



Universidad de Sevilla. Escuela Politécnica Superior



Trabajo de Fin de Máster Universitario en Tecnología e Industria Alimentaria

OPTIMIZACIÓN EN LA FORMULACIÓN DE KOMBUCHA DE TÉ VERDE Y PANELA

Autor: Rubén Darío De la Torre Vaca

Tutor: María de la Montaña Durán Barrantes

Sevilla, 05 septiembre del 2022

OPTIMIZACIÓN EN LA FORMULACIÓN DE KOMBUCHA DE TÉ VERDE Y PANELA.

Resumen:

La kombucha es una bebida probiótica elaborada a partir de té azucarado. Se realizó un Diseño Experimental Central Compuesto 3^k analizándose cantidad de té y panela ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y días de fermentación con la Metodología de Superficie de Respuesta. Se encontró que el pH no evidencia mejora bajo las condiciones experimentales propuestas en el diseño y los grados Brix maximizan a 6.28 con $5.22 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de té y $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de panela con 8.74 días. La acidez, respecto al ácido acético, se maximiza a $4.953 \pm 0.351 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ con $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de té y $47.273 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de panela con 14 días. Y los polifenoles totales se maximizan a $531 \pm 21.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $537.6 \pm 26.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ con $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de té y $54.061 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de panela con 4 días, y con $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de té y $42.748 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de panela con 14 días, respectivamente.

Palabras clave: Kombucha, té, panela, fermentación, pH, Grados Brix, acidez, polifenoles

Abstract:

Kombucha is a probiotic drink made from sweetened tea. A 3^k Central Composite Experimental Design was carried out analyzing the amount of tea and raw sugar ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and days of fermentation with the Response Surface Methodology. It was found that the pH does not show results regarding the experimental design and the Brix degrees reach maximum 6.28 with $5.22 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of tea and $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of raw sugar (panela) at 8.74 days. The acidity regarding lactic acid reaches maximum $4.953 \pm 0.351 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ with $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of tea and $47.273 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of raw sugar at 14 days. And the total polyphenols reach maximum $531 \pm 21.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and $537.6 \pm 26.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ with $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of tea and $54.061 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of raw sugar at 4 days and $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of tea and $42.748 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of raw sugar at 14 days respectively.

Keywords: Kombucha, tea, panela, fermentation, pH, Brix degrees, acidity, polyphenols

ÍNDICES DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE ECUACIONES	5
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE GRÁFICOS	6
RESUMEN	8
1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Historia y contexto internacional	2
2.2. SCOPY	4
2.3. Preparación	6
2.4. Beneficios	8
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS PROPUESTOS	10
3.1. Hipótesis	10
3.2. Objetivos	10
3.2.1. Objetivo General	10
3.2.2. Objetivos Específicos	10
4. MATERIALES, TÉCNICAS Y MÉTODOS	11
4.1. Materiales	11
4.2. Técnicas analíticas	12
4.2.1. pH	12
4.2.2. Materia Seca Soluble (m.s.s.)	12
4.2.3. Acidez	13
4.2.4. Polifenoles	13

4.3. Metodología empleada en la experimentación	15
4.3.1. Diseño experimental	15
4.3.2. Factores de estudio	16
4.3.3. Análisis estadístico	18
4.3.4. Emplazamiento del experimento.....	18
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
5.1. Características analíticas	20
5.2. Diseño central compuesto circunscrito.....	21
5.2.1. pH.....	21
5.2.2. Materia Seca Soluble (m.s.s.).....	23
5.2.3. Acidez.....	30
5.2.4. Polifenoles	37
6. CONCLUSIONES.....	44
7. REFERENCIAS	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cuantificación de ácidos, azúcares, alcohol, pH y polifenoles en kombucha de té negro (Ivanisnová, y otros, 2020).....	4
Tabla 2. Niveles de los factores bajo Diseño Central Compuesto Circunscrito.....	16
Tabla 3. Tratamientos definidos bajo el Diseño Central Compuesto.	17
Tabla 4. Resultados analíticos obtenidos bajo Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC).	20
Tabla 5. Análisis de varianza y coeficientes de pH bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC).....	21
Tabla 6. Medidas descriptivas de pH bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC).	22
Tabla 7. Análisis de varianza y coeficientes de m.s.s. (°Brix) bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC).	23
Tabla 8. Análisis de varianza y coeficientes de m.s.s. (°Brix) bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) tras corrección de falta de ajuste.	25
Tabla 9. Optimización de la respuesta de m.s.s. (°Brix).....	28
Tabla 10. Análisis de varianza y coeficientes de Acidez bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC).	30
Tabla 11. Análisis de varianza y coeficientes de Acidez bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) tras corrección de falta de ajuste.....	32
Tabla 12. Optimización de la respuesta de Acidez.	35
Tabla 13. Análisis de varianza y coeficientes de Polifenoles bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC).	37
Tabla 14. Análisis de varianza y coeficientes de Polifenoles bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) tras corrección de falta de ajuste.	39
Tabla 15. Optimización de la respuesta de Polifenoles	43

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1 Acidez expresada en g*L ⁻¹ de ácido acético.....	13
Ecuación 2 Concentración de polifenoles expresados en mg*L ⁻¹ de GAE.....	14

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. SCOBY (elaboración propia).....	5
Figura 2. Composición química de la kombucha tradicional.....	7
Figura 3. Materiales (materias primas y auxiliares) usados en el experimento. ...	11
Figura 4. Refractómetro para medida de pH Milwaukee pH600.....	12
Figura 5. Refractómetro para medida de Materia Seca Soluble ATAGO N-1.....	12
Figura 6. Espectrofotómetro para medida de polifenoles ONDA V10 PLUS.	14
Figura 7 Diseño Central Compuesto Circunscrito.....	15

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Curva de calibración estándar ácido gálico.	14
Gráfico 2. Histograma de pH bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC).	22
Gráfico 3. Prueba de normalidad de residuos de m.s.s. (°Brix) bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) n=18.	24
Gráfico 4. Gráfica Normal de efectos estandarizados de m.s.s. (°Brix) bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) n=18.....	24
Gráfico 5. Prueba de normalidad de residuos de m.s.s. (°Brix) bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) tras corrección de falta de ajuste n=17.	26
Gráfico 6. Gráfica Normal de efectos estandarizados de m.s.s. (°Brix) bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) tras corrección de falta de ajuste n=17.....	26
Gráfico 7. Gráficas de respuesta de superficie para m.s.s. (°Brix).	27
Gráfico 8. Optimización de la respuesta de m.s.s. (°Brix).	28
Gráfico 9. Prueba de normalidad de residuos de Acidez bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) n=18.	31
Gráfico 10. Gráfica Normal de efectos estandarizados de Acidez bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) n=18.	31
Gráfico 11. Prueba de normalidad de residuos de Acidez bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) tras corrección de falta de ajuste n=17...	33

Gráfico 12. Gráfica Normal de efectos estandarizados de Acidez bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) tras corrección de falta de ajuste n=17.	33
Gráfico 13. Gráficas de respuesta de superficie para Acidez bajo la Interacción Té*Días de fermentación.	34
Gráfico 14. Optimización de la respuesta de Acidez.	35
Gráfico 15. Prueba de normalidad de residuos de Polifenoles bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) n=18.	38
Gráfico 16. Gráfica Normal de efectos estandarizados de Polifenoles bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) n=18.	38
Gráfico 17. Prueba de normalidad de residuos de Polifenoles bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) tras corrección de falta de ajuste n=17.	40
Gráfico 18. Gráfica Normal de efectos estandarizados de Polifenoles bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) tras corrección de falta de ajuste n=17.	40
Gráfico 19. Gráficas de respuesta de superficie para Polifenoles.	42
Gráfico 20. Optimización de la respuesta de Polifenoles.	43

RESUMEN

La kombucha es una bebida probiótica elaborada a partir de té azucarado. Sus orígenes se remontan al 220 A.C. en China y, posteriormente, tras ser utilizada como producto de medicina alternativa en Japón en el 414 D.C. su consumo se extendería por Asia y Europa, en primer lugar, en Rusia; y tras el pasar de los años llegando a ser conocida en Alemania e Italia en el siglo XX, en el contexto de la postguerra. Hoy en día la bebida ha llegado a ser producida industrialmente en la primera década del año 2000 (Júnior, Meireles Mafaldo, da Lima Brito, & Tribuzy de Magalhães Cordeiro, 2022).

La kombucha ha sido un tema de estudio y gran interés por sus beneficios para la salud y propiedades. Uno de los tópicos de mayor importancia acerca de la bebida es optimizar su elaboración para maximizar los efectos de sus propiedades (Dutta & Sanjib, 2019). Se sospecha que, el uso de azúcares fermentables sin refinar, tales como la “panela”, y el uso de una infusión de partida rica en antioxidantes, tal como el té verde, bajo un tiempo de fermentación corto no mayor a dos semanas de producción, evidenciará resultados favorables en términos de calidad del producto en relación con la cantidad de antioxidantes, expresados en contenido de polifenoles, acidez, expresada en contenido de ácido acético, pH y materia seca soluble, como grados Brix, en cuanto al contenido azucarado de la kombucha.

Por lo tanto, se llevó a cabo un experimento bajo un Diseño Central Compuesto Circunscrito analizado con la Metodología de Superficie de Respuesta, para encontrar y reportar la formulación óptima para maximizar del contenido de antioxidantes expresados en contenido de polifenoles, acidez expresada en contenido de ácido acético, Materia Seca Soluble m.s.s. expresada en grados Brix, y estabilización de pH aproximándose al rango de 4.0 - 4.2.

Los resultados obtenidos de las formulaciones evaluadas dieron lugar a un valor óptimo de pH de 4.07 para la estabilidad de la bebida kombucha. La formulación óptima para obtener mejor palatabilidad en relación con la m.s.s. tras fermentación de azúcares fue $5.22 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de té, $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de panela y 8.74 días de

fermentación obteniendo un máximo de 6.28 °Brix. Mientras que para obtener el mayor contenido de ácido acético $4.953 \pm 0.351 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, la formulación óptima fue $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de té, $47.273 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de panela y 14 días de fermentación. Finalmente, la formulación óptima de kombucha para obtener la cantidad máxima de $537.6 \pm 26.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de polifenoles (antioxidantes) fue $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de té, $42.748 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de panela y 14 días de fermentación. Sin embargo, se evidenció que la formulación $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de té, $54.061 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de panela y 4 días de fermentación permite maximizar el contenido de polifenoles a $531 \pm 21.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Se recomienda emplear estas formulaciones según el propósito específico (mejorar estabilidad, mejorar palatabilidad, maximizar contenido de ácido acético, maximizar cantidad de antioxidantes del té) de la elaboración de la bebida fermentada, kombucha de té verde y panela.

1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

La kombucha ha sido reconocida como uno de los productos funcionales más importantes y su producción y mercado son por mucho fascinantes, siendo un producto relativamente fácil de elaborar y es la bebida funcional con mayor crecimiento en el mercado de los productos fermentados no alcohólicos (Kapp & Sumner, 2019).

A pesar de que la bebida tiene una tradición de consumo de más de 2000 años de antigüedad, no ha evidenciado relevancia en el contexto de las bebidas fermentadas sino hasta la primera década del año 2000, donde en concreto en el año 2016 se masifica su producción (Kapp & Sumner, 2019).

La elaboración de té de kombucha se realiza empleando métodos tradicionales con té negro o verde, en donde la fuente de azúcares fermentables proviene especialmente del azúcar de mesa (sacarosa blanca refinada) (Panda, 2021). Este tipo de elaboración tradicional es uno de los aspectos más interesantes de la bebida pues, a pesar de que su elaboración involucra un proceso simple que no requiere sofisticación en cuando a equipos y aparatos, el producto final que se puede obtener es muy variable ya que comprende el uso de distintas materias primas de fuentes muy diversas en un proceso acondicionado a todo tipo de factores del entorno físico del productor de la bebida (Júnior, Meireles Mafaldo, da Lima Brito, & Tribuzy de Magalhães Cordeiro, 2022).

En la presente investigación se explorará una propuesta para determinar formulaciones idóneas para maximizar la respuesta de parámetros representativos de la calidad de la bebida (pH, Materia Seca Soluble, Acidez y Polifenoles totales), empleando al té verde y panela como materias primas en un rango de tiempo de fermentación entre 4 y 14 días. El cálculo estadístico correspondiente se realizará bajo un Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) con Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) bajo análisis cuadrático completo a un nivel de confiabilidad del 95%.

2. ANTECEDENTES

2.1. Historia y contexto internacional

La kombucha es una bebida probiótica elaborada a partir de té (*Camellia sinensis*) con la adición de un sustrato azucarado y fermentado con un conglomerado de microorganismos al que se denomina SCOBY por sus siglas *Symbiosis Culture Of Bateria and Yeast* compuesto principalmente de hongos y bacterias benéficas (Martínez, Valenzuela, Jayabalan, Huerta, & Anayansi, 2018). La bebida resultante es un producto fermentado levemente carbonatado, con sabor ligeramente dulce y ácido a la vez, con poca o nula presencia de alcohol (Jayabalan, Malbasa, Loncar, Vitas, & Sathishkumar, 2014).

La bebida se usó por primera vez en Asia. Posiblemente originada en Manchuria-China aproximadamente en el año 220 A.C. durante la dinastía Tsin, fue muy valorada por sus propiedades sanadoras, en especial por sus atributos energizantes y desintoxicantes. En el año 414 D.C. el médico Kombu llevó el té a Japón con el propósito de sanar al Emperador Inkyo, donde se popularizó su uso como medicina alternativa. Posteriormente, tras su popularidad como una bebida con propiedades sanadoras (la bebida de la vida eterna), su consumo se extendió por Asia (Jayabalan, Malbasa, Loncar, Vitas, & Sathishkumar, 2014).

El primer país europeo donde llegó la kombucha fue Rusia y más adelante su consumo se extendió por Europa del Este (Kapp & Sumner, 2019). Apareció en Alemania en torno a inicios del siglo XX y durante la segunda guerra mundial volvió a ser introducida a Alemania. En los años 50 llega a Francia y países norafricanos bajo dominio francés, donde fue relativamente popular, en el año 1952 un científico ruso logró aislar el compuesto activo de la kombucha al que denominó medusomicetina, el cual presenta propiedades antibióticas (Dubovskiy, 1952). Posteriormente en los años 60 científicos suizos reportan que beber kombucha permite alcanzar beneficios probióticos tales como: la estimulación del epitelio intestinal, incremento de antioxidantes, estimulación del sistema inmune; similares al consumo de yogurt, lo que populariza su consumo (Jayabalan, Malbasa, Loncar, Vitas, & Sathishkumar, 2014). En la misma década un científico alemán R. Sklener

introdujo a la kombucha a la práctica médica habitual (Stevens & Nieto, 2019) . Hoy en día, el consumo de kombucha se ha extendido a todo el mundo, encontrándose como eventos importantes la compra, por parte de PepsiCo, de la empresa KeVita en el año 2016 y el posterior incremento de ventas de bebidas fermentadas de 37.4% en el año 2017. Para el año 2018 en Estados Unidos el panorama de las bebidas fermentadas y en especial de la kombucha ha sido prometedor, encontrándose un crecimiento de 49% sobre el valor de un dólar, lo que la ha constituido como el producto con mayor crecimiento en el mercado de bebidas funcionales (Kapp & Sumner, 2019).

Uno de los aspectos más interesantes de la kombucha, tiene relación a su elaboración. Conlleva un proceso simple, considerando que no requiere el uso de equipos sofisticados o de escala industrial; y que sus materias primas son fácilmente obtenibles en la mayoría de los mercados del mundo (Jayabalan, Malbasa, Loncar, Vitas, & Sathishkumar, 2014). Sin embargo, hoy en día la elaboración de la bebida es muy variable, se emplean diferentes materias primas respondiendo a la variedad y tipo de té, disponibilidad y tipo de azúcares, distintivos consorcios microbiológicos y sus genotipos, y cambiantes técnicos de acondicionamiento y formulación. De manera que la determinación de una fórmula de elaboración se limita a la creatividad e inventiva de quien la produce incluyéndose, además, otros sustratos como son: jengibre, piel de plátano, soja, uvas, frutos rojos, etc. (Júnior, Meireles Mafaldo, da Lima Brito, & Tribuzy de Magalhães Cordeiro, 2022).

2.2. SCOBY

La simbiosis de microorganismos denominada SCOBY presenta hongos como *Schizosaccharomyces spp.*, *Candida spp.*, *Pichia spp.* (Panda, 2021), y especies de levaduras comunes del género *Saccharomyces* como *Saccharomyces boulardii* y *Saccharomyces. cerevisiae*, de conocida efectividad en la industria de productos fermentados (Kozyrovskaya, Reva, Goginyan, & de Vera, 2012).

Los géneros bacterianos más relevantes presentes en los cultivos fermentativos empleados como probióticos en la industria alimentaria corresponden a consorcios conformados por *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* u otros de similares características probióticas (Kozyrovskaya, Reva, Goginyan, & de Vera, 2012). En el conglomerado SCOBY, además de los mencionados previamente, se encuentran presentes, inclusive, más especies bacterianas benéficas como *Acetobacter spp.*, *Gluconobacter oxydans*, *Bacterium gluconicum* (Panda, 2021). Estas especies son los procariotas más abundantes en la kombucha y son pertenecientes a la familia *Acetobacteraceae*, que particularmente son organismos capaces de oxidar acetato en dióxido de carbono. De este grupo, *Acetobacter* es capaz de producir ácido acético a partir de etanol (Martínez, Valenzuela, Jayabalan, Huerta, & Anayansi, 2018), lo que explica la baja o nula presencia de alcohol en la kombucha al finalizar su proceso de producción como se puede apreciar en el Tabla 1.

Tabla 1. Cuantificación de ácidos, azúcares, alcohol, pH y polifenoles en kombucha de té negro (Ivanisnová, y otros, 2020).

Parámetro	Media \pm SD
Acidez total (g*L ⁻¹)	2.5 \pm 0.17
Ácido acético (g*L ⁻¹)	1.55 \pm 0.12
Sacarosa (g*L ⁻¹)	17.82 \pm 1.22
Glucosa (g*L ⁻¹)	9.35 \pm 0.98
Fructosa (g*L ⁻¹)	1.41 \pm 0.25
Alcohol (g*L ⁻¹)	0.4 \pm 0.03
Polifenoles totales (mg*L ⁻¹)	412.25 \pm 3.86

La simbiosis de estas diversas especies de hongos y bacterias favorece el crecimiento de un hongo llamado *Medusomyces gisevii* que es un hongo conocido como “hongo del té” que presenta propiedades antibióticas contra estafilococos y otras bacterias (Dubovskiy, 1952), favoreciendo el crecimiento de la bacteria *Acetobacter xylinum* debido al efecto antibiótico de la medusomicetina contra competidores bacterianos. Esta bacteria produce celulosa como un metabolito secundario que forma un biofilm (Figura 1). El conglomerado de hongos y bacterias finalmente se adhiere al biofilm de celulosa, formando una membrana en donde se encuentran en suspensión, protegidos de luz ultravioleta y con libre acceso a oxígeno (Martínez, Valenzuela, Jayabalan, Huerta, & Anayansi, 2018).

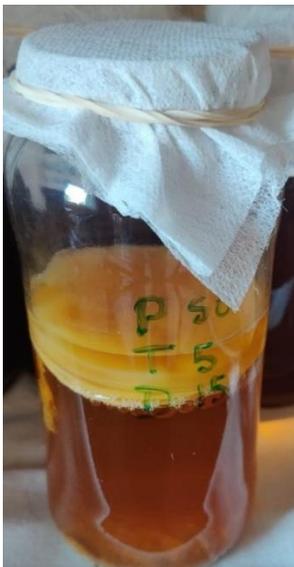


Figura 1. SCOBY (elaboración propia).

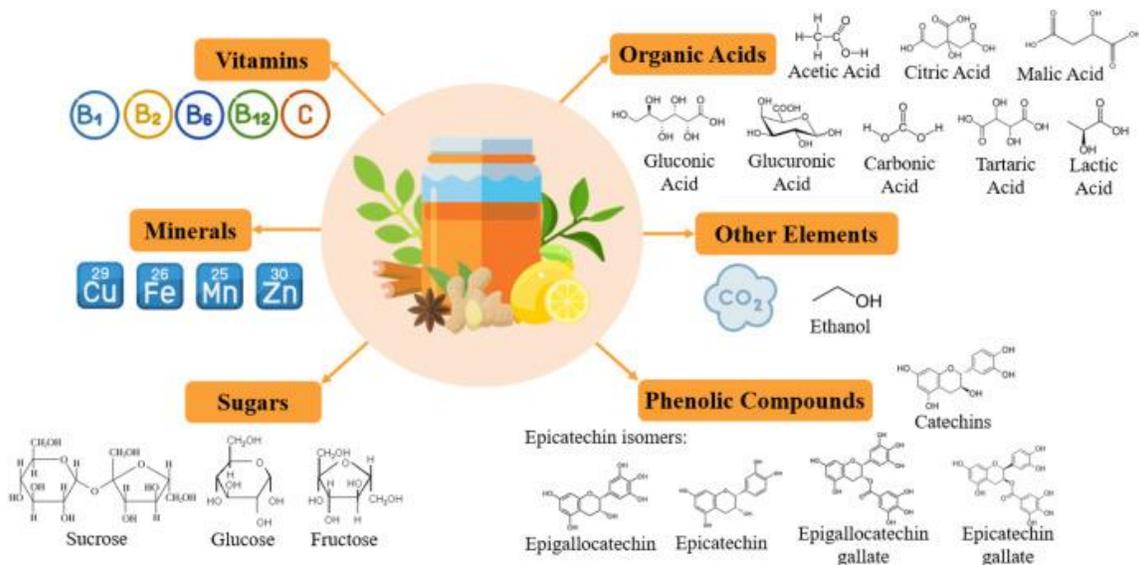
2.3. Preparación

La preparación típica de kombucha consiste en la infusión o extracción en agua hirviendo, de 5 gramos de hojas de té por litro de agua ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Posteriormente, se añade una cantidad de 50 gramos de azúcar por litro de agua ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), como sustrato de fermentación. Una vez que la bebida azucarada se enfríe y ha alcanzado los $20\text{ }^\circ\text{C}$, se pone en contacto ya sea con el sólido celulósico SCOBY o con una cantidad mínima de 10 mL de kombucha de uso anterior en un proceso absolutamente aséptico. Los contenedores empleados para la elaboración de kombucha deben permitir el intercambio aerobio y ser cubiertos por un tejido inerte e inocuo para este fin (Martínez, Valenzuela, Jayabalan, Huerta, & Anayansi, 2018).

A pesar de que el uso de $70\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de azúcar con $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de hojas de té ha sido recomendado en varias investigaciones, el uso de $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de azúcar se considera óptimo para la producción de etanol y ácidos orgánicos (Dutta & Sanjib, 2019). Uno de los factores más importantes en la producción de kombucha es el potencial de hidrógeno "pH". Se ha determinado que, al alcanzar un nivel cercano a 4.2 debe detenerse la fermentación, especialmente por la sobreproducción de ácido acético, que podría acidificar demasiado la bebida y comprometer su palatabilidad (Martínez, Valenzuela, Jayabalan, Huerta, & Anayansi, 2018).

La actividad metabólica de estos microorganismos sobre las complejas moléculas del té es la responsable de producir un "cocktail" de metabolitos de libre absorción que de otro modo serían difíciles de absorber a través de la mecánica digestiva del cuerpo humano (Kozyrovska, Reva, Goginyan, & de Vera, 2012). Los principales metabolitos derivados de este proceso fermentativo son azúcares como glucosa, fructosa y pequeñas proporciones de sacarosa; ácidos orgánicos en donde el predominante es el ácido acético y en menor proporción ácidos málico, glucónico, glucurónico, tartárico, láctico; aminoácidos (en especial lisina); vitaminas de complejo B y C; enzimas; minerales esenciales como el zinc, hierro, manganeso (Júnior, Meireles Mafaldo, da Lima Brito, & Tribuzy de Magalhães Cordeiro, 2022); antioxidantes constituidos principalmente por polifenoles como epicatequina, epicatequina 3 galato, epigalocatequina, epigalocatequina 3 galato y galocatequina

(Chakravorty, Bhattacharya, Bhattacharya, Sarkar, & Gachhui, 2019); una proporción baja de etanol y dióxido de carbono (Figura 2).



Images: Flaticon and Freepik (www.flaticon.com and www.freepik.com)

Figura 2. Composición química de la kombucha tradicional.

(Júnior, Meireles Mafaldo, da Lima Brito, & Tribuzy de Magalhães Cordeiro, 2022)

Usualmente el tiempo de fermentación comprende un mínimo de 3 días y puede extenderse hasta dos meses, el mismo que se ve afectado por la temperatura, considerando que a mayor temperatura se acorta el tiempo de fermentación por la actividad microbiana mesófila, que incrementa su tasa metabólica y reproductiva, mientras que a menor temperatura se alarga el tiempo de fermentación por la disminución de los procesos microbianos (Martínez, Valenzuela, Jayabalan, Huerta, & Anayansi, 2018). A pesar de esto, se ha establecido, en investigaciones previas, que es necesario optimizar el tiempo de fermentación de la bebida para asegurar su calidad de acuerdo con diversos escenarios de producción que se practiquen (Dutta & Sanjib, 2019).

2.4. Beneficios

El té se compone de aminoácidos, carbohidratos, proteínas, minerales, clorofilas, alcaloides diversos entre los que destacan la cafeína del té llamada teína y flavonoides. Dentro del contenido de flavonoides se evidencia especial presencia de catequinas, las cuales tienen alta capacidad antioxidante por su capacidad de barrer radicales y metales libres y, por ende, disminuir efectos degenerativos celulares. La presencia de polifenoles contribuye a la reducción del desarrollo de problemas cardiovasculares por la inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Adicionalmente, están involucrados en el metabolismo del colesterol inhibiendo la lipasa pancreática y aminorando la absorción excesiva de colesterol. Los polifenoles también se encuentran involucrados en la relajación muscular, inhibiendo la actividad de vasoconstrictores y previniendo la alta presión arterial (Martínez, Valenzuela, Jayabalan, Huerta, & Anayansi, 2018). La kombucha al ser un producto derivado del té, mantiene estas características siendo notable su contenido de polifenoles con alta capacidad antioxidante (Ivanisnová, y otros, 2020).

Algunos de los beneficios evidenciados en el consumo de kombucha, en estudios *in vitro* e *in vivo* son efectos antimicrobianos, estimulación inmunitaria, potencial desintoxicante y antioxidante, beneficios en funciones gastrointestinales y hepáticas, inhibición de la progresión de cáncer, degeneración cardiovascular, diabetes y alteraciones neurodegenerativas (Kapp & Sumner, 2019).

Además, la presencia de los microorganismos probióticos en la bebida confiere en quien lo consume un mejor balance intestinal de la microbiota y estimulación del sistema inmune (Kozyrovska, Reva, Goginyan, & de Vera, 2012). Considerando que, en términos generales, un grado bajo de pH aproximadamente entre 4 y 5 se encuentra relacionado a una mejora digestiva (García Luna & López Gallardo, 2007), la kombucha es una bebida con capacidad de favorecer la absorción y metabolismo de nutrientes.

La kombucha es una bebida que presenta tanto beneficios prebióticos como probióticos, en especial al mencionar la relación existente en microbiota y polifenoles. Un conocido efecto prebiótico de los polifenoles es la estimulación del

crecimiento microbiológico y cambio de la configuración de consorcios microbiológicos por inhibición en términos generales de patógenos, un ejemplo claro es el de estimulación del desarrollo de géneros bacterianos como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, que posteriormente exhiben propiedades probióticas. Algunos polifenoles, complejos, no llegan a ser absorbidos en el tracto gastrointestinal debido a su gran tamaño y otros presentan intensa actividad metabólica. Una alternativa para su aprovechamiento es la biotransformación de estos en compuestos más simples (de peso molecular más bajo), por medio de actividad de enzimas de microorganismos (Makarewicz, Drozd, Tarko, & Duda-Chodak, 2021).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS PROPUESTOS

3.1. Hipótesis

Hipótesis Nula (H_0): Las interacciones de factores de estudio para la formulación de kombucha no influyen en la optimización de las propiedades de pH, materia seca soluble, acidez o polifenoles.

Hipótesis Alternativa (H_1): Por lo menos existe una interacción de factores predominante en la formulación de kombucha para optimizar las propiedades de pH, materia seca soluble, acidez o polifenoles.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo General

Determinar las propiedades asociadas a la obtención de kombucha.

3.2.2. Objetivos Específicos

Determinar la formulación óptima en una elaboración de kombucha a partir de diferentes concentraciones de té verde y panela, y distintos tiempos de fermentación, con el fin de:

- a) Alcanzar un pH de 4.0-4.2, estándar para formulación de kombucha.
- b) Maximizar la cantidad de Materia Seca Soluble (contenido de grados Brix)
- c) Maximizar la acidez (contenido de ácido acético).
- d) Maximizar la cantidad de polifenoles, como antioxidantes representativos, para la mejora de las propiedades nutricionales de la kombucha.

4. MATERIALES, TÉCNICAS Y MÉTODOS

4.1. Materiales

Los ingredientes empleados en la elaboración de la kombucha fueron, té verde a granel, panela no refinada de la marca Azucarera Iberla S.L.U., agua potable de la red, cultivo iniciador de 20 mL*L⁻¹ de kombucha de experiencias anteriores.

El conjunto de ingredientes se adiciona en envases de vidrio llenos hasta 500 mL, y tapados con tela sujetada en la boca del envase, todo previamente esterilizado (Figura 3).



Figura 3. Materiales (materias primas y auxiliares) usados en el experimento.

4.2. Técnicas analíticas

4.2.1. pH

El potencial de hidrógeno se determinó con la medida resultante de la lectura de un pH metro (refractómetro) digital de bolsillo, de marca comercial Milwaukee pH600, cuyo rango de medición de pH es de 0 a 14 y con una precisión de 0,1 unidades y calibración con patrones de pH 4 y 7 (Figura 4).



Figura 4. Refractómetro para medida de pH Milwaukee pH600

4.2.2. Materia Seca Soluble (m.s.s.)

La Materia Seca Soluble fue determinada por la medida de grados Brix ($^{\circ}$ Brix) que se realizó visualmente, con el uso de un refractómetro a través de la lectura resultante del prisma del instrumento. El instrumento empleado es un refractómetro manual, de marca comercial ATAGO N-1 con escala 0-32 $^{\circ}$ Brix y precisión 0.5 $^{\circ}$ Brix (Figura 5).



Figura 5. Refractómetro para medida de Materia Seca Soluble ATAGO N-1.

4.2.3. Acidez

Para la acidez, se realizó determinación por titulación y ajustando el valor obtenido bajo el factor de acidez del ácido acético (AcOH) de 60 uma. Debido a que, durante la fermentación de la kombucha, la abundante presencia de organismos de la familia *Acetobacteraceae* y principalmente *Acetobacter*, transforma el alcohol producido por las levaduras en ácido acético. El método de determinación se realizó tomando una alícuota de 50 mL de muestra en un matraz de Erlenmeyer y aforando el volumen hasta 100 mL con agua destilada libre de dióxido de carbono CO₂. Se añadió 1 mL de fenolftaleína como reactivo indicador de la acidez y finalmente se tituló con hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 Normal (N) hasta el punto de viraje de fenolftaleína de pH≈8.2, comprobándose dicho valor con el pH metro electrónico.

Ecuación 1 Acidez expresada en g*L⁻¹ de ácido acético.

$$Acidez (g * L^{-1}) = \frac{Vol_{NaOH} * Norm_{NaOH} * F.acidez_{AcOH}}{Alicuota_{Muestra}}$$

4.2.4. Polifenoles

El contenido de polifenoles se determinó realizando la mezcla de 1000 µL de muestra de Kombucha con 500 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu en un tubo de ensayo y homogenizando el contenido. Posteriormente, se adicionan 2000 µL de carbonato de sodio al 20% al tubo de ensayo, se afora a 10 mL con agua destilada y se homogeniza de nuevo. A continuación, se procede a incubar la muestra, en oscuridad, por 40 minutos y, finalmente, se vierte el contenido en una celda traslúcida para realizar la lectura con el espectrofotómetro a 765 nm (Ivanisnová, y otros, 2020); (Kaewkod, Bovonsombut, & Tragoolpua, 2019).

Se utilizó ácido gálico (GAE) como un estándar para la obtención de una curva de calibración. Los resultados de la absorbancia y su consiguiente representación de concentración se expresan en mg*L⁻¹, empleándose la curva de calibración elaborada previamente (Gráfico 1, Ecuación 2).

Ecuación 2 Concentración de polifenoles expresados en $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de GAE.

$$\text{Concentración GAE (mg} \cdot \text{L}^{-1}) = \frac{[\text{Absorbancia} - 0.0998]}{0.0118}$$

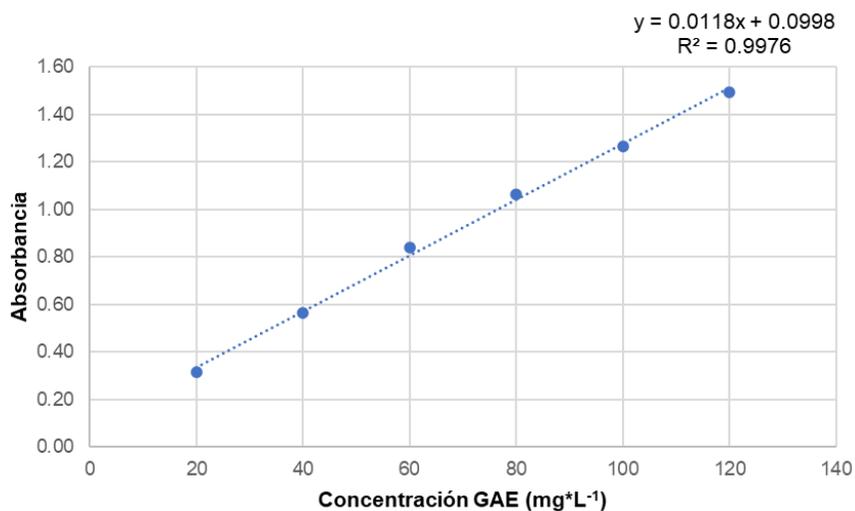


Gráfico 1 Curva de calibración estándar ácido gálico.

El instrumento empleado para la medida fue el espectrofotómetro ONDA V10 PLUS, con rango de 325 a 1000 nm, precisión de longitud de onda de ± 20 nm y ancho de banda espectral de 4 nm (Figura 6).



Figura 6. Espectrofotómetro para medida de polifenoles ONDA V10 PLUS.

4.3. Metodología empleada en la experimentación

4.3.1. Diseño experimental

Para el tratamiento de datos obtenidos en el presente trabajo de investigación se empleó el Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) analizado con la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) bajo análisis cuadrático completo a un nivel de confiabilidad del 95% (Figura 7).

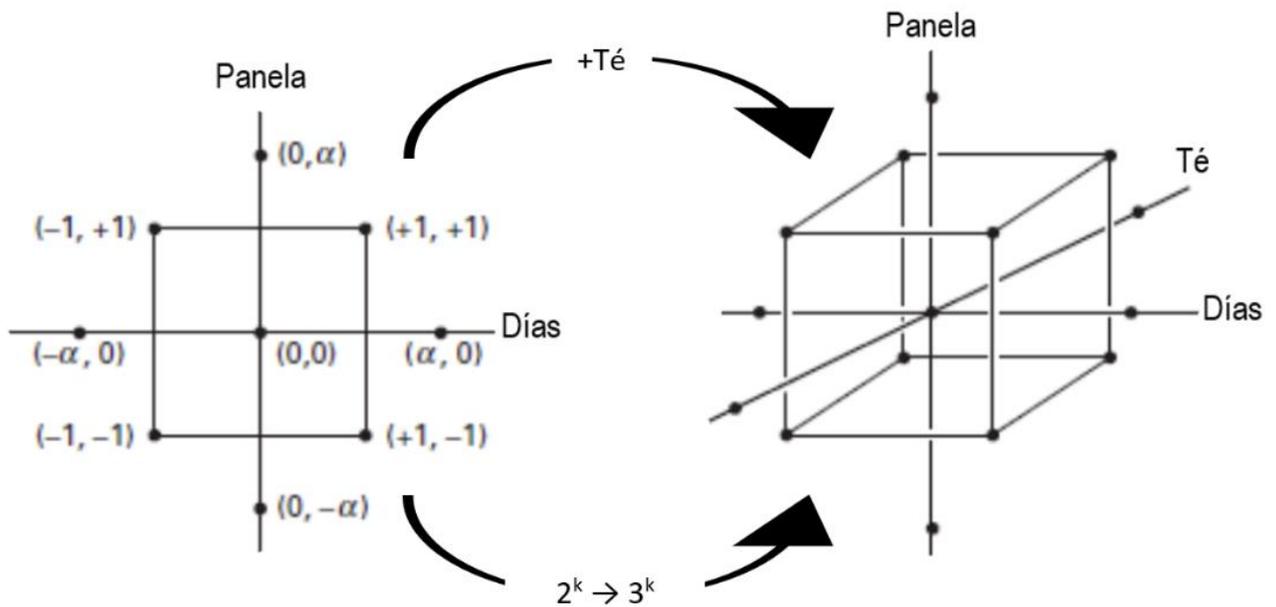


Figura 7 Diseño Central Compuesto Circunscrito.

**Izquierda Diseño bajo el efecto de 2 factores "2k"*

**Derecha Diseño bajo el efecto de 3 factores "3k".*

4.3.2. Factores de estudio

El estudio incluyó tres factores de interés “ 3^k ”. La cantidad de infusión de té bajo los límites de especificación, basados en estudios previos, de 3 y 7 g*L⁻¹ y un punto medio de 5 g*L⁻¹. La cantidad de panela bajo los límites de especificación de 40 y 60 g*L⁻¹ y un punto medio de 50 g*L⁻¹. Y, el tiempo de fermentación bajo los límites de especificación de 4 y 14 días desde el inicio del experimento y un punto medio de 9 días (Tabla 2).

Tabla 2. Niveles de los factores bajo Diseño Central Compuesto Circunscrito.

Factor	Punto Axial Mínimo (- α)	Punto Factorial Mínimo (-1)	Punto Central (0)	Punto Factorial Máximo (1)	Punto Axial Máximo (α)
^b Té [g*L ⁻¹]	3	4 ^a	5	6 ^a	7
^c Panela [g*L ⁻¹]	40	44 ^a	50	56 ^a	60
^d Fermentación [d]	4	6 ^a	9	12 ^a	14

^a Valores fueron aproximados a debido a error de precisión de balanza

^b Pendiente de los puntos $m= 1.1890$

^c Pendiente de los puntos $m= 5.9453$

^d Pendiente de los puntos $m= 2.9726$

La combinación de los niveles de los factores cantidad de té, cantidad de panela y días de fermentación, dio lugar a 18 tratamientos o experiencias experimentales considerados dentro del estudio. Una determinación más detallada de los mismos se encuentra a continuación (Tabla 3).

Tabla 3. Tratamientos definidos bajo el Diseño Central Compuesto.

Experiencia (Tratamiento)	Puntos en Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC)			Niveles de los factores de estudio		
	Té	Panela	Días	Té (g)	Panela (g)	Días
1	-1	-1	-1	4	44	6
2	1	-1	-1	6	44	6
3	-1	1	-1	4	56	6
4	1	1	-1	6	56	6
5	-1	-1	1	4	44	12
6	1	-1	1	6	44	12
7	-1	1	1	4	56	12
8	1	1	1	6	56	12
9	α	0	0	7	50	9
10	$-\alpha$	0	0	3	50	9
11	0	α	0	5	60	9
12	0	$-\alpha$	0	5	40	9
13	0	0	α	5	50	14
14	0	0	$-\alpha$	5	50	4
15	0	0	0	5	50	9
16	0	0	0	5	50	9
17	0	0	0	5	50	9
18	0	0	0	5	50	9

4.3.3. Análisis estadístico

Se realizó un Análisis de Varianza “ANOVA” de las fuentes de variación del experimento en donde, la significancia del ratio o estadístico F de Fisher-Snedecor “F” se representó con la nomenclatura ^{NS} No significativo, * significativo a 0,05; ** significativo a 0,01; *** significativo a 0,001; al comparar el valor p “p” con el valor de significancia. Para de evaluar el efecto de la correlación de las variables (multicolinealidad) en el análisis de regresión del modelo propuesto, se determinó el Factor de Inflación de la Varianza (FIV).

Se aplicó un análisis de los datos recopilados de acuerdo con cada variable de respuesta por separado. A fin de mantener un coeficiente de determinación alto ($R^2 > 0.95$), se llevó a cabo una prueba gráfica de normalidad de los residuos con la finalidad de eliminar datos atípicos no ajustados al modelo propuesto. Esta eliminación se llevó a cabo con un mínimo de una experiencia y un máximo de dos con el objeto de mantener consistencia. Se presentó un gráfico normal de los efectos estandarizados de las fuentes de variación con el objeto de determinar gráficamente su significancia para cada variable de respuesta.

A partir de los ajustes requeridos de acuerdo con el análisis de normalidad, se realizó una segunda prueba con la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), y se presentaron gráficos de superficie bajo un análisis cuadrático completo. Finalmente, se generó una optimización de la respuesta para cada variable por separado, reportando el valor esperado y su error estándar e incluyendo un intervalo de confianza “IC” al 95%.

Todos los análisis se realizaron empleando el software estadístico Minitab en su versión 20.3 de 64-bit (Minitab LCC, 2021).

4.3.4. Emplazamiento del experimento

Las unidades experimentales consideradas fueron frascos estériles de vidrio para fermentación de kombucha bajo el régimen conjunto de cantidad de té, panela y días de fermentación, distribuidos dentro de un área fresca, seca y aislada en el laboratorio de química de alimentos de la Escuela Politécnica Superior de la

Universidad de Sevilla. Las condiciones de aislamiento permitieron, eliminar la exposición directa a la luz solar así mismo como a corrientes de aire o tránsito de posibles agentes contaminantes.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Características analíticas

A continuación, se muestran los valores obtenidos en las variables de respuesta para cada una de las experiencias diseñadas en el estudio (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados analíticos obtenidos bajo Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC).

Experiencia (Tratamiento)	Niveles de los factores de estudio			Parámetros de estudio			
	Té	Panela	Días	Acidez (g AcOH*L ⁻¹)	Polifenoles Totales (mg GAE*L ⁻¹)	pH	m.s.s. (°Brix)
1	4	44	6	3.60	389.00	4.2	4.8
2	6	44	6	3.12	398.32	3.9	3.1
3	4	56	6	1.92	344.08	4.0	4.9
4	6	56	6	3.12	411.88	4.0	5.0
5	4	44	12	3.54	422.05	4.1	4.0
6	6	44	12	3.72	348.32	3.9	3.8
7	4	56	12	3.24	333.07	4.0	5.0
8	6	56	12	3.54	356.8	4.1	4.9
9	7	50	9	4.14	418.66	3.9	1.2
10	3	50	9	2.70	393.24	4.2	3.0
11	5	60	9	2.64	363.58	4.2	6.0
12	5	40	9	2.52	327.98	4.1	4.2
13	5	50	14	4.02	426.29	4.0	3.5
14	5	50	4	1.86	412.73	4.5	5.2
15	5	50	9	3.00	383.07	4.0	4.8
16	5	50	9	3.30	386.46	4.0	4.8
17	5	50	9	2.94	380.53	4.1	4.8
18	5	50	9	3.06	387.31	4.1	4.9

5.2. Diseño central compuesto circunscrito

5.2.1. pH

A un nivel de confiabilidad del 95%, no se encontró un efecto significativo de interacciones o factores para el modelo propuesto en relación con el pH, como puede observarse en los valores del ratio F de Fisher-Snedecor (F) y el valor-p (p) asociado al mismo representados en la Tabla 5. De acuerdo con la falta de ajuste del modelo, no es recomendable continuar con análisis posteriores ($F_{5,3}=8.48^{NS}$, $p=0.054$, $R^2=0.5752$, Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de varianza y coeficientes de pH bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC).

Fuente de Variación	GL	CM	F	Valor p	Coef	EE	FIV
Modelo	9	0.023	1.2 ^{NS}	0.402		0.098	
Lineal	3	0.034	1.77 ^{NS}	0.23			
<i>Té</i>	1	0.057	3.02 ^{NS}	0.121	-0.121	0.069	1.02
<i>Panela</i>	1	0.003	0.17 ^{NS}	0.693	0.026	0.063	1.02
<i>Días</i>	1	0.04	2.14 ^{NS}	0.182	-0.102	0.07	1.04
Cuadrado	3	0.011	0.57 ^{NS}	0.648			
<i>Té*Té</i>	1	0.004	0.22 ^{NS}	0.651	-0.055	0.116	1.16
<i>Panela*Panela</i>	1	0.001	0.03 ^{NS}	0.862	0.02	0.112	1.14
<i>Días*Días</i>	1	0.02	1.05 ^{NS}	0.335	0.118	0.115	1.19
Interacciones	3	0.018	0.97 ^{NS}	0.454			
<i>Té*Panela</i>	1	0.045	2.38 ^{NS}	0.161	0.25	0.162	1
<i>Té*Días</i>	1	0.004	0.21 ^{NS}	0.659	0.088	0.193	1.02
<i>Panela*Días</i>	1	0.006	0.31 ^{NS}	0.591	0.09	0.161	1.02
Error	8	0.019					
Falta de ajuste	5	0.028	8.48 ^{NS}	0.054			
Error puro	3	0.003					
Coef. Determinación (R²)		= 0.5752	n=18				

La ausencia de diferencias significativas es un indicativo de homogeneidad en los resultados obtenidos, es decir, no presentan variabilidad estadística. Y, sin embargo, tras realizar una determinación numérica de pH (Tabla 6), se puede concluir que se alcanzó un valor de pH homogéneo y dentro del rango 4.0-4.2 establecido para el experimento (C.V.=3.55%, $\mu=4.0722$, Tabla 6). Esto es un indicativo de estabilidad (Gráfico 2) para cualquiera de los escenarios (experiencias) planteados. Sin embargo, y a fin de propiciar una investigación más profunda, al replicar la experiencia, se sugiere considerar factores como el tipo de té, otras fuentes de azúcares o efecto de segunda fermentación; y a su vez, que se empleen aparatos con mayor sensibilidad.

Tabla 6. Medidas descriptivas de pH bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC).

Variable	N	Media \pm SD	Coefficiente de Variación (%)
pH	18	4.0722 \pm 0.0341	3.55

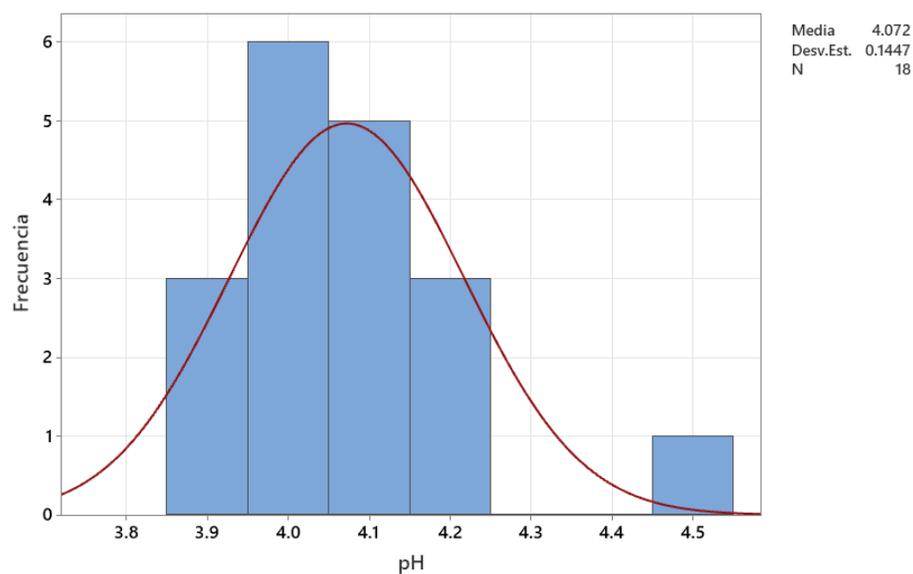


Gráfico 2. Histograma de pH bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC).

5.2.2. Materia Seca Soluble (m.s.s.)

A un nivel de confiabilidad del 95%, no se encontró un efecto significativo de interacciones para el modelo propuesto en relación con los grados Brix, tal y como indican los valores de F y p en Tabla 7. De acuerdo con la falta de ajuste, es posible realizar cambios para evaluar la respuesta del modelo ($F_{5,3}=113.9$, $p=0,001^{***}$, $R^2=0.9301$, Tabla 7). Tras realizar el análisis del supuesto de normalidad, se encontró un efecto no significativo de la experiencia número 6 (Gráfico 3). Se procedió a eliminar esta experiencia para incrementar la significancia de las interacciones sobre los factores del modelo (Gráfico 4).

Tabla 7. Análisis de varianza y coeficientes de m.s.s. (°Brix) bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC).

Fuente de Variación	GL	CM	F	Valor p	Coef	EE	FIV
Modelo	9	2.116	11.83**	0.001		0.098	
Lineal	3	2.131	11.91**	0.003			
<i>Té</i>	1	1.708	9.55*	0.015	-0.66	0.214	1.02
<i>Panela</i>	1	3.658	20.45**	0.002	0.876	0.194	1.02
<i>Días</i>	1	1.028	5.75*	0.043	-0.513	0.214	1.04
Cuadrado	3	3.997	22.34***	<0.001			
<i>Té*Té</i>	1	9.894	55.3***	<0.001	-2.663	0.358	1.16
<i>Panela*Panela</i>	1	0.236	1.32 ^{NS}	0.284	0.397	0.346	1.14
<i>Días*Días</i>	1	0.338	1.89 ^{NS}	0.206	-0.486	0.354	1.19
Interacciones	3	0.203	1.14 ^{NS}	0.391			
<i>Té*Panela</i>	1	0.451	2.52 ^{NS}	0.151	0.792	0.498	1
<i>Té*Días</i>	1	0.156	0.87 ^{NS}	0.377	0.554	0.592	1.02
<i>Panela*Días</i>	1	0.002	0.01 ^{NS}	0.924	0.048	0.494	1.02
Error	8	0.179					
Falta de ajuste	5	0.285	113.9**	0.001			
Error puro	3	0.003					
Coef. Determinación (R²) = 0.9301				n=18			

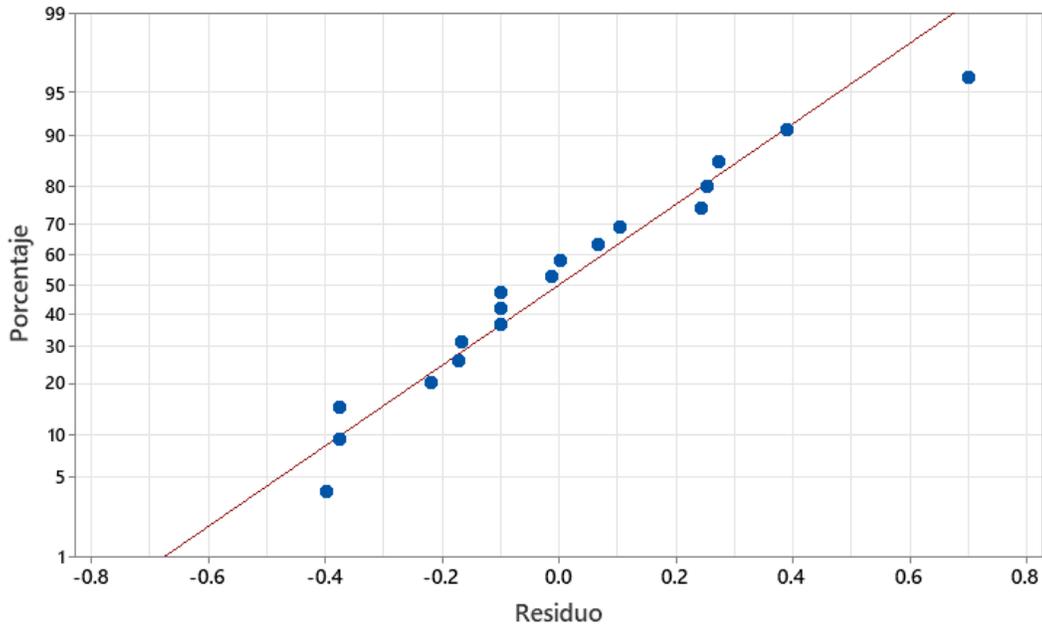


Gráfico 3. Prueba de normalidad de residuos de m.s.s. (°Brix) bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) n=18.

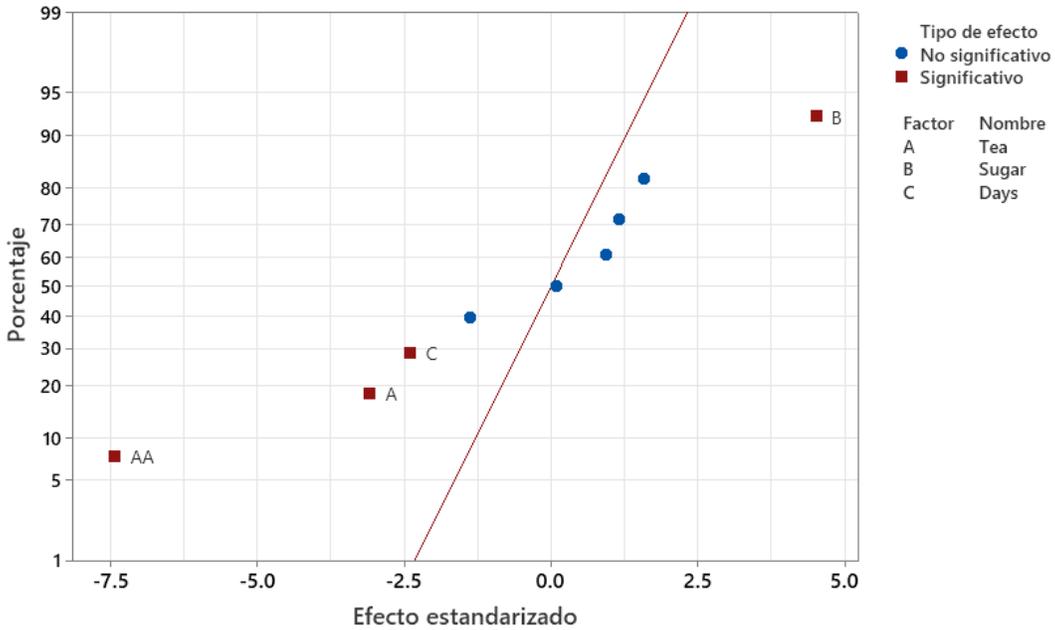


Gráfico 4. Gráfica Normal de efectos estandarizados de m.s.s. (°Brix) bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) n=18.

Una vez que se eliminó la experiencia No. 6, se realizó nuevamente el análisis de varianza y prueba de normalidad (Tabla 8, Gráfico 5). Se encontró que a un nivel de confiabilidad del 95%, existe un efecto significativo de la interacción entre Panela y Días de fermentación ($F_{1,7}=6.73^*$, $p=0.036$, $FIV=1.17$, Tabla 8, Gráfico 6), y la interacción Té y Panela del modelo propuesto para grados Brix ($F_{1,7}=31.06^{**}$, $p=0.001$, $FIV=1.12$, Tabla 8, Gráfico 6).

Tabla 8. Análisis de varianza y coeficientes de m.s.s. (°Brix) bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) tras corrección de falta de ajuste.

Fuente de Variación	GL	CM	F	Valor p	Coef	EE	FIV
Modelo	9	2.212	56.42 ^{***}	<0.001		0.098	
Lineal	3	2.385	60.82 ^{***}	<0.001			
<i>Té</i>	1	2.664	67.94 ^{***}	<0.001	-0.903	0.11	1.14
<i>Panela</i>	1	4.798	122.38 ^{***}	<0.001	1.116	0.101	1.17
<i>Días</i>	1	1.708	43.57 ^{***}	<0.001	-0.699	0.106	1.1
Cuadrado	3	4.038	102.99 ^{***}	<0.001			
<i>Té*Té</i>	1	10.303	262.79 ^{***}	<0.001	-2.724	0.168	1.16
<i>Panela*Panela</i>	1	0.121	3.09 ^{NS}	0.122	0.286	0.163	1.16
<i>Días*Días</i>	1	0.365	9.3 [*]	0.019	-0.505	0.166	1.18
Interacciones	3	0.443	11.29 ^{**}	0.005			
<i>Té*Panela</i>	1	1.218	31.06 ^{**}	0.001	1.48	0.266	1.12
<i>Té*Días</i>	1	0.013	0.32 ^{NS}	0.588	-0.175	0.308	1.16
<i>Panela*Días</i>	1	0.264	6.73 [*]	0.036	0.67	0.258	1.17
Error	7	0.039					
Falta de ajuste	4	0.067	26.69 [*]	0.011			
Error puro	3	0.003					
Coef. Determinación (R²) = 0.9864			n=17				

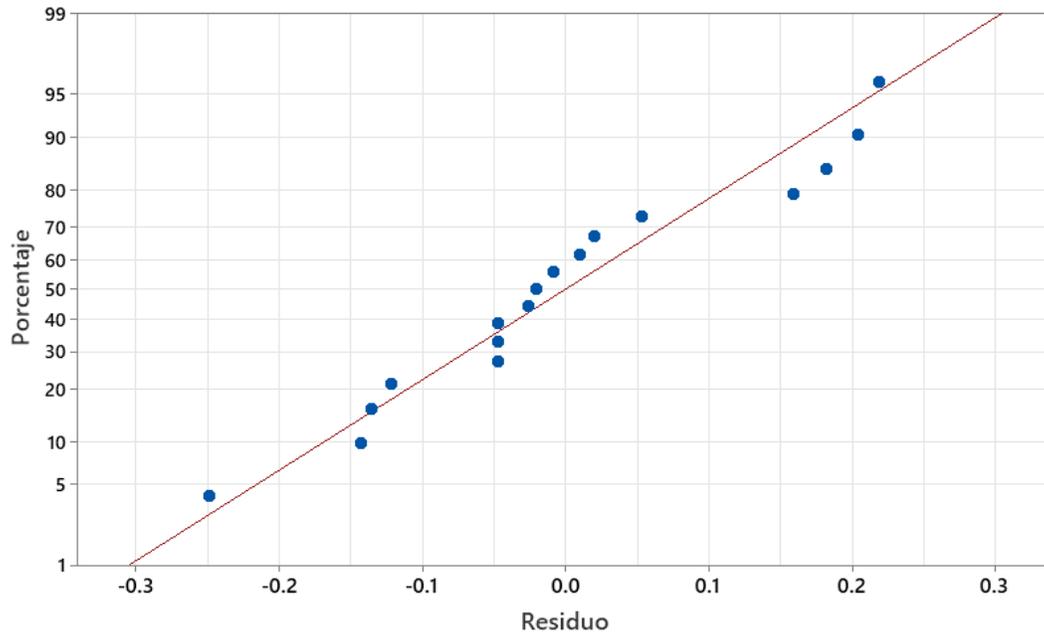


Gráfico 5. Prueba de normalidad de residuos de m.s.s. (°Brix) bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) tras corrección de falta de ajuste $n=17$.

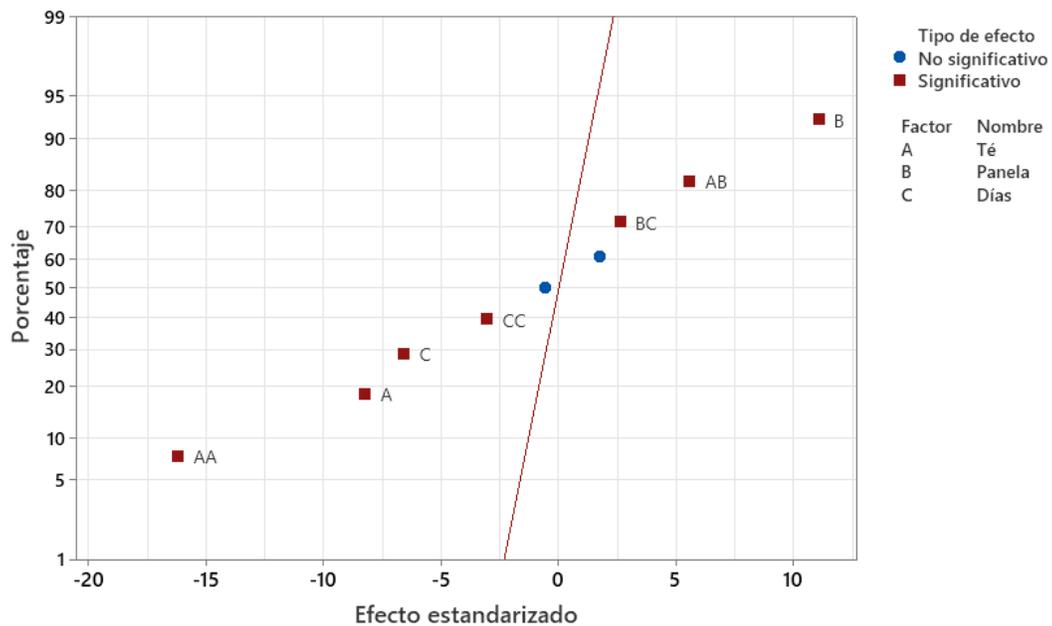


Gráfico 6. Gráfica Normal de efectos estandarizados de m.s.s. (°Brix) bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) tras corrección de falta de ajuste $n=17$.

Las interacciones significativas (Gráfico 6) fueron representadas en gráficos de superficie que reflejan un patrón de cambio, en el cual se puede percibir que la cantidad de m.s.s. es mayor, al incrementar la cantidad inicial de Panela, bajo 7 a 11 días de fermentación, e incrementando la cantidad inicial de Panela, con una con una cantidad inicial de té entre 4.5 y 6 gramos (Gráfico 7).

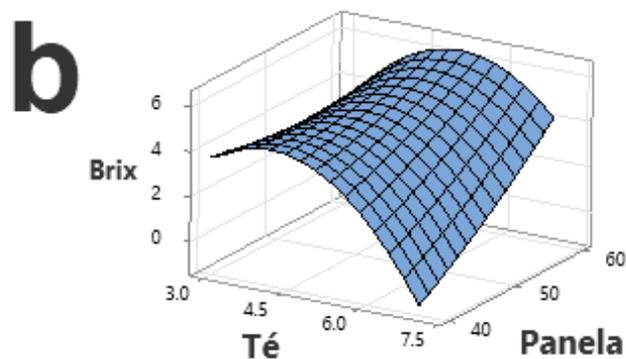
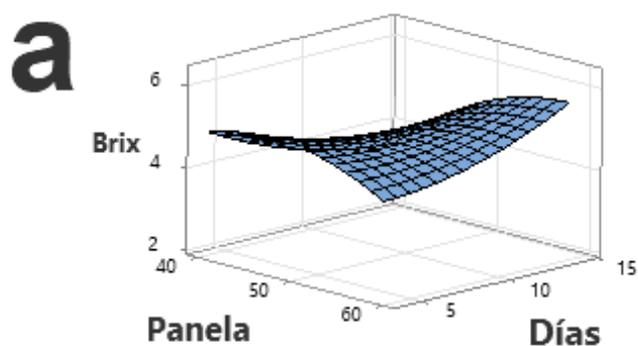


Gráfico 7. Gráficas de respuesta de superficie para m.s.s. (°Brix).

^a Interacción Panela*Días de fermentación

^b Interacción Té*Panela.

Se encontró una formulación óptima para maximizar la cantidad de m.s.s. en la kombucha a través de un análisis de optimización (Tabla 9, Gráfico 8). La presencia de m.s.s. es necesaria en la bebida como un parámetro de palatabilidad.

Al considerar que en estudios previos la disminución durante la fermentación de 240 horas ha llegado a disminuir hasta 5 °Brix (Guzmán, 2021). A través de la evaluación de las variables en estudio se determinó que la formulación óptima para obtener un máximo de 6.28 °Brix fue 5.22 g*L⁻¹ de té, 60 g*L⁻¹ de Panela y 8.74 Días de fermentación, siendo una fórmula adecuada para garantizar palatabilidad en la bebida con una diferencia de 1 °Brix con la reportada por Guzmán en su estudio del año 2021.

Tabla 9. Optimización de la respuesta de m.s.s. (°Brix)

Configuración				Respuesta
Variable	Té (g*L ⁻¹)	Panela (g*L ⁻¹)	Días	Brix ± EE
Cantidad	5.2222	60	8.7475	6.281 ± 0.154
IC 95%= (5.916, 6.646)				

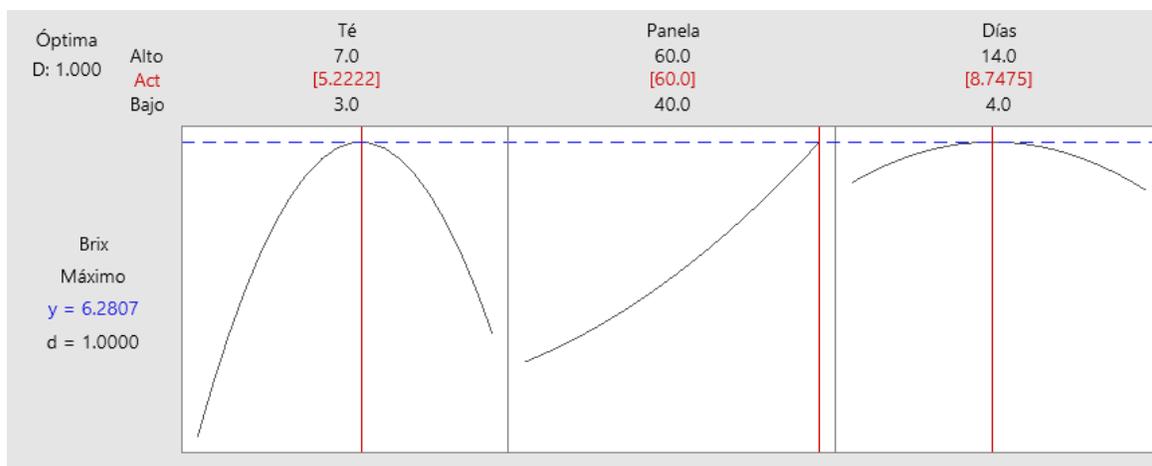


Gráfico 8. Optimización de la respuesta de m.s.s. (°Brix).

El factor más importante para obtenerla mayor concentración de m.s.s. y, por lo tanto, dulzor en la kombucha, fue la cantidad de panela. El modelo de optimización empleó como valor óptimo la máxima concentración considerada dentro del experimento (Tabla 2). Mientras que, para la cantidad de té y días de fermentación, mantuvo los valores muy cercanos al Punto central (Gráfico 8).

5.2.3. Acidez

A un nivel de confiabilidad del 95%, no se encontró un efecto significativo del modelo propuesto para la acidez representada por el contenido de ácido acético AcOH, tal y como indican los valores de F y p en la Tabla 10. Sin embargo, de acuerdo con la falta de ajuste, es posible realizar cambios para evaluar la respuesta del modelo ($F_{5,3}=11.9^*$, $p=0,034$, $R^2=0.7671$, Tabla 10). Tras realizar el análisis del supuesto de normalidad, se encontró un efecto no significativo de la experiencia número 1 sobre el modelo (Gráfico 9). Se procedió a eliminar esta experiencia para incrementar la significancia de las interacciones sobre los factores del modelo (Gráfico 10).

Tabla 10. Análisis de varianza y coeficientes de Acidez bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC).

Fuente de Variación	GL	CM	F	Valor p	Coef	EE	FIV
Modelo	9	0.57	2.93 ^{NS}	0.073		0.098	
Lineal	3	1.233	6.34 [*]	0.017			
<i>Té</i>	1	1.013	5.21 ^{NS}	0.052	0.508	0.223	1.02
<i>Panela</i>	1	0.205	1.05 ^{NS}	0.335	-0.207	0.202	1.02
<i>Días</i>	1	2.482	12.75 ^{**}	0.007	0.797	0.223	1.04
Cuadrado	3	0.204	1.05 ^{NS}	0.423			
<i>Té*Té</i>	1	0.336	1.73 ^{NS}	0.225	0.491	0.374	1.16
<i>Panela*Panela</i>	1	0.113	0.58 ^{NS}	0.467	-0.275	0.36	1.14
<i>Días*Días</i>	1	0.005	0.03 ^{NS}	0.873	0.061	0.369	1.19
Interacciones	3	0.216	1.11 ^{NS}	0.401			
<i>Té*Panela</i>	1	0.405	2.08 ^{NS}	0.187	0.75	0.52	1.00
<i>Té*Días</i>	1	0.001	5*10 ⁻³ ^{NS}	0.956	-0.035	0.618	1.02
<i>Panela*Días</i>	1	0.241	1.24 ^{NS}	0.298	0.574	0.516	1.02
Error	8	0.195					
Falta de ajuste	5	0.296	11.9 [*]	0.034			
Error puro	3	0.025					
Coef. Determinación (R²) = 0.7671				n=18			

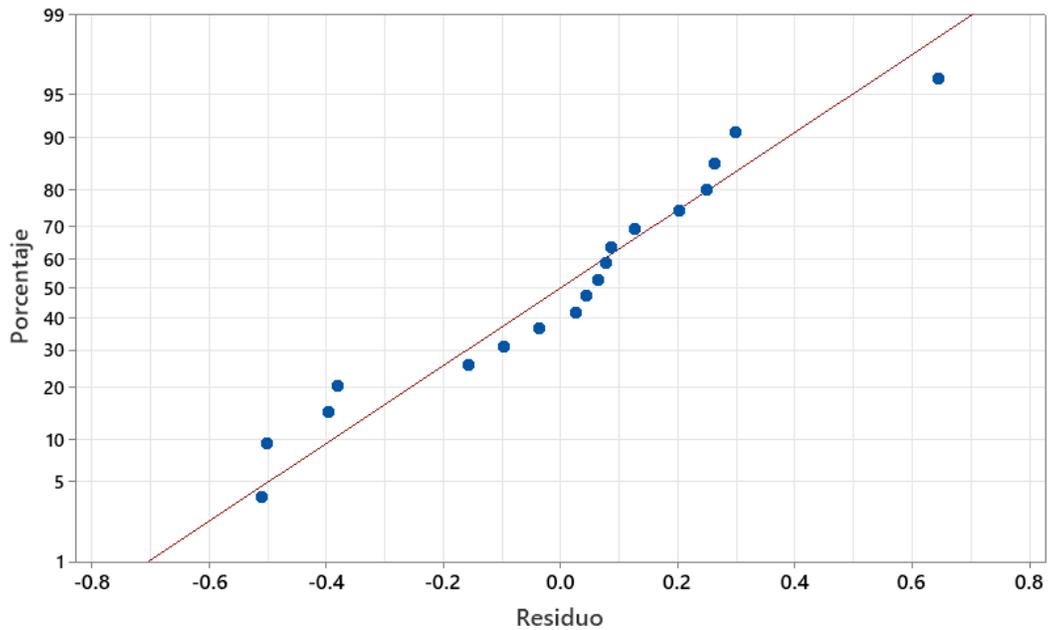


Gráfico 9. Prueba de normalidad de residuos de Acidez bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) n=18.

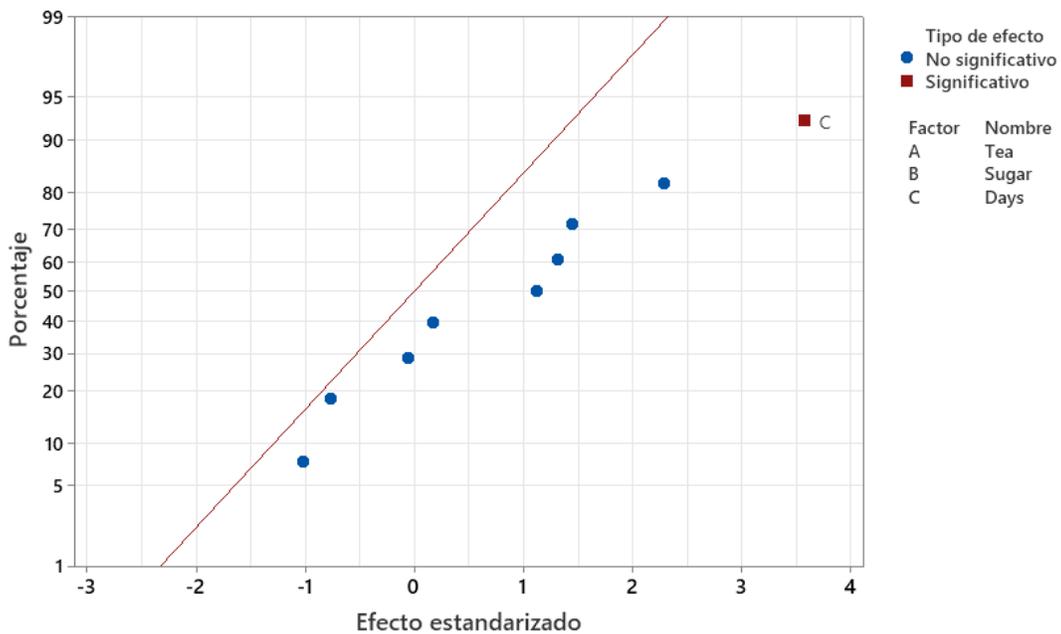


Gráfico 10. Gráfica Normal de efectos estandarizados de Acidez bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) n=18.

Una vez que se eliminó la experiencia No. 1, se realizó nuevamente el análisis de varianza y una prueba de normalidad (Tabla 11, Gráfico 11). Se encontró que a un nivel de confiabilidad del 95%, existe un efecto significativo de la interacción entre cantidad de té y días de fermentación ($F_{1,7}=18.45^{***}$, $p=0.004$, $FIV=1.24$, Tabla 11, Gráfico 12).

Tabla 11. Análisis de varianza y coeficientes de Acidez bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) tras corrección de falta de ajuste.

Fuente de Variación	GL	CM	F	Valor p	Coef	EE	FIV
Modelo	9	0.694	26.65 ^{***}	<0.001		0.098	
Lineal	3	1.675	64.33 ^{***}	<0.001			
<i>Té</i>	1	1.795	68.91 ^{***}	<0.001	0.717	0.086	1.07
<i>Panela</i>	1	<0.001	<0.001 ^{NS}	0.993	-0.001	0.079	1.08
<i>Días</i>	1	3.691	141.73 ^{***}	<0.001	1.071	0.09	1.15
Cuadrado	3	0.229	8.78 ^{**}	0.009			
<i>Té*Té</i>	1	0.205	7.88 [*]	0.026	0.386	0.137	1.17
<i>Panela*Panela</i>	1	0.269	10.33 [*]	0.015	-0.429	0.134	1.17
<i>Días*Días</i>	1	0.013	0.48 ^{NS}	0.511	-0.095	0.137	1.2
Interacciones	3	0.167	6.4 [*]	0.02			
<i>Té*Panela</i>	1	0.01	0.38 ^{NS}	0.56	-0.139	0.226	1.23
<i>Té*Días</i>	1	0.481	18.45 ^{**}	0.004	-1.185	0.276	1.24
<i>Panela*Días</i>	1	0.068	2.63 ^{NS}	0.149	-0.372	0.229	1.23
Error	7	0.026					
Falta de ajuste	4	0.027	1.08 ^{NS}	0.495			
Error puro	3	0.025					
Coef. Determinación (R²) = 0.9716				n=17			

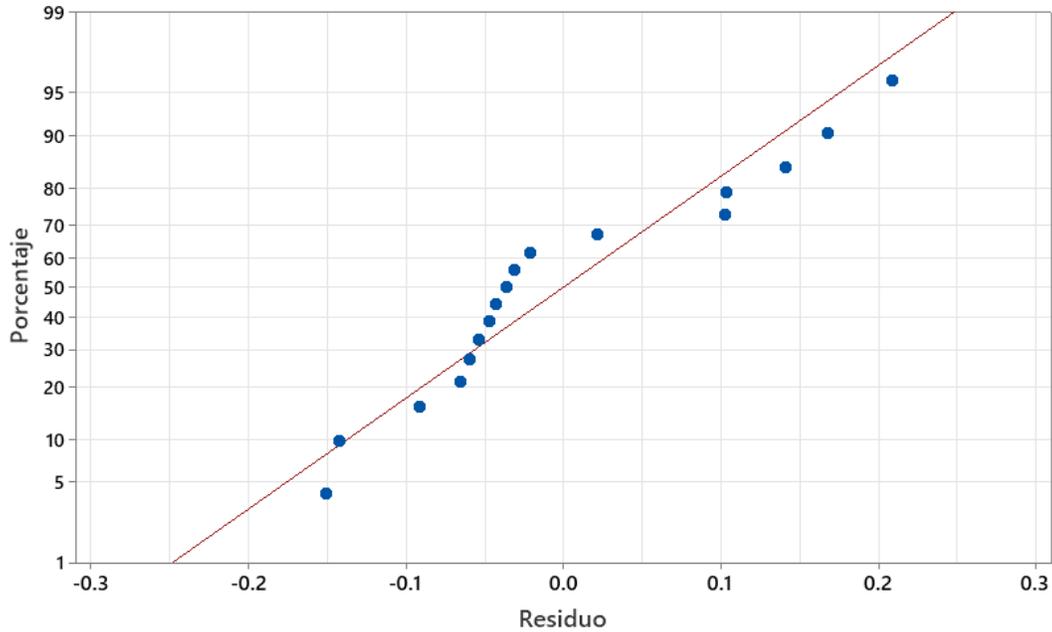


Gráfico 11. Prueba de normalidad de residuos de Acidez bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) tras corrección de falta de ajuste $n=17$.

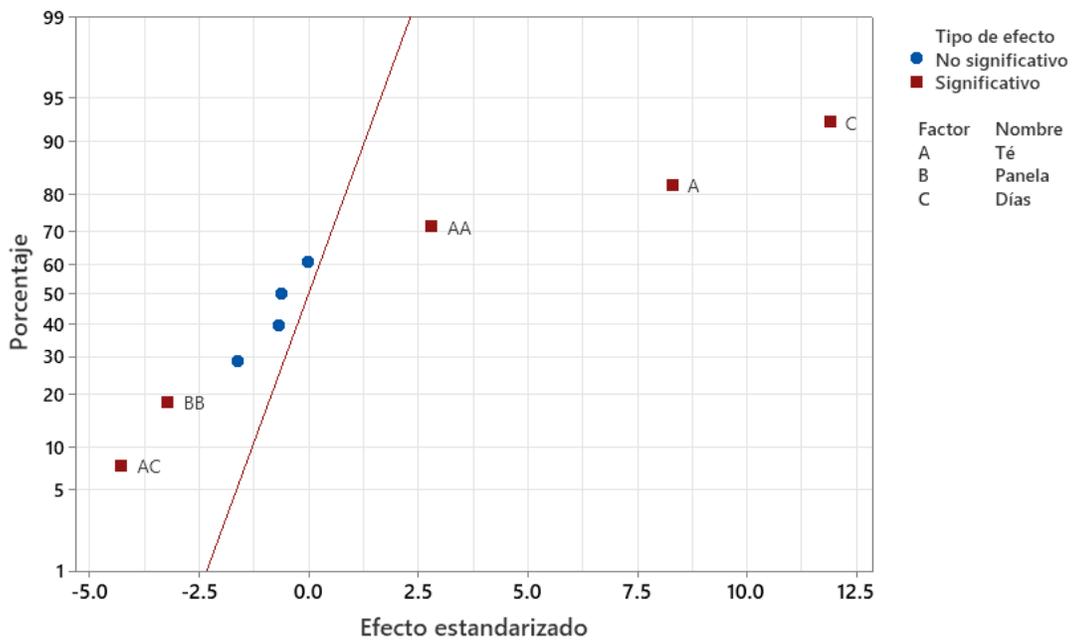


Gráfico 12. Gráfica Normal de efectos estandarizados de Acidez bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) tras corrección de falta de ajuste $n=17$.

La interacción significativa (Gráfico 12) fue representada mediante un gráfico de superficie que refleja un patrón de cambio, en el cual se puede percibir que la mayor acidez se alcanza bajo una menor cantidad inicial de té y tiempo de fermentación prolongado (Gráfico 13).

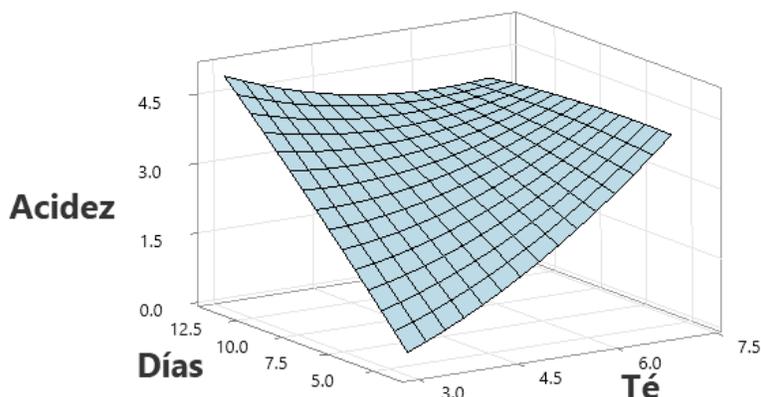


Gráfico 13. Gráficas de respuesta de superficie para Acidez bajo la Interacción *Té*Días de fermentación*.

Se encontró una formulación óptima para maximizar la acidez representada por AcOH en la kombucha a través de un análisis de optimización (Tabla 12, Gráfico 14), siendo la formulación con $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de té, $47.273 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de panela y 14 días de fermentación recomendada para obtener una acidez de $4.953 \pm 0.351 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ representada por el contenido de AcOH.

En estudios realizados acerca de la ingesta de AcOH, se ha encontrado que sujetos de estudio presentan mejoras en el nivel de glucosa en sangre con el suministro de AcOH en el rango de $1.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Iman, Adel, & Barahoyee, 2015). Además, que dosis de $9.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de AcOH en la dieta diaria no parece producir efectos secundarios en hígado o riñones y $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ son suficientes para reducir de peso corporal, grasa visceral y subcutánea y reducir triglicéridos en sangre (Kondo, Kishi, Fushimi, Ugajin, & Kaga, 2009).

La optimización realizada permite obtener una cantidad de AcOH superior a la dosis mínima e inferior al límite máximo mencionado por Kondo, *et.al.* en su

estudio realizado en Japón en el año 2009. Además, esta cantidad se encuentra dentro del rango reportado por Iman, *et.al.* en su estudio del año 2015. Por lo tanto, se considera que la obtención de kombucha con las características encontradas en el análisis de optimización de la respuesta de acidez (Tabla 12, Gráfico 14), mantendrán los beneficios citados por los autores.

Tabla 12. Optimización de la respuesta de Acidez.

Variable	Configuración			Respuesta
	Té (g*L ⁻¹)	Panela (g*L ⁻¹)	Días	Acidez ± EE (g AcOH*L ⁻¹)
Cantidad	3	47.273	14	4.953 ± 0.351
IC 95%= (4.122, 5.783)				

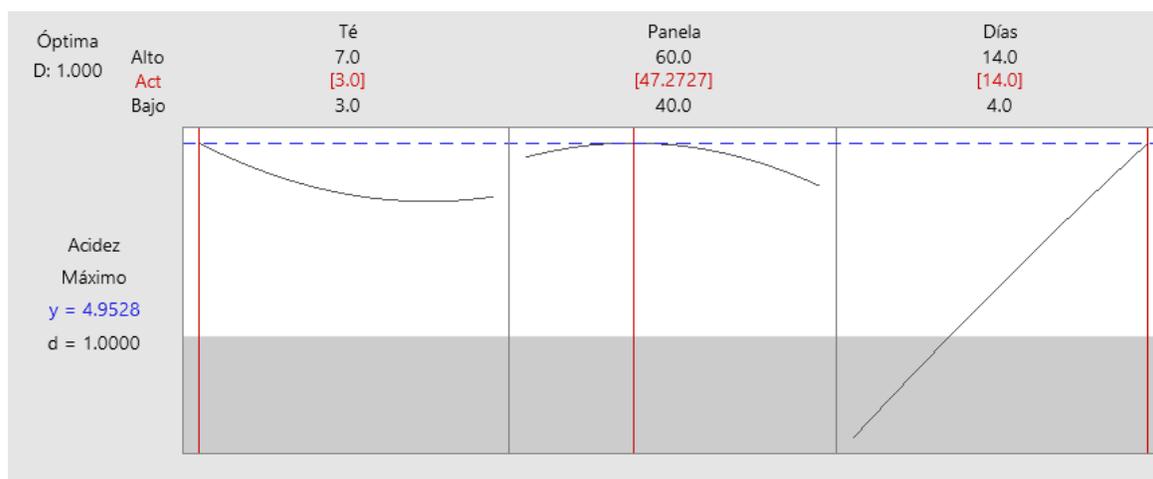


Gráfico 14. Optimización de la respuesta de Acidez.

El tiempo prolongado de fermentación se explica debido a que, durante una fermentación prolongada, la dinámica microbiológica se estimula permitiendo que la actividad de la bacteria *Acetobacter* se lleve a cabo a partir de la aparición de concentraciones bajas de etanol formado previamente por levaduras. Esto da lugar a la formación de AcOH que incrementa como el ácido predominante en el medio.

Sin embargo, una cantidad de panela cercana al punto central ($50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), es suficiente para facilitar esta actividad metabólica. Por consiguiente, el azúcar adicional permanecerá en dilución en la bebida hasta ser aprovechado por los propios microorganismos del SCOBY, o como un factor limitante para su desarrollo inhibiendo la actividad microbiológica debido a un exceso (Gerard, 2015).

5.2.4. Polifenoles

A un nivel de confiabilidad del 95%, se encontró un efecto significativo para la interacción entre la cantidad de Té y Panela ($F_{1,8}=7.27^*$, $p=0.027$, Tabla 13). Sin embargo, de acuerdo con la falta de ajuste, es posible realizar cambios para evaluar la respuesta del modelo ($F_{5,3}=67.56^{**}$, $p=0,003$, $R^2=0.7922$, Tabla 13). Al realizar el análisis del supuesto de normalidad, se encontró un efecto no significativo de la experiencia número 11 sobre el modelo (Gráfico 15). Se procedió a eliminar esta experiencia para incrementar la significancia de las interacciones sobre los factores del modelo (Gráfico 16).

Tabla 13. Análisis de varianza y coeficientes de Polifenoles bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC).

Fuente de Variación	GL	CM	F	Valor p	Coef	EE	FIV
Modelo	9	1416.77	3.39 ^{NS}	0.05		0.098	
Lineal	3	150.51	0.36 ^{NS}	0.784			
<i>Té</i>	1	175.45	0.42 ^{NS}	0.535	6.7	10.3	1.02
<i>Panela</i>	1	251.08	0.6 ^{NS}	0.461	-7.26	9.36	1.02
<i>Días</i>	1	24.99	0.06 ^{NS}	0.813	-2.5	10.4	1.04
Cuadrado	3	2321.07	5.55 [*]	0.023			
<i>Té*Té</i>	1	507.44	1.21 ^{NS}	0.303	19.1	17.3	1.16
<i>Panela*Panela</i>	1	2805.51	6.71 [*]	0.032	-43.3	16.7	1.14
<i>Días*Días</i>	1	1722.67	4.12 ^{NS}	0.077	34.7	17.1	1.19
Interacciones	3	1693.48	4.05 ^{NS}	0.05			
<i>Té*Panela</i>	1	3039.66	7.27 [*]	0.027	65	24.1	1
<i>Té*Días</i>	1	1907.12	4.56 ^{NS}	0.065	-61.2	28.6	1.02
<i>Panela*Días</i>	1	133.67	0.32 ^{NS}	0.587	-13.5	23.9	1.02
Error	8	418.09					
Falta de ajuste	5	663.06	67.56 ^{**}	0.003			
Error puro	3	9.81					
Coef. Determinación (R²) = 0.7922				n=18			

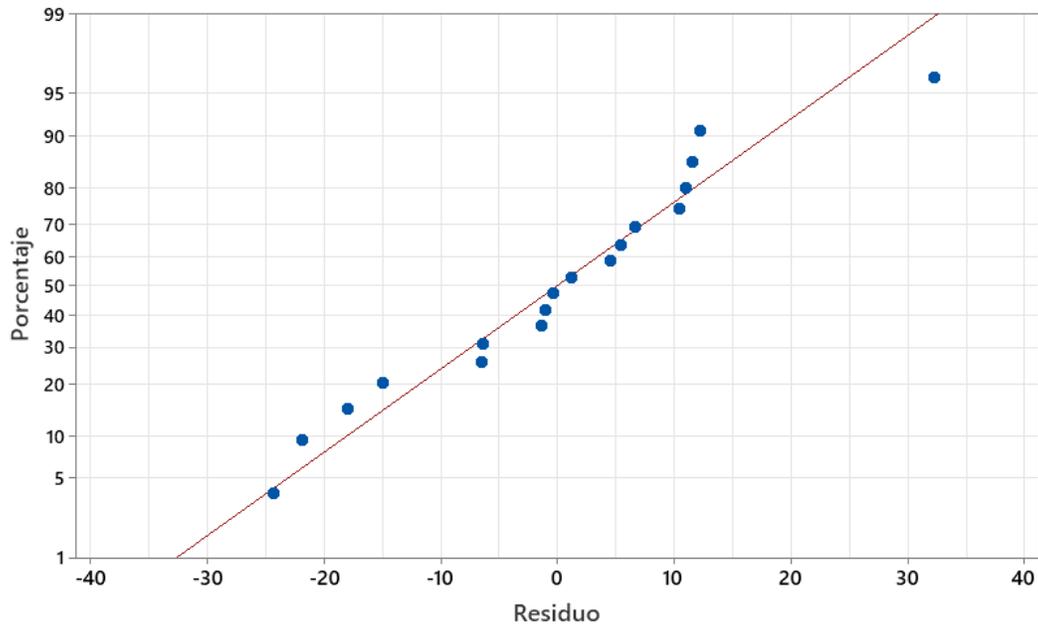


Gráfico 15. Prueba de normalidad de residuos de Polifenoles bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) n=18.

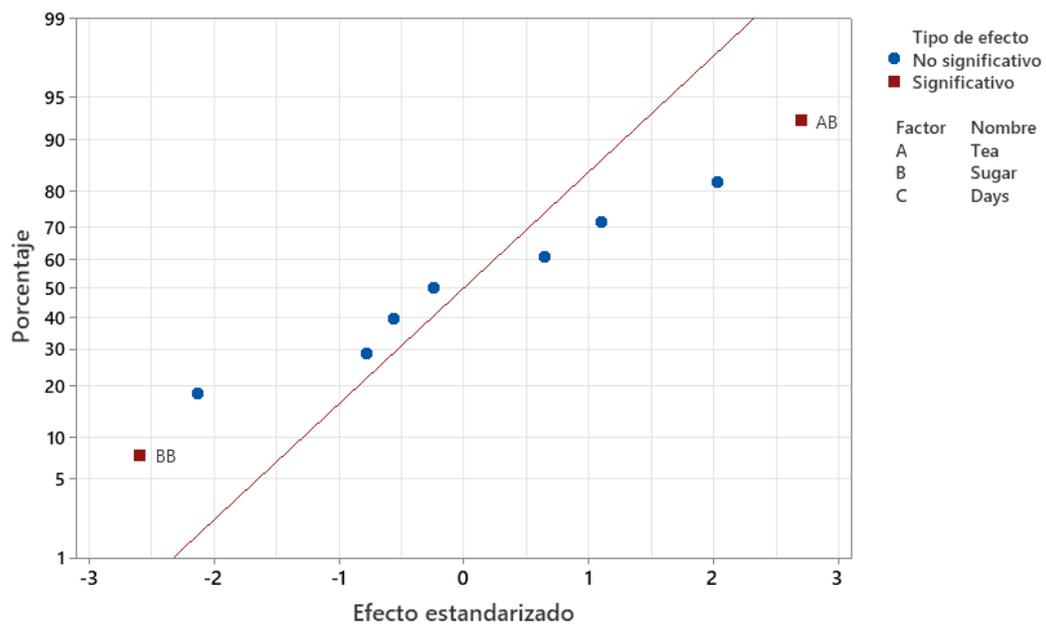


Gráfico 16. Gráfica Normal de efectos estandarizados de Polifenoles bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) n=18.

A fin de ajustar el modelo y determinar el efecto de las interacciones, se procedió a eliminar la experiencia No. 11 y realizar nuevamente el análisis de varianza y una prueba de normalidad (Tabla 14, Gráfico 17). Se encontró que, a un nivel de confiabilidad del 95%, existe un efecto significativo de las interacciones entre cantidad de Té y Panela ($F_{1,7}=25.02$, $p=0.002^{***}$, $FIV=1.00$, Tabla 14, Gráfico 18), y la interacción entre cantidad de Té y Días de fermentación ($F_{1,7}=15.7$, $p=0.005^{***}$, $FIV=1.02$, Tabla 14, Gráfico 18).

Tabla 14. Análisis de varianza y coeficientes de Polifenoles bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) tras corrección de falta de ajuste.

Fuente de Variación	GL	CM	F	Valor p	Coef	EE	FIV
Modelo	9	1652.22	13.6**	0.001		0.098	
Lineal	3	653.75	5.38*	0.031			
<i>Té</i>	1	175.45	1.44 ^{NS}	0.269	6.69	5.56	1.02
<i>Panela</i>	1	1751.16	14.42**	0.007	-23.51	6.19	1.21
<i>Días</i>	1	45.2	0.37 ^{NS}	0.561	-3.41	5.58	1.04
Cuadrado	3	3094.3	25.47***	<0.001			
<i>Té*Té</i>	1	784.48	6.46*	0.039	23.87	9.39	1.13
<i>Panela*Panela</i>	1	5240.27	43.14***	<0.001	-74.3	11.3	1.21
<i>Días*Días</i>	1	2193.2	18.06**	0.004	39.39	9.27	1.16
Interacciones	3	1743.15	14.35**	0.002			
<i>Té*Panela</i>	1	3039.66	25.02**	0.002	65	13	1
<i>Té*Días</i>	1	1907.12	15.7**	0.005	-61.2	15.4	1.02
<i>Panela*Días</i>	1	282.66	2.33 ^{NS}	0.171	-19.8	13	1.03
Error	7	121.47					
Falta de ajuste	4	205.22	20.91*	0.016			
Error puro	3	9.81					
Coef. Determinación (R^2) = 0.9459					<i>n=17</i>		

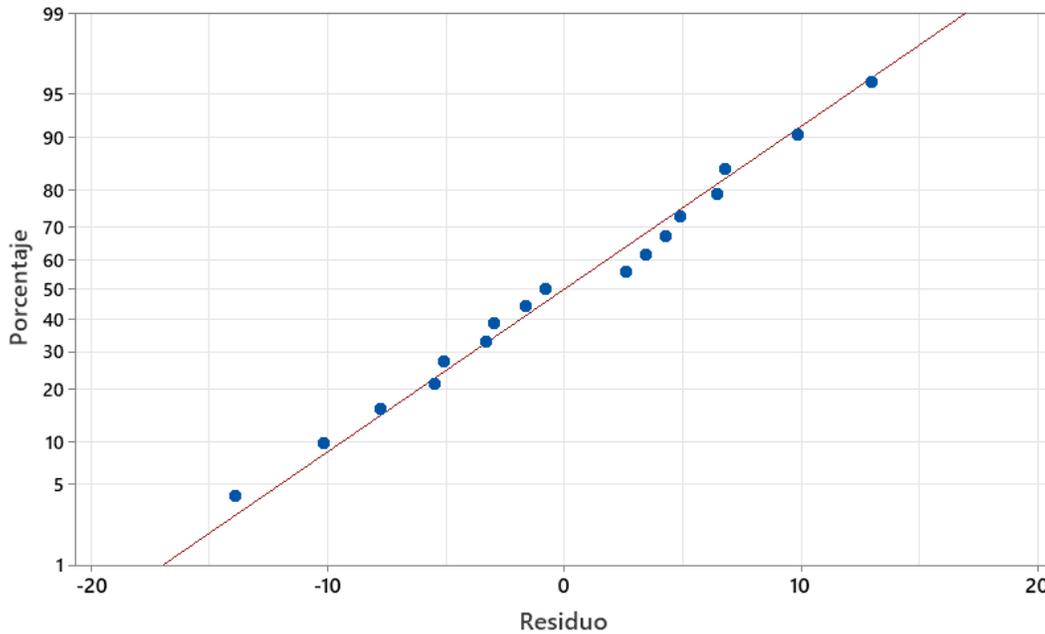


Gráfico 17. Prueba de normalidad de residuos de Polifenoles bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) tras corrección de falta de ajuste $n=17$.

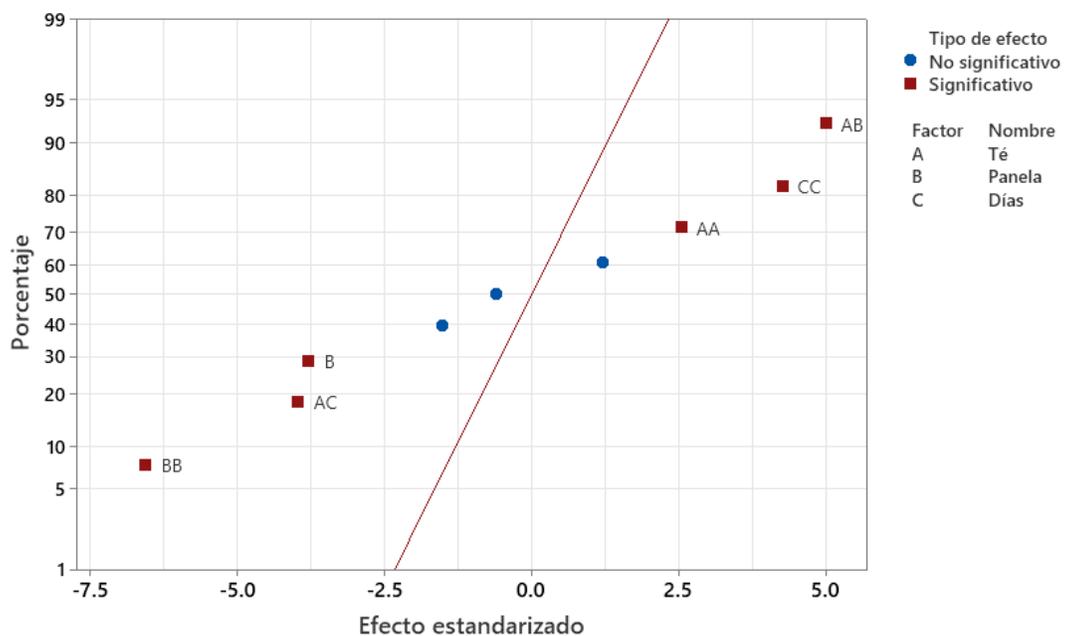


Gráfico 18. Gráfica Normal de efectos estandarizados de Polifenoles bajo el efecto de Diseño Central Compuesto Circunscrito (CCC) tras corrección de falta de ajuste $n=17$.

Las interacciones significativas fueron representadas mediante gráficos de superficie que reflejan un patrón de cambio que en ambos casos manifiesta dos respuestas óptimas para formulación de kombucha (Gráfico 19). A fin de determinar estas respuestas se llevó a cabo un análisis de optimización de la respuesta (Tabla 15). Se encontraron dos formulaciones óptimas de kombucha para maximizar los antioxidantes representadas por polifenoles.

En primer lugar, empleando mayor cantidad de té y panela en fermentación temprana aproximadamente a 4 días de fermentación; y, en segundo lugar, empleando menor cantidad de té y panela en fermentación tardía aproximadamente a 14 días de fermentación (Gráfico 19, Tabla 15). Este efecto se debe, a que los polifenoles propios de los ingredientes se encontraron presentes de forma natural al inicio de la fermentación. Sin embargo, estos se hidrolizarán gradualmente hasta liberar elementos de menor peso molecular dando lugar a aparición de nuevos antioxidantes gracias a la actividad de microorganismos durante la fermentación (Makarewicz, Drozd, Tarko, & Duda-Chodak, 2021).

Al parecer, existe un efecto de inhibición de microorganismos al iniciar la fermentación con un alto contenido de polifenoles de los ingredientes de partida, es decir, cuanta más cantidad de té y más tiempo de fermentación, disminuye la presencia de polifenoles. Por lo contrario, al iniciar la fermentación con un menor contenido de polifenoles de alto peso molecular, por tanto, menos cantidad de té, se favorece el desarrollo y actividad microbiológica sobre moléculas complejas conforme aumenta el tiempo de fermentación.

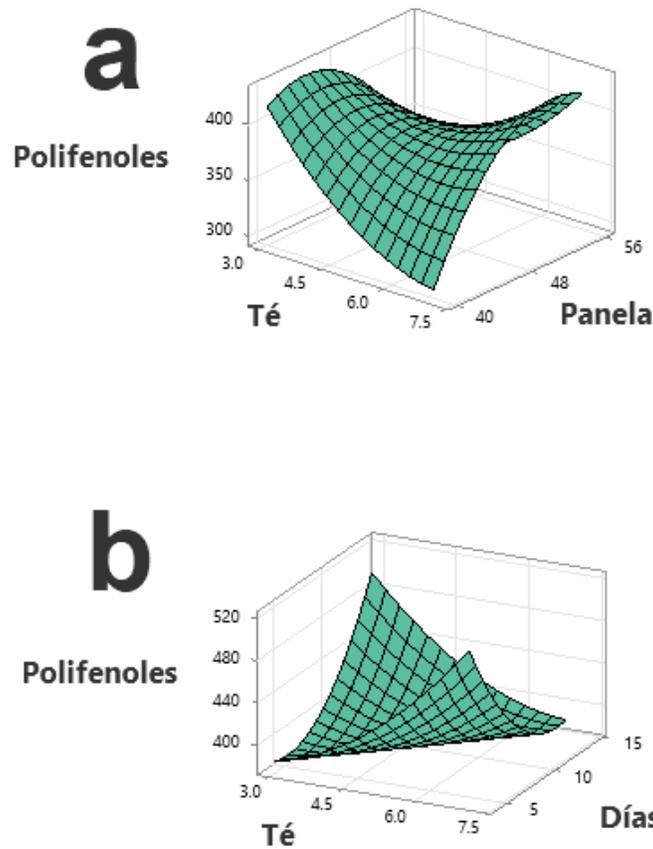


Gráfico 19. Gráficas de respuesta de superficie para Polifenoles.

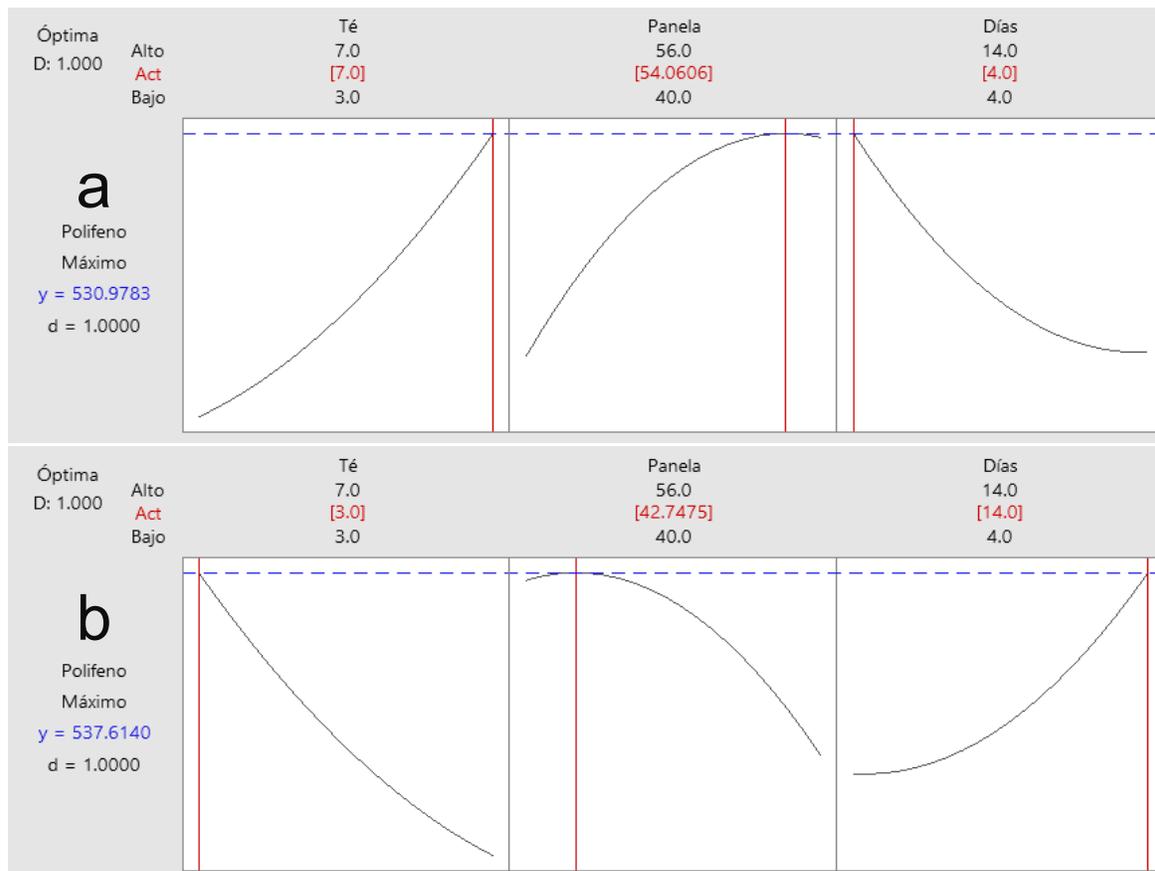
^a *Interacción Té*Panela.*

^b *Interacción Té*Días de fermentación.*

Las formulaciones óptimas para maximizar el contenido de antioxidantes representados por la cantidad de polifenoles en la kombucha a través de un análisis de optimización se presentan a continuación (Tabla 15, Gráfico 20). Para formulación temprana con $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de té, $54.061 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de panela y 4 días de fermentación para obtener $531 \pm 21.1 \text{ mg/L}$ de polifenoles, posiblemente provenientes en su mayoría de los elementos de partida. Y para formulación tardía con $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de té, $42.748 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de panela y 14 días de fermentación, para obtener $537.6 \pm 26.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de polifenoles, posiblemente provenientes del metabolismo de microorganismos probióticos de la bebida (Makarewicz, Drozd, Tarko, & Duda-Chodak, 2021).

Tabla 15. Optimización de la respuesta de Polifenoles

Configuración				Respuesta
Variable	Té (g*L ⁻¹)	Panela (g*L ⁻¹)	Días	Polifenoles ± EE (mg*L ⁻¹)
Solución 1: Repuesta temprana	7	54.061	4	531 ± 21.1
Solucion 2: Repuesta tardía	3	42.748	14	537.6 ± 26.8
IC 95%= (481.0, 580.9)				
IC 95%= (474.1, 601.1)				

**Gráfico 20.** Optimización de la respuesta de Polifenoles.^a Respuesta temprana.^b Respuesta tardía.

6. CONCLUSIONES

No se encontró diferencias significativas en el valor de pH. El valor más probable de todas las experiencias es 4.

Las interacciones más significativas para la m.s.s. fueron cantidad de panela con días de fermentación y cantidad de panela con cantidad de té. En ambos casos, la m.s.s. incrementa al usarse mayor cantidad de panela, por lo tanto, el factor más importante para la maximizar la variable e incrementar palatabilidad en la bebida es la cantidad inicial de panela.

La interacción más significativa para la acidez fue cantidad de té con días de fermentación. La acidez incrementa al emplear menor cantidad de té con un tiempo de fermentación prolongado. Esto debido a que durante mayor tiempo de fermentación se estimula la actividad bacteriana y por consiguiente la formación de ácido acético.

Las interacciones más significativas para la cantidad de antioxidantes polifenoles fueron en primer lugar la cantidad de té con cantidad panela, y en segundo lugar la cantidad de té con días de fermentación. La variable más importante para maximizar contenido de antioxidantes es el tiempo de fermentación. Se determinó dos respuestas óptimas para la maximización del contenido de polifenoles. Fermentación temprana con mayor cantidad de elementos de partida durante menor tiempo de fermentación, y fermentación tardía con menor cantidad de elementos de partida durante mayor tiempo de fermentación.

Las formulaciones evaluadas dieron lugar al valor óptimo 4.07 de pH para la estabilidad de la bebida. La formulación óptima para obtener mejor palatabilidad en relación con la m.s.s. tras fermentación de azúcares fue $5.22 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de té, $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de panela y 8.74 días de fermentación, mientras que para obtener el mayor contenido de ácido acético la formulación óptima fue $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de té, $47.273 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de panela y 14 días de fermentación, y finalmente la formulación óptima de kombucha para obtener la mayor cantidad de antioxidantes en relación con cantidad de polifenoles fue $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de té, $42.748 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de panela y 14 días de fermentación.

7. REFERENCIAS

- Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Bhattacharya, D., Sarkar, S., & Gachhui, R. (2019). Kombucha. A promising functional beverage prepared from tea. *Non-alcoholic Beverages*, 285-327.
- Dubovskiy, K. M. (1952). Kombucha: Chemical composition. *Epidemiology Institute of Kazakhstan*.
- Dutta, H., & Sanjib, P. K. (2019). Kombucha Drink. Production, quality, and safety aspects. *Production and Management of Beverages*, 259-288. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815260-7.00008-0>
- García Luna, P. P., & López Gallardo, G. (2007). Study on intestinal absorption, metabolism, and adaption. *Nutrición Hospitalaria*, 22(2), 5-13. doi:ISSN 0212-1611
- Gerard, L. (2015). *Caracterización de bacterias del ácido acético destinadas a la producción de vinages de frutas*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Guzmán, M. A. (2021). Resistencia de microorganismos aislados de kombucha a condiciones del tracto gastrointestinal in vitro. *Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.*, 80.
- Iman, M., Adel, M. S., & Barahoyee, A. (2015). Effect of Apple Cider Vinegar on Blood Glucose Level in Diabetic Mice. *Pharmaceutical Science*, 20, 163-168.
- Ivanisnová, E., Menhartová, K., Terentjeva, M., Harangozo, L., Kántor, A., & Kacániová, M. (2020). The evaluation of chemical, antioxidant, antimicrobial and sensory properties of kombucha tea beverage. *Journal of Food Science and Technology*, 57(5), 1840-1846. doi:<https://doi.org/10.1007/s13197-019-04217-3>
- Jayabalan, R., Malbasa, R. V., Loncar, E. S., Vitas, J. S., & Sathishkumar, M. (2014). A Review on Kombucha Tea—Microbiology, Composition, Fermentation,

- Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 538-550. doi:10.1111/1541-4337.12073
- Júnior, J. C., Meireles Mafaldo, Í., da Lima Brito, I., & Tribuzy de Magalhães Cordeiro, A. M. (2022). Kombucha: Formulation, chemical composition, and therapeutic potentialities. *Current Research in Food Science*, 5, 360-365. doi:https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.01.023
- Kaewkod, T., Bovonsombut, S., & Tragoolpua, Y. (2019). Efficacy of Kombucha Obtained from Green, Oolong, and Black Teas on Inhibition of Pathogenic Bacteria, Antioxidation, and Toxicity on Colorectal Cancer Cell Line. *Microorganisms*, 7(700), 1-18. doi:http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms7120700
- Kapp, J. M., & Sumner, W. (2019). Kombucha: a systematic review of the empirical evidence of human. *Annals of Epidemiology*, 30, 66-70. doi:https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2018.11.001
- Kondo, T., Kishi, M., Fushimi, T., Ugajin, S., & Kaga, T. (2009). Vinegar intake reduces body weight, body fat mass, and serum triglyceride level in obese japanese subjects. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(8), 1837-1843. doi:https://doi.org/10.1271/bbb.90231
- Kozyrovska, N. O., Reva, O. M., Goginyan, V. B., & de Vera, J. P. (2012). Kombucha microbiome as a probiotic: a view from the perspective of post-genomics and synthetic ecology. *Biopolymers and Cell.*, 28(2), 103-113.
- Makarewicz, M., Drozd, I., Tarko, T., & Duda-Chodak, A. (2021). The interactions between polyphenols and microorganisms especially gut microbiota. *Antioxidants*, 10(2), 1-70. doi:https://doi.org/10.3390%2Fantiox10020188
- Martínez, J. L., Valenzuela, L. S., Jayabalan, R., Huerta, J. O., & Anayansi, E. A. (2018). A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CyTA - Journal of Food*, 16(1), 390-399. doi:https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1410499

Minitab LCC. (2021). *Minitab*. Obtenido de Minitab Powerful Statistical Software Everyone Can Use: <https://www.minitab.com/en-us/products/minitab/>

Panda, S. K. (2021). *Probiotic Beverages*. Academic Press. Charlotte Cackle.

Stevens, N., & Nieto, C. (2019). *Kombucha: Los secretos de esta bebida fermentada probiótica*. Sirio S.A.