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	de Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	Fisher calculado	Fisher 0.05	Fisher 0.01	Prob	Sign
Total	17	10800.00	635.29					
Tratamiento	5	10400.00	2080.00	62.400				
Factos A	1	9800.00	9800.00	294.000	4.75	9.33	8.4E-10	**
Factor B	2	300.00	150.00	4.500	3.89	6.93	0.03	ns
Interacción A*B	2	300.0000	150.00	4.500	3.89	6.93	0.03	ns
Error	12	400.00	33.33					

### C. SEPARACIÓN DE MEDIAS POR EFECTO DEL TIPO DE MICROORGANISMO

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=14.37332

Microorganismos	Medias	E.E.	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	4.66	b
<i>Acetobacter aceti</i>	41.67	4.66	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

#### D. SEPARACIÓN DE MEDIAS POR EFECTO DEL TIPO DE SUSTRATO

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=21.55491 Error: 195.8333 gl: 12

SUSTRATO	MEDIAS	E.E.	RANGO
Te	18.33	5.71	a
Canela	20.83	5.71	a
Café	23.33	5.71	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

#### E. SEPRACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY POR EFECTO DE LA INTERACCION ENTRE EL TIPO DE MICROORGANISMO Y EL SUSTRATO

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=38.37934 Error: 195.8333 gl: 12

MICROORGANISMO	SUSTRATO	MEDIAS	E.E.	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Café	0	8.08	a
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Canela	0	8.08	a
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Te	0	8.08	a
<i>Acetobacter aceti</i>	Te	36.67	8.08	a
<i>Acetobacter aceti</i>	Canela	41.67	8.08	a
<i>Acetobacter aceti</i>	Café	46.67	8.08	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Anexo Y:** Determinación de la viabilidad microbiológica del inóculo a las 24 horas para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

### A. RESULTADOS EXPERIMENTALES

TIPO MICROORGANISMO	DE SUSTRATO	REPETICIONES			
		I	II	III	X
<i>Acetobacter aceti</i>	Canela	70	60	60	63.33
<i>Acetobacter aceti</i>	Café	140	120	140	133.33
<i>Acetobacter aceti</i>	Te	150	140	170	153.33
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Canela	20	30	20	23.33
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Café	30	30	30	30
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Te	80	70	70	73.33

Coefficiente de Variación (CV): 11.1%

X= 79.49

### B. ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	de Grados de libertad	Suma de cuadrados	de Cuadrado Medio	Fisher calculado	Fisher 0.05	Fisher 0.01	Prob	Sign
Total	17	43694.44	2570.26					
Tratamiento	5	42761.11	8552.22	109.957				
Factos A	1	24938.89	24938.89	320.643	4.75	9.33	5.05E-10	**
Factor B	2	14744.44	7372.22	94.786	3.89	6.93	4.45E-08	**
Interacción A*B	2	3077.777	1538.89	19.786	3.89	6.93	1.59E-04	**
Error	12	933.33	77.78					

### C. SEPARACIÓN DE MEDIAS POR EFECTO DEL TIPO DE MICROORGANISMO

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=14.37332 Error: 195.8333 gl: 12			
Microorganismo	Medias	E.E.	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42.22	2.94	b
<i>Acetobacter aceti</i>	116.67	2.94	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

#### D. SEPARACIÓN DE MEDIAS POR EFECTO DEL TIPO DE SUSTRATO

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=21.55491 Error: 195.8333 gl: 12

SUSTRATO	MEDIAS	E.E.	RANGO
canela	43.33	3.6	c
café	81.67	3.6	b
te	113.33	3.6	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

#### E. SEPRACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY POR EFECTO DE LA INTERACCION ENTRE EL TIPO DE MICROORGANISMO Y EL SUSTRATO

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=38.37934 Error: 195.8333 gl: 12

MICROORGANISMO	SUSTRATO	MEDIAS	N	E.E.	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	canela	23.33	3	5.09	c
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	café	30	3	5.09	c
<i>Acetobacter aceti</i>	canela	63.33	3	5.09	b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	te	73.33	3	5.09	b
<i>Acetobacter aceti</i>	café	133.33	3	5.09	ab
<i>Acetobacter aceti</i>	te	153.33	3	5.09	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Anexo Z:** Determinación de la viabilidad microbiológica del inóculo a las 48 horas para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

### A. RESULTADOS EXPERIMENTALES

TIPO MICROORGANISMO	DE SUSTRATO	REPETICIONES			
		I	II	III	X
<i>Acetobacter aceti</i>	Canela	100	20	10	46.6
<i>Acetobacter aceti</i>	Café	140	140	150	143.33
<i>Acetobacter aceti</i>	Te	160	140	170	156.66
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Canela	0	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Café	20	20	30	23.33
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Te	30	30	30	30

Coefficiente de Variación (CV): 32.28 %

X= 66.65

### B. ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	de Grados de libertad	Suma de cuadrados	de Cuadrado Medio	Fisher calculado	Fisher 0.05	Fisher 0.01	Prob	Sign
Total	17	72027.78	4236.93					
Tratamiento	5	66561.11	13312.22	29.222				
Factos A	1	42050.00	42050.00	92.305	4.75	9.33	5.5E-07	**
Factor B	2	18077.78	9038.89	19.841	3.89	6.93	1.6E-04	**
Interacción A*B	2	6433.333	3216.67	7.061	3.89	6.93	9.4E-03	**
Error	12	5466.67	455.56					

### C. SEPARACIÓN DE MEDIAS POR EFECTO DEL TIPO DE MICROORGANISMO

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=14.37332 Error: 195.8333 gl: 12

Microorganismo	Medias	E.E.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17.78	7.11 b
<i>Acetobacter aceti</i>	114.44	7.11 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

#### D. SEPARACIÓN DE MEDIAS POR EFECTO DEL TIPO DE SUSTRATO

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=21.55491 Error: 195.8333 gl: 12

SUSTRATO	MEDIAS	E.E.	RANGO
canela	21.67	8.71	b
café	83.33	8.71	a
te	93.33	8.71	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

#### E. SEPRACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY POR EFECTO DE LA INTERACCION ENTRE EL TIPO DE MICROORGANISMO Y EL SUSTRATO

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=38.37934 Error: 195.8333 gl: 12

MICROORGANISMO	SUSTRATO	MEDIAS	N	E.E.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	canela	0	3	12.32 b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	café	23.33	3	12.32 b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	te	30	3	12.32 b
<i>Acetobacter aceti</i>	canela	43.33	3	12.32 b
<i>Acetobacter aceti</i>	café	143.33	3	12.32 a
<i>Acetobacter aceti</i>	te	156.67	3	12.32 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Anexo AA:** Determinación de la viabilidad microbiológica del inóculo a las 72 horas para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

#### A. RESULTADOS EXPERIMENTALES

TIPO MICROORGANISMO	DE SUSTRATO	REPETICIONES			
		I	II	III	X
<i>Acetobacter aceti</i>	Canela	0	0	0	0
<i>Acetobacter aceti</i>	Café	160	160	160	160
<i>Acetobacter aceti</i>	Te	180	200	180	186.67
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Canela	0	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Café	0	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Te	0	0	0	0

Coefficiente de Variación (CV): 8.16 %

X= 57.78

#### B. ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	de Grados de libertad	Suma de cuadrados	de Cuadrado Medio	Fisher calculado	Fisher	Fisher	Prob	Sign
						0.05	0.01	
Total	17	121511.11	7147.71					
Tratamiento	5	121244.44	24248.89	1091.20				
				0				
Factos A	1	60088.89	60088.89	2704.00	4.75	9.33	1.7E-	**
				0			15	
Factor B	2	30577.78	15288.89	688.000	3.89	6.93	4.2E-	**
							13	
Interacción A*B	2	30577.777	15288.89	688.000	3.89	6.93	4.2E-	**
			8				13	
Error	12	266.67	22.22					

### C. SEPARACIÓN DE MEDIAS POR EFECTO DEL TIPO DE MICROORGANISMO

---

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=14.37332      Error: 195.8333 gl: 12

---

Microorganismo	Medias	E.E.	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	1.57	b
<i>Acetobacter aceti</i>	115.56	1.57	a

---

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

---

### D. SEPARACIÓN DE MEDIAS POR EFECTO DEL TIPO DE SUSTRATO

---

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=21.55491      Error: 195.8333 gl: 12

---

SUSTRATO	MEDIAS	E.E.	RANGO
canela	0	1.92	c
café	80	1.92	b
te	93.33	1.92	a

---

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

---

### E. SEPRACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY POR EFECTO DE LA INTERACCION ENTRE EL TIPO DE MICROORGANISMO Y EL SUSTRATO

---

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=38.37934      Error: 195.8333 gl: 12

---

MICROORGANISMO	SUSTRATO	MEDIAS	N	E.E.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	canela	0	3	2.72 c
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	café	0	3	2.72 c
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	te	0	3	2.72 c
<i>Acetobacter aceti</i>	canela	0	3	2.72 c
<i>Acetobacter aceti</i>	café	160	3	2.72 b
<i>Acetobacter aceti</i>	te	186.67	3	2.72 a

---

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

---



**Anexo BB:** Determinación de la viabilidad microbiológica del inóculo a las 96 horas para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos

#### A. RESULTADOS EXPERIMENTALES

TIPO MICROORGANISMO	DE SUSTRATO	REPETICIONES			
		I	II	III	X
<i>Acetobacter aceti</i>	Canela	0	0	0	0
<i>Acetobacter aceti</i>	Café	180	160	180	173
<i>Acetobacter aceti</i>	Te	200	210	190	200
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Canela	0	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Café	0	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Te	0	0	0	0

Coeficiente de Variación (CV): 10.02 %

X= 62.22

#### B. ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	de Grados de libertad	Suma de cuadrados	de Cuadrado Medio	Fisher calculado	Fisher 0.05	Fisher 0.01	Prob	Sign
Total	17	140911.11	8288.89					
Tratamiento	5	140444.44	28088.89	722.286				
Factos A	1	69688.89	69688.89	1792.000	4.75	9.33	2.0E-14	**
Factor B	2	35377.78	17688.89	454.857	3.89	6.93	4.9E-12	**
Interacción A*B	2	35377.7778	17688.89	454.857	3.89	6.93	4.9E-12	**
Error	12	466.67	38.89					

#### C. SEPARACIÓN DE MEDIAS POR EFECTO DEL TIPO DE MICROORGANISMO

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=14.37332

Microorganismo	Medias	E.E.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	2.08 b
<i>Acetobacter aceti</i>	124.44	2.08 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

#### D. SEPARACIÓN DE MEDIAS POR EFECTO DEL TIPO DE SUSTRATO

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=21.55491 Error: 195.8333 gl: 12

SUSTRATO	MEDIAS	N	E.E.	RANGO
canela	0	6	2.55	c
café	86.67	6	2.55	b
te	100	6	2.55	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

### E. SEPRACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY POR EFECTO DE LA INTERACCION ENTRE EL TIPO DE MICROORGANISMO Y EL SUSTRATO

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=38.37934 Error: 195.8333 gl: 12

MICROORGANISMO	SUSTRATO	MEDIAS	E.E.
<i>Acetobacter aceti</i>	canela	0	3.6 c
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	canela	0	3.6 c
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	café	0	3.6 c
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	te	0	3.6 c
<i>Acetobacter aceti</i>	café	173.33	3.6 b
<i>Acetobacter aceti</i>	te	200	3.6 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Anexo CC:** Determinación de la viabilidad microbiológica del inóculo a las 120 horas para determinar la viabilidad del *Acetobacter Aceti* y *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el *Medusomyces gisevi* (hongo kombucha), utilizando diferentes sustratos.

### A. RESULTADOS EXPERIMENTALES

TIPO MICROORGANISMO	DE SUSTRATO	REPETICIONES			
		I	II	III	X
<i>Acetobacter aceti</i>	Canela	0	0	0	0
<i>Acetobacter aceti</i>	Café	250	240	240	243
<i>Acetobacter aceti</i>	Te	200	190	210	200
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Canela	0	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Café	0	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Te	0	0	0	0

Coefficiente de Variación (CV): 6.38

X= 73.89

### B. ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	Fisher calculado	Fisher	Fisher	Prob	Sign
					0.05	0.01		
Total	17	199627.78	11742.8					
Tratamiento	5	199361.11	39872.2	1794.25				
Factos A	1	98272.22	98272.2	4422.25	4.75	9.33	8.9E-	**
Factor B	2	50544.44	25272.2	1137.25	3.89	6.93	2.1E-	**
Interacción A*B	2	50544.444	25272.2	1137.25	3.89	6.93	2.1E-	**
Error	12	266.67	22.22					

### C. SEPARACIÓN DE MEDIAS POR EFECTO DEL TIPO DE MICROORGANISMO

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=14.37332 Error: 195.8333 gl: 12

Microorganismo	Medias	E.E.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	1.57 b
<i>Acetobacter aceti</i>	147.78	1.57 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

### D. SEPARACIÓN DE MEDIAS POR EFECTO DEL TIPO DE SUSTRATO

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=21.55491 Error: 195.8333 gl: 12

SUSTRATO	MEDIAS	E.E.	RANGO
canela	0	1.92	c
te	100	1.92	b
café	121.67	1.92	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

### E. SEPRACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY POR EFECTO DE LA INTERACCION ENTRE EL TIPO DE MICROORGANISMO Y EL SUSTRATO

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=38.37934 Error: 195.8333 gl: 12

MICROORGANISMO	SUSTRATO	MEDIAS	E.E.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	te	0	2.72 c
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	canela	0	2.72 c
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	café	0	2.72 c
<i>Acetobacter aceti</i>	canela	0	2.72 c
<i>Acetobacter aceti</i>	te	200	2.72 b
<i>Acetobacter aceti</i>	café	243.33	2.72 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )