



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE

Centro Regional Universitario Bariloche

Variabilidad microbiana y fisicoquímica en kombuchas argentinas y su relación con características sensoriales

Trabajo Final para optar al grado de Licenciado en Ciencias Biológicas

Tobías Moccia

Directora: Dra. Lucía Paula Álvarez

Codirector: Dr. Diego Libkind Frati

Lugar de Trabajo: Centro de Referencia en Levaduras y Tecnología Cervecera (CRELTEC), Instituto Andino Patagónico de Tecnologías Biológicas y Geoambientales (IPATEC, CONICET-UNCo)

Contacto: tobiasmoccia@gmail.com

Julio 2023

Resumen

La kombucha es una bebida dulce y ácida obtenida a partir de la fermentación de té azucarado por un cultivo simbiótico de levaduras y bacterias (SCOBY). El mercado de kombucha es uno de los de mayor crecimiento en los últimos años con más de 20 marcas en Argentina. El objetivo de este trabajo fue caracterizar fisicoquímica y microbiológicamente a las kombuchas argentinas relacionando los resultados con sus características sensoriales. La composición microbiana se analizó mediante el aislamiento en medios de cultivo y secuenciación. La caracterización fisicoquímica se realizó determinando el pH, densidad, acidez total y concentraciones de etanol, azúcares remanentes y ácidos acético, láctico y glucurónico por HPLC. El aspecto sensorial fue evaluado por un panel de cata entrenado. Los resultados indicaron una gran variabilidad entre las kombuchas estudiadas. La composición microbiana estuvo dominada por bacterias de la familia *Acetobacteraceae* y levaduras de los géneros *Brettanomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia* y *Saccharomyces*. La mitad de las kombuchas analizadas presentaron especies productoras de ácido láctico. El ácido predominante fue el acético, mientras que los ácidos láctico y glucurónico estuvieron presentes en el 70 y 50% de las kombuchas, respectivamente. Solo el 20% de las kombuchas estudiadas cumplió con el límite de etanol establecido por el Código Alimentario Argentino, mientras que todas estuvieron dentro del rango de pH establecido. El 90% de las kombuchas presentaron concentraciones de azúcar mayores al límite establecido por La Ley de Etiquetado Frontal. En general, las kombuchas fueron percibidas como dulces, carbonatadas y ácidas, mientras que la tomabilidad fue asociada positivamente al dulzor y sabores afrutados y negativamente a la astringencia, amargor y deméritos. Este trabajo constituye la primera caracterización de kombuchas comerciales argentinas, encontrando una gran variabilidad en cuanto a sus características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales. Los resultados de este trabajo contribuirán a mejorar la calidad de esta bebida en nuestro país.

Palabras clave: Microbiología de Alimentos, Bebidas Fermentadas, Bacterias, Levaduras, SCOBY

Abstract

Kombucha is a sweet and acidic beverage obtained from the fermentation of sugared tea by a symbiotic culture of yeast and bacteria (SCOBY). In Argentina, there are over 20 companies that produce kombucha. The main objective of this study was to physicochemically and microbiologically characterise Argentinean kombuchas and relate the results to their sensory features. Microbial composition was analysed through isolation in culture media and sequencing. Physicochemical characterisation was performed by determining pH, density, total acidity, and concentrations of ethanol, sugars, and acetic, lactic, and glucuronic acids by HPLC. Sensory analysis was evaluated by a trained sensory panel. The results indicated significant variability among the studied kombuchas. Microbial composition was dominated by bacteria from the *Acetobacteraceae* family and yeast from the *Brettanomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, and *Saccharomyces* genera. Half of the analysed kombuchas presented lactic acid-producing species. Acetic acid was the predominant acid, while lactic and glucuronic acids were present in 70% and 50% of the kombuchas, respectively. Only 20% of the studied kombuchas complied with the ethanol limit established by the Argentine Food Code, while all fell within the established pH range. 90% of the kombuchas had sugar concentrations exceeding the limit established by the Front-of-package Labelling Law. In general, kombuchas were perceived as sweet, carbonated, and acidic, with drinkability being positively associated with sweetness and fruity flavours, and negatively associated with astringency, bitterness, alcohol, and flaws. This study represents the first characterisation of commercial Argentinean kombuchas, revealing significant variability in their physicochemical, microbiological and sensorial characteristics. The findings of this study will contribute to improving the quality of this beverage in our country.

Keywords: Food Microbiology, Fermented Beverages, Bacteria, Yeasts, SCOBY

Índice

1. Introducción.....	5
1.1 Alimentos fermentados.....	6
1.2 Bebidas fermentadas.....	8
1.3 Kombucha.....	9
1.3.1 Origen.....	9
1.3.2 Impacto en la salud.....	10
1.3.3 Proceso de producción.....	11
1.3.4 Factores que afectan a la producción.....	14
1.3.5 Microbiología.....	15
1.3.6 Compuestos químicos.....	19
1.3.7 Aspecto sensorial.....	21
1.3.8 Mercado y regulaciones.....	23
1.4 Objetivos.....	25
2. Materiales y métodos.....	26
2.1. Confección de base de datos.....	27
2.2 Toma de muestras.....	27
2.3 Caracterización microbiológica.....	27
2.3.1 Aislamiento de microorganismos.....	27
2.3.2 Identificación molecular de los microorganismos aislados.....	28
2.4. Caracterización fisicoquímica.....	29
2.4.1. Determinación de pH.....	29
2.4.2. Determinación de Acidez.....	29
2.4.3. Cuantificación de alcohol y densidad.....	30
2.4.4. Determinación de ácidos orgánicos, azúcares y etanol.....	30
2.5. Evaluación de perfil sensorial.....	32
2.6. Análisis de datos.....	32
3. Resultados.....	34
3.1. Resultados de encuesta a productores.....	35
3.2. Caracterización microbiológica.....	35
3.2.1. Recuento de microorganismos.....	35
3.2.2. Clasificación de microorganismos a nivel de familia y género.....	35
3.2.3. Clasificación de microorganismos a nivel de especie.....	37
3.3. Caracterización fisicoquímica.....	40
3.3.1. Azúcares.....	41
3.3.2. Acidez, pH y ácidos orgánicos.....	41
3.3.3. Etanol.....	45
3.3.4. Análisis multivariado y agrupación de kombuchas.....	45
3.4. Caracterización sensorial.....	49
3.4.1. Descripción general.....	49

3.4.2. Aromas, sabores y sensaciones en boca.....	50
3.4.3. Deméritos.....	52
3.4.4. Relación entre características fisicoquímicas y sensoriales.....	53
4. Discusión.....	55
5. Conclusiones.....	67
6. Referencias.....	69
7. Agradecimientos.....	78
8. Apéndice.....	80

1. Introducción

1.1 Alimentos fermentados

La fermentación, una de las prácticas más antiguas del ser humano en lo que respecta a preparar alimentos, consiste en la transformación de los alimentos por parte de microorganismos, dando como resultado cambios en su sabor, durabilidad, digestibilidad y bioactividad (Villarreal-Soto *et al.*, 2018). Desde el punto de vista fisicoquímico, es un proceso catabólico de oxidación, generalmente de carbohidratos, cuyo producto final es un compuesto orgánico, como un alcohol o un ácido (Wacher, 1993). El registro más antiguo del consumo de alimentos fermentados data entre 11.700 y 9.700 a.C. en Oriente Próximo. Las comunidades natufienses, ubicadas en lo que actualmente es Palestina, Israel, Jordania, Líbano y Siria, consumían fermentos de cereales recolectados aún sin haber desarrollado la agricultura (Schneier, 2020). Debe tenerse en cuenta que la fermentación es un fenómeno que ha surgido independientemente en diferentes culturas y civilizaciones y, por lo tanto, cada una de ellas presenta sus propias características inherentes, utilizando ingredientes y microorganismos presentes en su zona. Algunos ejemplos son los fermentos de leche, originales de Oriente Medio y la India, teniendo como protagonistas a las bacterias ácido lácticas (BAL). Además, en China surgieron los primeros fermentos de arroz y soja, producidos principalmente por mohos. Por otro lado, en Europa se incorporó el uso de levaduras con las cuales se han producido panificados y una gran variedad de vinos y cervezas, mientras que en África preponderaron los fermentos de mijo, sorgo y cebada, entre otros. Incluso en Mesoamérica diferentes civilizaciones prehispánicas preparaban fermentos de maíz y cacao, siendo partes fundamentales de su dieta. De la mano de grandes movimientos migratorios, como el ocurrido luego de la Segunda Guerra Mundial, y de otros procesos como la actual globalización, el ser humano ha ido expandiendo sus conocimientos sobre los alimentos fermentados tradicionales. Por ejemplo, es conocida la importante transferencia cultural de los europeos a los americanos, popularizando así las cervezas, vinos y carnes fermentadas (Wacher, 1993).

Los alimentos fermentados poseen texturas, funcionalidades y sabores únicos, y su consumo trae innumerables beneficios para los seres humanos: en primer lugar, al ser la fermentación un proceso catabólico en el que moléculas complejas se transforman en moléculas más sencillas, se suele mejorar la digestibilidad de los alimentos. Un ejemplo de esto es la soja, que se convierte en un alimento mucho

más nutritivo si se la fermenta, ya que en el proceso las proteínas vegetales son degradadas transformándose en aminoácidos (Wacher, 1993). Asimismo, el consumo de ciertos fermentos puede aliviar algunos problemas con otros alimentos, como es el caso de la intolerancia a la lactosa (Campbell-Platt, 1994; Sanlier *et al.*, 2017). Esto ocurre porque las BAL descomponen la lactosa en glucosa y galactosa, siendo estos azúcares simples más fácilmente digeribles por las personas intolerantes a la lactosa. Además, debe considerarse la capacidad de algunos microorganismos fermentadores de eliminar ciertos antinutrientes propios de determinados alimentos, como el ácido fítico presente en granos y semillas, que actúa como agente quelante para algunos minerales esenciales (Lavefve *et al.*, 2019). Algunos alimentos fermentados poseen probióticos (microorganismos que si son administrados en cantidad adecuada, brindan algún beneficio para la salud al consumidor), mejorando la salud y bienestar de las personas (Beena Divya *et al.*, 2012; Marco *et al.*, 2021; Kaashyap *et al.*, 2021). Por otra parte, los microorganismos responsables de la fermentación liberan en el alimento una gran variedad de compuestos, que pueden ser saludables, como el complejo vitamínico B (Lavefve *et al.*, 2019). Cabe destacar a los péptidos bioactivos, derivados de proteínas del alimento que pueden actuar como inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina I, evitando de esta forma la vasoconstricción y regulando la presión arterial. Estos inhibidores se forman a partir de proteínas de la leche, por medio de proteasas de BAL. Otros de los compuestos que cumplen funciones antioxidantes y ayudan a reducir los niveles de colesterol, capturando las moléculas del lípido y evitando su absorción en el intestino, son los exopolisacáridos presentes en algunas bacterias fermentadoras (Sanlier *et al.*, 2017).

Los beneficios de la fermentación no solo se dan por su consumo, sino que también es una forma de conservación, aumentando la durabilidad y estabilidad del alimento en el tiempo. Los microorganismos fermentadores no solo compiten por el sustrato con otros microorganismos, sino que producen compuestos antimicrobianos que alteran el microambiente e inhiben la proliferación de posibles contaminantes (Chaves-López *et al.*, 2014). Estas sustancias son, por excelencia, los ácidos orgánicos y el etanol (Lavefve *et al.*, 2019). La condición de que estos alimentos fueran más seguros tuvo una participación clave en el desarrollo de las civilizaciones, especialmente en épocas y lugares donde no había forma de garantizar el agua potable ni temperaturas de refrigeración (Campbell-Platt, 1994).

Otras virtudes del proceso de fermentación de los alimentos son su bajo costo y facilidad de preparación (Chaves-López *et al.*, 2014) .

Los tipos de fermentación pueden clasificarse, en líneas muy generales, por los productos mayoritariamente formados, que pueden ser ácidos o etanol. Esta forma de clasificar no excluye que ambos productos puedan producirse a la vez durante la fermentación de un alimento. La fermentación ácida puede darse por una enorme cantidad de microorganismos, aunque suele ser producida por representantes del Phylum Firmicutes (bacterias productoras de ácido láctico), Phylum Proteobacteria (productoras de ácido acético) y algunas bacterias del Phylum Actinobacteria (como *Bifidobacterium* sp). Por otro lado, la fermentación alcohólica se da principalmente en levaduras, a partir de azúcares monoméricos como la glucosa (Lavefve *et al.*, 2019; Hutkins, 2019).

En el siglo XX, y de la mano del crecimiento en la producción de alimentos ultraprocesados, el consumo de fermentos disminuyó notablemente. Sin embargo, en los últimos 30 años la tendencia ha cambiado, y la sociedad occidental se ha inclinado cada vez más a los llamados alimentos funcionales, que incluyen a los fermentos (Villarreal-Soto *et al.*, 2018; Lavefve *et al.*, 2019). Se puede considerar que un alimento es funcional cuando posee una determinada concentración de compuestos biológicamente activos que brindan beneficios a la salud, previniendo, controlando o mitigando enfermedades (Kim y Adhikari, 2020). Este cambio de paradigma en la sociedad es un reflejo de la toma de conciencia colectiva, que comenzó a considerar la relación existente entre la salud y la buena alimentación. Además, ciertos movimientos como el veganismo y el ambientalismo han impulsado un cambio en la matriz alimenticia, provocando la búsqueda de alternativas más ecológicas y sustentables, promoviendo el auge actual de los alimentos fermentados.

1.2 Bebidas fermentadas

Dentro de las bebidas fermentadas, las más populares son las alcohólicas como el vino, cerveza o sidra, producidas por levaduras en base a distintos mostos de frutas o cereales. Sin embargo, existen también bebidas fermentadas de bajo o sin

contenido alcohólico como el kéfir de agua, el ginger ale y la kombucha, que últimamente están ganando gran popularidad.

1.3 Kombucha

Una de las bebidas fermentadas que más popularidad ha conseguido en estas últimas décadas es la kombucha, también conocida como hongo de té, hongo manchuriano, Haipao, Champignon de longue vie, Chainii grib, ling zhi, kocha kinoko o chainii kvass (Kim y Adhikari 2020; Amarasinghe *et al.* 2018), una bebida ligeramente azucarada, ácida y carbonatada. Se obtiene comúnmente a partir de la infusión de hojas de té (*Camellia sinensis*), la cual es fermentada por un consorcio o cultivo simbiótico de levaduras y bacterias (“Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast” en inglés, SCOBY). La kombucha consta de dos porciones: la parte líquida rica en ácidos orgánicos y azúcares, y una matriz gelatinosa de celulosa que flota en la superficie, llamada también SCOBY, debido a que alberga a gran parte de los microorganismos presentes en la bebida.

1.3.1 Origen

Existen varias hipótesis sobre el origen de la kombucha, sin embargo, se acepta como registro más antiguo de esta bebida el año 220 a.C. en Manchuria, al noreste de China (Figura 1). Durante la dinastía Qin (221 a.C. - 206 a.C.), este fermento se tornó muy popular en todo el país, ya que se pensaba que tenía propiedades energizantes y desintoxicantes (Jayabalan, 2014; Júnior *et al.*, 2022), por lo que comúnmente se la conocía como Divino Che (Remedio de la Inmortalidad). En algún momento la bebida llegó a la vecina Corea, haciéndose conocida en ese país. Luego, en el año 414 d.C. fue llevada a Japón por el médico Kombu que utilizó este fermento para curar los problemas digestivos del Emperador Inkyo Tenno (Kim y Adhikari, 2020). Debido a esto, la kombucha consiguió una gran aceptación en el imperio japonés, y empezó a llamársele así en honor a dicho médico (Júnior *et al.*, 2022). Al expandirse las rutas de comercio, la kombucha llegó a Rusia (González-Téllez, 2019), convirtiéndose en un remedio popular en ese país durante el siglo XIX. Ya en el siglo XX, los supuestos efectos beneficiosos llamaron la atención de médicos de la ciudad de Omsk, Rusia, los cuales afirmaron que la

kombucha ayudaba a regular la presión arterial y a curar la disentería infantil (Soares *et al.*, 2021). Durante las Guerras Mundiales, este fermento fue llegando a otros países como Alemania e Italia (Kim y Adhikari, 2020). A mediados de siglo, la kombucha fue esparciéndose por toda Europa y llegando al norte de África (Miranda *et al.*, 2022). En los años 60, investigadores suizos llevaron a cabo los primeros estudios formales de este fermento, llegando a la conclusión de que los beneficios de consumir kombucha eran similares a los de consumir yogur (Soares *et al.*, 2021; Dutta y Paul, 2019). Con el posterior proceso de globalización, tanto el consumo como la investigación de la kombucha avanzaron por todo el mundo. Hasta el momento, no hay registro de cuándo habría llegado la kombucha a Argentina.



Figura 1. Hipótesis sobre el origen y expansión de la kombucha

1.3.2 Impacto en la salud

La kombucha posee una gran variedad de compuestos químicos que son considerados altamente beneficiosos para la salud, entre los que se destacan vitaminas (B1, B2, B6, B12, ácido fólico, vitamina C) y minerales (cobre, hierro, manganeso, níquel, zinc); ácido glucurónico, que actúa capturando y permitiendo la excreción de compuestos tóxicos en el hígado, como fenoles y bilirrubina; polifenoles, que actúan como antioxidantes; y ácido D-sacárico 1-4 lactona (DSL),

que es un compuesto con propiedades antioxidantes y desintoxicantes; entre otros. (Wang *et al.*, 2009; Watawana *et al.*, 2015; Kitwetcharoen *et al.*, 2023). Además de los compuestos saludables comúnmente encontrados en kombucha, se ha visto que su consumo puede tener efectos antidiabéticos, ya que reduce la hemoglobina glicosilada en sangre, a la vez que aumenta los niveles de insulina y glucógeno (Dutta y Paul, 2019; Miranda *et al.*, 2021; Villarreal-Soto *et al.*, 2018). Atkinson *et al.* (2023) realizaron uno de los primeros ensayos clínicos en humanos sobre los beneficios de la kombucha, concluyendo que el consumo de esta bebida contribuyó a disminuir los niveles de glucemia, aún cuando se consumieron kombuchas azucaradas. Por otra parte, mediante ensayos con ratas se ha confirmado que el consumo de este fermento brinda un efecto hepatoprotector, evitando el daño de membrana en hepatocitos frente a compuestos como paracetamol, hidróxido terbutílico, y tioacetamida, entre otros (Dutta y Paul, 2019). Gran parte de los estudios que sustentan estas afirmaciones están basados en experimentos *in vitro*, o fueron realizados con animales no humanos, por lo que es importante confirmarlos mediante ensayos clínicos.

En cuanto a los riesgos relacionados al consumo de kombucha en los hogares pueden existir posibilidades de contaminación por mohos acidófilos de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* que pueden ser causa de intoxicaciones (Dufresne y Farnworth, 2000; Watawana *et al.*, 2015; Villarreal-Soto *et al.*, 2018; Dutta y Paul, 2019; Bishop *et al.*, 2022a). Además, si la kombucha es dispuesta en recipientes de cerámica, algo en desuso actualmente, puede propiciar contaminaciones inorgánicas ya que parte del plomo presente en este material puede eluir a la bebida debido a la acidez (Watawana *et al.*, 2015; Dutta y Paul, 2019). Por último, se han reportado casos de náuseas, mareos, problemas de estómago, reacciones alérgicas, dolor de cabeza e ictericia en personas con enfermedades o condiciones previas, como pacientes con VIH y por consumos de grandes cantidades de kombucha (Watawana *et al.*, 2015; Martínez Leal *et al.*, 2018; Miranda *et al.*, 2022).

1.3.3 Proceso de producción

La infusión de las hojas de *C. sinensis* es el principal sustrato utilizado en la preparación de la kombucha. Esta planta es originaria del sudeste de Asia, aunque actualmente es cultivada en más de 30 países alrededor del mundo y a partir de

ellas se realizan una gran variedad de infusiones generalmente denominadas como té (Deb y Pou, 2016). Cabe destacar que el té es consumido desde hace más de 5.000 años, y hoy en día es la bebida más consumida en el mundo después del agua (Villarreal-Soto *et al.*, 2018). La variante que concentra el 75% de la producción es la del té negro, el cual se produce a partir de hojas frescas de *C. sinensis* que son recogidas y puestas a secar, realizándose luego un macerado y dejando que se oxiden nuevamente (Deb y Pou, 2016). En cambio, en la cadena de producción del té verde (segundo en producción mundial) no se produce una oxidación tan fuerte, por lo que las hojas presentan otro color, y la infusión resultante tiene diferentes propiedades (Miranda *et al.*, 2020). Por otro lado, el té rojo, o Pu-erh, se caracteriza por tener un proceso de fermentación especial dado principalmente por *Aspergillus* sp (Lv *et al.*, 2013). En mayor o menor medida todas las infusiones de té poseen una batería de antioxidantes, entre los que destacan las catequinas, taninos y otros polifenoles (Miranda *et al.*, 2020).

A pesar de que la kombucha se prepare tradicionalmente a base de té, siendo el té negro el sustrato mayoritario (Miranda *et al.*, 2020), existen otras bebidas fermentadas con un SCOBY pero con sustratos diferentes, llamadas análogos de kombucha. Se destacan infusiones de hierbas o flores, jugos de fruta, leche, productos de soja, café, cáscara de banana e incluso brebajes de roble, menta o eucalipto (Miranda *et al.*, 2020; Júnior *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022). En Argentina y Uruguay muchos productores fermentan la infusión preparada a partir de las hojas de *Ilex paraguariensis*, comúnmente llamada yerba mate. Incluso, se han investigado potenciales beneficios de la kombucha preparada a partir de jugo de maqui (*Aristotelia chilensis*, planta autóctona de la ecorregión andino-patagónica) (Rocha-Guzmán *et al.*, 2023). Debido a que muchos de estos ingredientes poseen gran cantidad de polifenoles, es común que las bebidas fermentadas resultantes posean mayor cantidad de estos compuestos antioxidantes, en comparación a la kombucha de té negro (Dutta y Paul, 2019). Otro de los productos interesantes es la kombucha de leche, que gelifica a pH bajos (4,4 - 4,6) dando una textura similar a la del yogur (Dutta y Paul, 2019).

El proceso de producción de kombucha no requiere de un gran equipamiento, ni de elementos costosos o difíciles de conseguir. Sin embargo, ciertos factores como la temperatura y tiempo de fermentación, sustrato, niveles de oxígeno y origen del inóculo microbiano influyen enormemente en las características finales de la bebida

(Miranda *et al.*, 2022). La forma más común de producir kombucha es preparar una infusión disolviendo una cantidad de azúcar variable (entre 30 y 100 g por litro) en agua hirviendo, a la que se agrega hojas secas de té (Dutta y Paul, 2019). El tipo de agua utilizada es muy importante, ya que si se emplea agua con una excesiva mineralización o cargada con fluoruros y cloruros, como el agua de red, pueden verse afectados negativamente los microorganismos fermentadores. En estos casos algunas industrias utilizan un filtro de carbono activado para retener estas moléculas (Bishop *et al.*, 2022a). Una vez preparada la infusión, se la deja enfriar hasta los 20°C y se le agrega entre un 10 y 20% de una kombucha anterior (líquido iniciador) (Kim y Adhikari, 2020) y, opcionalmente, el SCOBY. El hecho de agregar el líquido iniciador hace que el pH de la mezcla disminuya rápidamente, inhibiendo el crecimiento de microorganismos contaminantes. En el método artesanal, la kombucha se prepara en un recipiente limpio de boca ancha cubierto con una tela de algodón (Dutta y Paul, 2019). De esta manera se mantiene la aerobiosis y, a la vez, se evitan contaminaciones por insectos (Kim y Adhikari, 2020; Dutta y Paul, 2019). Cuando se produce kombucha industrialmente, el líquido es transferido a grandes tanques de fermentación de acero inoxidable que permiten mantener controlados los niveles de oxígeno (Soares *et al.*, 2021). La bebida se deja fermentar entre siete a 21 días, a una temperatura ideal de 25°C. Pasado este tiempo, se puede observar una película en forma de disco, el “SCOBY hijo”, en la superficie (Kim y Adhikari, 2020). Luego de retirar toda la celulosa, el líquido es envasado, mientras se lo saboriza agregando jugo de frutas, hierbas o más azúcar. La bebida demora entre dos y cinco días en tomar los nuevos sabores (Soares *et al.*, 2021). En esta última etapa puede ocurrir una segunda fermentación anaeróbica y una gasificación por acción de las levaduras (Miranda *et al.*, 2022; Tran *et al.*, 2020a). En otros casos, se trata de evitar una segunda fermentación y, al momento de agregar los saborizantes, la kombucha es transferida a otro tanque y refrigerada a 4°C, de forma de disminuir la actividad de los microorganismos presentes (Dutta y Paul, 2019). Para lograr una bebida gasificada con este método, suelen realizarse carbonataciones artificiales. Una vez concluida la producción, la bebida debe ser refrigerada a 4°C (Miranda *et al.*, 2022; Soares *et al.*, 2021) y envasada en latas o botellas.

Con el fin de eliminar microorganismos no deseables o frenar una fermentación excesiva, algunos kombucheros suelen pasteurizar sus productos. Durante este

proceso se calienta el producto a aproximadamente 60°C durante 30 minutos. Sin embargo, esta aplicación no asegura la eliminación completa de microorganismos. Cuando se busca destruir a todos los microorganismos, la kombucha suele calentarse muy rápidamente hasta aproximadamente 130° durante unos breves segundos (PRO engineering and Manufacturing). Un método novedoso y muy eficiente es la aplicación de pulsos eléctricos a la bebida, destruyendo las membranas celulares microbianas (Dutta y Paul, 2019).

1.3.4 Factores que afectan a la producción

Las características fisicoquímicas y sensoriales finales de la kombucha dependen de muchas variables relacionadas al sustrato, inóculo y proceso productivo. Según Dutta y Paul (2019), la variable más importante es la duración de la fermentación. Se ha observado que con tiempos de fermentación relativamente cortos (seis a diez días) se puede obtener una bebida más afrutada y poco ácida (Bishop *et al.*, 2022a), mientras que, cuando la fermentación se extiende a más de 14 días, la capacidad antioxidante de la kombucha disminuye, así como la cantidad de ácidos se incrementa (Amarasinghe *et al.*, 2018), alterando las propiedades sensoriales y predominando un gusto más avinagrado (Villarreal-Soto *et al.*, 2018; Miranda *et al.*, 2022). Otro factor de suma importancia en el proceso de fermentación de la kombucha es la temperatura. Generalmente, el rango de temperatura de fermentación se sitúa entre los 22 y 30°C (Villarreal-Soto *et al.*, 2018), considerando los 25°C como el punto ideal (Kim y Adhikari, 2020). Se ha estudiado que, a mayores temperaturas, (37°C) se obtiene un producto con mayor cantidad de metabolitos deseables como la vitamina C, aunque también puede producirse una acumulación excesiva de ácido acético (Loncar *et al.*, 2006; Bishop *et al.*, 2022a), al favorecer el desarrollo de las bacterias por sobre las levaduras. Otra variable de gran importancia en el proceso productivo son los niveles de oxígeno, ya que su presencia limita la producción de etanol por parte de las levaduras y favorece la producción de ácido acético por parte de las bacterias ácido acéticas (BAA). Los niveles de oxígeno pueden ser bajos durante el proceso si el fermentador posee una boca demasiado angosta, no permitiendo el intercambio de aire (Tran *et al.*, 2022b). Otros factores que pueden afectar a la producción de kombucha son el tipo y cantidad de azúcar (Amarasinghe *et al.*, 2018; Muhialdin *et al.*, 2019), el tipo de té

(Gaggia *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2022; Rocha-Guzmán *et al.*, 2023), así como la cantidad y composición microbiana del inóculo utilizados.

1.3.5 Microbiología

La composición microbiológica de la kombucha varía enormemente dependiendo del origen geográfico de las muestras, del ambiente donde se la produce, y del tipo de té utilizado, entre otros factores (Jayabalan, 2014; Lavefve *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022; Andreson *et al.*, 2022). Su concentración microbiana ronda las 10^5 - 10^8 Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) (Jarrell *et al.*, 2000; Bishop *et al.*, 2022a). La distribución de los microorganismos en el fermento es heterogénea, siendo mayor la presencia de bacterias en la matriz de celulosa que en la porción líquida. Este biofilm está compuesto tanto por bacterias como por levaduras y ayuda a exponer a las bacterias a un mayor nivel de oxígeno al acercarlas a la superficie, protegiéndolas de cambios ambientales y favoreciendo la fermentación (Laavanya *et al.*, 2021). Las levaduras y bacterias cooperan entre sí, ya que los productos metabólicos de unas sirven como sustrato para las otras. Además, esta compleja simbiosis no solo les permite prosperar, sino que inhibe el crecimiento de otros microorganismos contaminantes (Villarreal-Soto *et al.*, 2018). El metabolismo de los diferentes sustratos y la interrelación entre los grupos de microorganismos se resumen en la Figura 2.

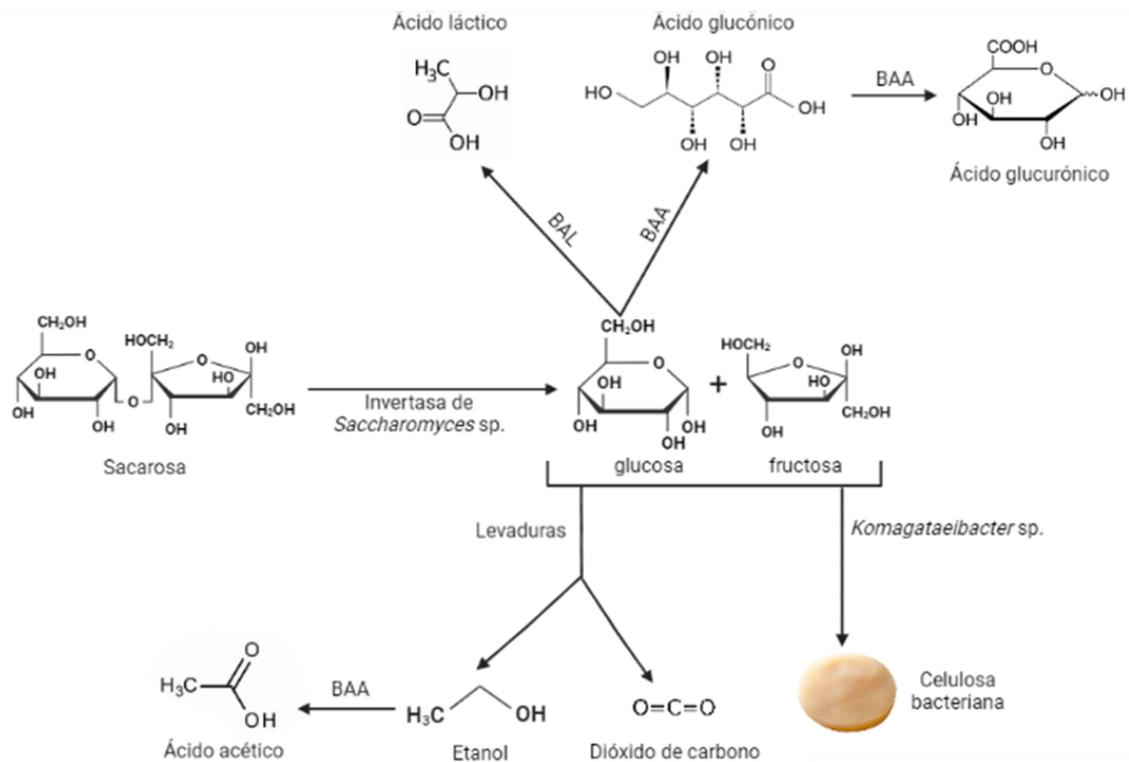


Figura 2. Resumen de las principales reacciones bioquímicas y metabólicas durante la fermentación de la kombucha. BAA: bacterias ácido acéticas, BAL: bacterias ácido lácticas.

Bacterias

Existe una gran diversidad bacteriana en la composición de la kombucha. En primer lugar, se puede mencionar a las BAA, que son las más numerosas. La mayoría son móviles, con forma que varía desde elipsoidal hasta cilíndrica, son aerobias estrictas y difíciles de aislar en medios de cultivo (Mamlouk y Gullo, 2013; Gomes *et al.*, 2018; Lynch *et al.*, 2019; Bishop *et al.*, 2022a). Bajo microscopio, pueden observarse solas, en parejas o cadenas cortas. Las BAA más encontradas en kombucha se agrupan en los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Komagataeibacter* y *Komagaeibacter*, pertenecientes a la familia Acetobacteraceae (Villarreal-Soto *et al.*, 2018). Son las principales formadoras de ácido acético a partir de etanol o glicerol (Wang *et al.*, 2022), y algunas especies del género *Acetobacter* son capaces de producir dióxido de carbono. El camino metabólico de la conversión de etanol a ácido acético es facilitado por las enzimas alcohol y acetaldehído deshidrogenasas ubicadas en el periplasma de las bacterias,

formándose como intermediario el acetaldehído (Villarreal-Soto *et al.*, 2018), mientras que la oxidación del glicerol resulta en la formación de dihidroxiacetona. La capacidad de producir ácido acético varía según el género, siendo *Acetobacter* y *Komagataeibacter* los mayores productores de este ácido (Lynch *et al.*, 2019). Por otra parte, las BAA tienen la capacidad de producir ácido glucónico a partir de glucosa, y ácido glucurónico a partir del ácido glucónico (Lynch *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2022). Además, ciertas especies como *Gluconacetobacter kombuchae* y *Acetobacter nitrogenifigens* son fijadoras de nitrógeno (Coelho *et al.*, 2020). Por otro lado, la producción de celulosa está dada fundamentalmente por *Komagataeibacter xylinus*, y es producida principalmente a partir de fructosa y glucosa, aunque también pueden utilizarse otras fuentes de carbono como etanol o glicerol (Wang *et al.*, 2022). La presencia de ciertos compuestos como la cafeína facilitan la producción de este polisacárido (Laavanya *et al.*, 2021), mientras que altas concentraciones de etanol la inhiben.

El segundo grupo en importancia de bacterias es el de las BAL. Tienen forma de bacilo o coco, y son anaerobias o microaerobias, es decir que se desarrollan mejor en presencia de bajos niveles de oxígeno. Este grupo no siempre se encuentra en el consorcio microbiano, o están en baja proporción (Bishop *et al.*, 2022a). Sin embargo, se ha reportado que en ciertas kombuchas las BAL pueden llegar a representar hasta el 35% de la comunidad bacteriana (Laavanya *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022). Son las principales productoras de ácido láctico, que puede producirse por la oxidación de la glucosa, mediante la vía de Embden-Meyerhof-Parnas o ruta de las pentosas fosfato (Hutkins, 2019). Por esta última vía también pueden producir etanol, dióxido de carbono y hasta ácido acético, en el caso de que se oxide fructosa (Bishop *et al.*, 2022a). Las BAL brindan características organolépticas y saludables muy valiosas, ya que son potenciadoras de la producción del DSL, un compuesto con propiedades antioxidantes y desintoxicantes (Villarreal-soto *et al.*, 2018). Los géneros más comunes presentes en kombucha son *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, aunque también se pueden encontrar *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus* y *Pediococcus* (Wang *et al.*, 2022).

Levaduras

En la mayoría de los inóculos de kombucha, la población de levaduras supera en número a la de bacterias (Wang *et al.*, 2022). Las levaduras suelen ser inmóviles,

con formas muy variadas: desde esféricas, ovoides hasta casi cilíndricas, o con forma de ladrillo (Madigan *et al.*, 2003; Hutkins, 2019). Las encontradas en esta bebida están descritas como osmotolerantes, acidófilas, fermentadoras y productoras de etanol y ácidos (Angela, 2020; Jayabalan, 2014). Los géneros más comunes de levaduras encontrados en la kombucha son *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Saccharomycoides*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Torulaspora*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Lachancea*, *Starmerella* (Jayabalan, 2014; Villarreal-Soto *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2022; Kim y Adhikari, 2020; Dutta y Paul, 2019; Kaashyap *et al.*, 2021). Por medio de la enzima invertasa, presente principalmente en su periplasma, son capaces de hidrolizar la sacarosa, produciendo glucosa y fructosa (Bishop *et al.*, 2022b). Hay evidencias de que la invertasa se encuentra principalmente en levaduras del género *Saccharomyces*, siendo las verdaderamente responsables del desdoblamiento de la sacarosa. Se cree que la actividad es modulada de acuerdo al “dilema del prisionero”: un tipo de parasitismo en el que los microorganismos con poca actividad invertasa (bacterias y otras levaduras) aprovecharían esta actividad enzimática de *Saccharomyces* (Tran *et al.*, 2020a). A partir de los azúcares simples, las levaduras producen etanol y dióxido de carbono (Figura 2) (Madigan *et al.* 2019; Hutkins, 2019). Ciertas levaduras, como algunas especies del género *Brettanomyces*, son capaces de producir ácido acético, tanto a partir de glucosa como de etanol (Custers, 1940; Steensels *et al.*, 2015). Por otro lado, las levaduras son capaces de producir glicerol cuando se encuentran a altas presiones osmóticas, como es el caso del té azucarado (Bishop *et al.*, 2022a). Además, las levaduras producen otros compuestos como diferentes alcoholes, terpenos, aldehídos e hidrocarburos aromáticos (Wang *et al.*, 2023) que enriquecen notablemente el perfil aromático de la kombucha (Villarreal-Soto *et al.*, 2018; Tran *et al.*, 2020b).

SCOBY

El SCOBY es una matriz de celulosa que se va generando en la superficie de la kombucha durante la fermentación del té. La celulosa es producida principalmente por el género *Komagataeibacter*, aunque algunas otras especies de los géneros *Gluconacetobacter*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter* y *Rhizobium* son capaces de sintetizarla. El precursor de la celulosa es la uridina difosfato glucosa, un nucleótido sintetizado a partir de fosforilaciones de

glucosa (Laavanya *et al.*, 2021), aunque puede también obtenerse a partir de etanol, sacarosa o glicerol. Las bacterias sintetizan las cadenas de celulosa, que salen a través de poros o complejos terminales a alta velocidad. Luego, estas cadenas se agrupan entre sí, a la vez que flotan y llegan hasta la superficie. La acumulación de estos agregados forma una serie de capas que se ubican en la parte superior del líquido (Villarreal-Soto *et al.*, 2018; Bishop *et al.*, 2022b). Con el tiempo se produce una estructura 3D, que recuerda al pileo de un basidioma. La producción de esta celulosa está basada en un metabolismo aeróbico, por lo que ésta se detiene cuando el suministro de oxígeno se agota o es insuficiente (Villarreal-Soto *et al.*, 2018; Laavanya *et al.*, 2019). El SCOBY presenta una alta cristalinidad y porosidad y una gran resistencia a la tensión y temperatura, así como también una pureza superior a cualquier celulosa vegetal, y una capacidad de absorción de agua hasta 100 veces mayor (Villarreal-Soto *et al.*, 2018; Laavanya *et al.*, 2021). Actualmente, se está estudiando la celulosa bacteriana para una gran variedad de aplicaciones biotecnológicas. Al ser un producto no tóxico, tiene potenciales en la industria alimenticia. A su vez, podría utilizarse como agente de secuestro de metales pesados del agua, en aplicaciones de biorremediación (Ivanisova *et al.* 2019). Debido a la demostrada actividad antimicrobiana y la gran capacidad de absorción de líquido, se han manufacturado prototipos de apósitos y vendajes. Además, las nuevas tendencias de consumo llevan a la industria textil a buscar materias primas más sustentables, e innovando en el uso de la celulosa bacteriana para la confección de remeras, camisas, pulseras, entre otros productos (Laavanya *et al.*, 2019).

1.3.6 Compuestos químicos

La kombucha es una bebida rica en ácidos orgánicos, vitaminas, polifenoles, azúcares, minerales, cafeína y otros compuestos. La presencia y concentraciones de estos compuestos dependen del origen del inóculo, el tipo de té, la concentración de azúcares y características del proceso productivo (Villarreal-Soto *et al.*, 2018). El ácido orgánico mayoritario suele ser el acético, aunque se han estudiado muestras provenientes de Canadá, EE.UU, Irlanda y Reino Unido donde se encontró mayor proporción de ácido láctico (Marsh *et al.*, 2014). Otros ácidos que suelen estar presentes son los ácidos glucónico y glucurónico, siendo este último un compuesto de gran importancia para la salud, ya que actúa capturando y permitiendo la

excreción de varios compuestos tóxicos presentes en el hígado, como fenoles y bilirrubina (Martínez Leal *et al.*, 2018, Wang *et al.*, 2022). A su vez, es precursor de la vitamina C. Además, el ácido glucurónico puede ser convertido en glucosamina, fundamental para la formación de cartílago (Neffe-Skocinska *et al.*, 2017). En la kombucha, también pueden encontrarse otros ácidos como carbónico, cítrico, tartárico, succínico, malónico, pirúvico, oxálico, málico, fólico y úsnico (Neffe-Skocinska *et al.*, 2017; Dutta y Paul, 2019; Kim y Adhikari, 2020; Júnior *et al.*, 2022). La kombucha además suele presentar concentraciones variables de sacarosa, glucosa y fructosa, siendo estos los azúcares que quedan en el producto final luego de la fermentación y los agregados al saborizar la bebida. Un producto de especial importancia es el etanol, producido principalmente por las levaduras, ya que en función de su concentración final la bebida puede estar sujeta a diferentes regulaciones (Miranda *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2020). El etanol es producido en grandes cantidades cuando la fermentación no está controlada y se produce en condiciones de anaerobiosis. Se ha descubierto que la cantidad de alcohol producido también depende del tipo de té utilizado, siendo el té negro el mayor potenciador de la producción de alcohol (Miranda *et al.*, 2022). Se cree que el consumo de alcohol en dosis bajas, como las presentes en la kombucha, ayudaría a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Martínez Leal *et al.*, 2018). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los efectos del etanol en el organismo son muy complejos, y se asocia también a algunos problemas de salud (Matsumoto *et al.*, 2014), además de la contraindicación de su consumo en niños y embarazadas. Es común encontrar en este fermento una gran batería de vitaminas, destacándose el complejo vitamínico B y el ácido ascórbico, conocidos por su alto poder antioxidante (Miranda *et al.*, 2022). Además, en algunas muestras analizadas se han encontrado aminoácidos, purinas, aminos biogénicas y antibióticos, y minerales como hierro, cobre, cinc, manganeso y níquel (Angela *et al.*, 2020; Neffe-Skocinska *et al.*, 2017; Júnior *et al.*, 2022; Dutta y Paul, 2019; Miranda *et al.*, 2022; Kitwetcharoen *et al.*, 2023). También deben tenerse en cuenta los metabolitos que ya se encuentran en el té, siendo los más importantes los taninos, galotaninos, la cafeína, y varios tipos de polifenoles, como las catequinas y epicatequinas. Los polifenoles actúan como secuestradores de radicales libres, especialmente de las especies reactivas de oxígeno, siendo considerados potentes antioxidantes. Se ha observado que el contenido de catequinas y epicatequinas tiende a disminuir a partir

del noveno día de fermentación del té, aunque los valores se incrementan y compensan en el día doce. Esta gran variación en la concentración de polifenoles puede deberse a los cambios de actividad de enzimas microbianas no identificadas, que serían activadas o inactivadas de acuerdo al pH de la kombucha (Dutta y Paul, 2019; Miranda *et al.* 2022). Cabe destacar que las variedades de polifenoles, y sus cantidades varían enormemente de acuerdo al tipo de té, siendo el té verde el que mayor cantidad de antioxidantes posee (Dutta y Paul, 2019).

1.3.7 Aspecto sensorial

El aspecto sensorial de la kombucha está poco estudiado, y menos aún con herramientas estadísticas, sin embargo en los últimos años se ha investigado más sobre este tema (Tran *et al.*, 2020a). El resultado organoléptico de estas bebidas depende del tipo de té utilizado, las condiciones de preparación y el acervo microbiano presente. En general, es considerada una bebida armónica, refrescante y agradable, con una aceptabilidad similar a la del té, pero con una mayor intensidad de sabor (Ivanisova *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020).

En apariencia, suele ser una bebida con partículas en suspensión y una turbidez media debido a la celulosa producida por las BAA y por los agregados de proteínas y polifenoles. También pueden encontrarse restos de saborizantes agregados, como semillas o pulpas. El color suele variar mucho, ya que está dado principalmente por los polifenoles provenientes del té, como las teaflavinas que son las contribuyentes más importantes a la coloración. En general, se respetan los tonos claros en preparaciones basadas en té blanco y verde, y los oscuros en las basadas en té negro y rojo. El color de la bebida es distinto al del sustrato debido a los cambios de pH y a la actividad microbiana que alterarían los pigmentos del té. Los saborizantes agregados también pueden influir en el color de la bebida. Un componente significativo en el aspecto visual de la kombucha es también el burbujeo o efervescencia, proveniente del dióxido de carbono producido por levaduras o de la carbonatación artificial (Gramza-Michalowska *et al.*, 2016; Tran *et al.*, 2020a; Bishop *et al.*, 2022a).

El aroma de la kombucha suele asociarse al de la sidra debido principalmente a la actividad de las levaduras y BAA. Un aroma infaltable es el avinagrado proveniente del ácido acético producido por las BAA. Otros aromas presentes en la kombucha provienen de alcoholes amílicos (afrutado), propanol (afrutado), butanol (remedio o

bálsamo), octanol (cítrico) o lactato de etilo (crema, afrutado) producidos por las levaduras. También puede percibirse el alcohol presente, que suele reconocerse como un picor en el epitelio respiratorio. Los compuestos orgánicos volátiles propios del té suelen perderse y no detectarse, como por ejemplo el geraniol, linalool y damascenonas (Gramza-Michalowska *et al.* 2016; Tran *et al.* 2020a; Bishop *et al.* 2022a).

Respecto al sabor y sensaciones en boca, la bebida se describe como dulce, carbonatada, ácida, astringente, avinagrada, afrutada, levemente amarga y reconociendo muchas veces que está basada en té. El dulzor está dado por el azúcar remanente de la fermentación. El grado de carbonatación depende de la actividad de las levaduras y/o de la carbonatación artificial que suele percibirse como un hormigueo o irritación en la boca y garganta. La acidez se corresponde con la cantidad de ácidos orgánicos presentes, siendo el ácido acético el que suele percibirse con mayor intensidad y con sabor avinagrado, aunque también puede apreciarse el ácido láctico que se percibe como sabor alimonado. La cafeína y los polifenoles son las moléculas principales que provocan la astringencia y amargor, aunque también contribuye el etanol. En general es una bebida menos amarga que el té, ya que durante el proceso de fermentación los microorganismos liberan aminoácidos que reducen el efecto de ciertos alcaloides presentes en la infusión original, como la cafeína y teobromina (Gramza-Michalowska *et al.*, 2016). El alcohol presente en la bebida suele encontrarse en baja proporción, por debajo del umbral de detección gustativo (1-2% v/v), sin embargo, en algunas kombuchas se presentan altos niveles de este compuesto, pudiendo generar un impacto negativo en su sabor (Bishop *et al.*, 2022b; Andreson *et al.*, 2022; Tran *et al.*, 2020a; Kombucha Brewers International).

Los deméritos (también llamados “*Off flavours*”) presentes en la bebida se encuentran prácticamente sin explorar. La presencia de estos compuestos pueden reducir la tomabilidad de la bebida, es decir, la disposición del evaluador a seguir consumiendo el producto. La asociación Kombucha Brewers International (KBI) identifica algunos, dados por desviaciones en la fermentación, destacando el olor y sabor a sulfuros (huevo podrido), acetato de etilo (solvente, acetona), ácido butírico (vómito de bebé o lácteo) y oxidado (trapo mojado o cartón).

1.3.8 Mercado y regulaciones

En general, la kombucha se prepara en forma casera y es esparcida entre sus consumidores compartiendo el SCOBY (Kim y Adhikari, 2020). Sin embargo, al ser una bebida cada vez más popular, muchas empresas alrededor del mundo comenzaron a producir kombucha industrialmente. El mercado se ha distribuido en la venta de kombucha “clásica” sin saborizar y en aquella con frutas o saborizantes agregados, siendo esta última actualmente la más popular (Andreson *et al.*, 2022). La producción de este fermento aumenta aproximadamente un 30% año a año y es de las bebidas de mayor crecimiento. El valor global de la kombucha en el mercado es de 1,5 miles de millones de dólares y se espera que para 2025 este valor sea de 5 mil millones (Kim y Adhikari, 2020; Andreson *et al.*, 2022). Diferentes agencias gubernamentales han propuesto regulaciones con las cuales buscan controlar la calidad de la kombucha. En algunos países, como Estados Unidos, se ha propuesto definir a la kombucha como “una bebida fermentada únicamente por un cultivo simbiótico de bacterias y levaduras que no contiene más de un 1,25% de alcohol por volumen, y es derivada de azúcar, o malta, té o café, y está compuesta por no más de un 20% de otros ingredientes saludables”. En otros países, como Brasil, se han incluido otros parámetros como el pH, que debe situarse entre 2,5 y 4,2, y la graduación alcohólica que debe ser igual o menor a 0,5% v/v si se la quiere considerar una bebida analcohólica (Miranda *et al.*, 2022).

En el año 2014, se fundó KBI, una asociación sin fines de lucro con sede en Estados Unidos. Sus objetivos fundamentales son popularizar este fermento y ayudar a crear regulaciones relacionadas a su producción. Esta asociación generó un código en donde se establece la definición de kombucha y las características que la bebida debe tener en cuanto a pH, composición microbiológica, ingredientes admitidos obligatorios y opcionales, las cantidades de alcohol admitidas en la kombucha tradicional y en la llamada “hard kombucha” (una kombucha más alcohólica), la posibilidad de filtración de la bebida, los requerimientos de higiene generales y el perfil analítico fisicoquímico. Estas especificaciones se han utilizado como base para crear legislaciones, además de los valores proporcionados por los estudios científicos publicados. Entre las especificaciones analíticas más importantes, según esta asociación, se encuentran un pH de entre 2,2 y 3,8, acidez titulable entre 0,27 y 2,03 %, etanol entre 0 y 3,2 % ABV y una composición

microbiana que incluye bacterias ácido acéticas en una proporción superior al 50% (*Acetobacter* sp., *Gluconacetobacter* sp., *Komagataeibacter* sp.) y levaduras (*Brettanomyces bruxellensis*, *Saccharomyces* sp., *Starmerella* sp., *Zygosaccharomyces* sp.), aunque estas últimas pueden variar por región. La misma organización ha generado una guía de evaluación sensorial que incluye la apreciación de las diferentes cualidades sensoriales de la kombucha (aroma, sabor, deméritos, color, sensación en boca, etc.).

En mayo de 2022, la kombucha se incluyó en el artículo 1084 bis del Capítulo XIII (Bebidas Fermentadas) del Código Alimentario Argentino (CAA), siendo la primera legislación nacional que aprueba el consumo y producción de este fermento. La kombucha es definida como “una bebida fermentada analcohólica y gasificada, obtenida a través de la respiración aeróbica y fermentación anaeróbica de un mosto compuesto de una infusión de *Camellia sinensis* L. y azúcares.” Asimismo, el reglamento aclara que la kombucha debe ser fermentada por un cultivo compuesto con algunos de los siguientes géneros: *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Lactobacillus*, *Gluconobacter*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Brettanomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Saccharomycodes* o *Torulaspota*. A su vez, indica parámetros fisicoquímicos, como un pH entre 2,4 y 4,2, una graduación alcohólica máxima de 0,5% v/v y una acidez volátil entre 30 y 130 mEq/L.

Por otro lado, la reciente Ley 27.642 de Promoción de la Alimentación Saludable (conocida como “Ley de Etiquetado Frontal”), establece que las bebidas no alcohólicas deben llevar el octógono “exceso en azúcares” cuando el 20% o más de sus calorías provengan de los azúcares añadidos y sea mayor a 0,5 g/100 mL.

En nuestro país, el consumo de bebidas analcohólicas se encuentra concentrado y enfocado en gaseosas industriales. Sin embargo, con la inclusión de la kombucha en el CAA, se espera que la producción y consumo de este fermento crezcan exponencialmente. La cantidad de productores de kombucha es incipiente, con una elaboración anual de 200.000 litros, pero en plena expansión y con más de 20 marcas. Estas empresas suelen distribuir sus productos al por menor en dietéticas, almacenes naturales y restaurantes. Además, pequeñas y medianas industrias agrícolas también elaboran kombucha como producto de valor añadido utilizando sus cultivos, siendo estos productos vendidos en mercados locales (relevamiento propio).

A pesar del mercado actual, y las expectativas de crecimiento en Argentina, hasta el momento, no se han estudiado las características fisicoquímicas, sensoriales y microbianas de las kombuchas argentinas.

1.4 Objetivos

Objetivo general

Teniendo en cuenta el crecimiento del sector kombuchero en Argentina y que no existen estudios sobre las características microbianas, fisicoquímicas y sensoriales de las kombuchas argentinas, en este trabajo de tesina se propone como objetivo general estudiar las kombuchas producidas en Argentina caracterizándolas fisicoquímica, microbiológica y sensorialmente, comparándolas con las especificaciones del CAA y con kombuchas analizadas en otros países. Adicionalmente, se propone evaluar si existen relaciones entre los resultados de los análisis fisicoquímicos y microbiológicos con los resultados de los estudios sensoriales.

Objetivos específicos

- Relevamiento de las producciones comerciales de kombuchas argentinas y selección de muestras a analizar.
- Caracterización de la composición microbiológica de las kombuchas argentinas.
- Caracterización fisicoquímica de las kombuchas producidas en nuestro país.
- Evaluación del perfil sensorial de las kombuchas argentinas y su relación con sus características fisicoquímicas y microbiológicas.

2. Materiales y métodos

2.1. Confección de base de datos

Se realizó una encuesta a diez productores de kombucha de Argentina a través de Google Forms, con el fin de obtener datos relevantes de su producción como nombre del emprendimiento, ciudad del establecimiento, control de calidad actual de las kombuchas, existencia de análisis de laboratorio previos, recetas, presencia de segunda fermentación, tiempos y temperaturas de fermentación.

2.2 Toma de muestras

Se contactó a los productores de kombucha de distintas regiones del país para coordinar el envío de muestras al laboratorio. En total, se recibieron seis kombuchas del mismo lote, de sabor limón/jengibre o similar de diez marcas diferentes. Tres muestras se utilizaron para la caracterización fisicoquímica y microbiológica, mientras que las otras tres se utilizaron para el estudio sensorial. Posteriormente, se realizaron informes con los resultados de los análisis con el objetivo de informar a los productores. Para preservar la confidencialidad y datos sensibles, se codificaron los nombres de las empresas.

2.3 Caracterización microbiológica

2.3.1 Aislamiento de microorganismos

Se prepararon diluciones seriadas en base 10 (-1, -2, -3, -4, -5) de las muestras de kombucha en agua peptonada bufferada. Las diluciones fueron sembradas en WL (Wallerstein Laboratory) Differential Agar (WLD) + 0,5 mg/mL de cicloheximida incubado a 30°C durante 48-72 h para el aislamiento de bacterias ácido acéticas, Man Rogosa and Sharpe Agar (MRS) + 0,5 mg/ml de cicloheximida en microaerobiosis incubado a 30°C durante 48-72 h para bacterias ácido lácticas y Agar Sabouraud Dextrosa (ASD) + 0,1 mg/mL de cloranfenicol incubado a 25°C durante 48-72 h para el aislamiento de levaduras. La composición de los medios de cultivo se encuentra en la Tabla Suplementaria 1. Se realizó el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL teniendo en cuenta la dilución de las

placas en las que se pudieran contar entre 30 y 300 colonias. Para esto, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Recuento (UFC/mL)} = \text{CPC} / (\text{V} * 1,1 * \text{DC})$$

Donde:

CPC: Suma de recuento de dos placas de diluciones consecutivas

V: Volumen de muestra sembrado por placa en mL

DC: Dilución más concentrada

Además, se analizaron las colonias a simple vista y bajo lupa y aquellas colonias (tres de cada tipo) que se observaban diferentes en cuanto a morfología, color, tamaño, aspecto fueron repicadas a una nueva placa del mismo medio. Se registraron las características de cada colonia. Además, se observaron las células bajo microscopio y se tomaron fotografías (Figuras suplementarias 3 - 12). Los aislamientos obtenidos se conservaron en ultrafreezer a -80°C en glicerol al 20% con el fin de generar un banco de bacterias y levaduras de kombucha.

2.3.2 Identificación molecular de los microorganismos aislados

2.3.2.1 Extracción de ADN

Se extrajo el ADN de cada aislamiento. Para levaduras, se utilizó el método de cloroformo-álcohol isoamílico. Los microorganismos aislados en placa se suspendieron en un tubo con 500 µL de EDTA 5mM y se centrifugaron a 3000 g durante 5 min. Los pellets se congelaron a -80°C durante 30 min y se descongelaron en baño de agua a 65°C durante 5 min. Luego, se agregó a cada tubo 100 µL de perlas de vidrio, 500 µL de buffer de lisis (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 2% Triton X-100, 1% SDS) y 250 µL de cloroformo-isoamílico 24:1. Posteriormente, los tubos se agitaron durante 20 min a temperatura ambiente con vórtex y se centrifugaron a 13.000 x g durante 10 min. Luego, se transfirió la fase superior a un nuevo tubo, se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío, se centrifugó a 13.000 x g durante 5 min y se lavó con 500 µL de etanol al 70%. Para bacterias, se extrajo el ADN siguiendo las instrucciones del kit comercial Wizard Genomic DNA Purification de Promega Corporation (Estados Unidos). Brevemente, los microorganismos aislados de placa fueron suspendidos en EDTA e incubados con lisozima y proteinasa K para destruir su pared celular y membranas. Luego,

mediante el lavado con una serie de alcoholes se purificó el ADN. Cada pellet fue suspendido en 100 µL de agua ultrapura y se conservó a -20°C hasta su utilización (Green *et al.*, 2001).

2.3.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se identificaron las cepas de levaduras conservadas amplificando y secuenciando la región ITS1/ITS2. Los cebadores que se utilizaron fueron ITS1: 5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3' e ITS4: 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'. Para identificar las cepas de bacterias se amplificó y secuenció una región del 16S ARNr. Se utilizaron los cebadores 27F: 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3' y 1492R: 5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3'. La mezcla de reacción consistió en: buffer (10% v/v), Mg⁺² (2,5mM), dNTPs (200µM), cebadores (1µM cada uno), TAQ polimerasa (0,025 µM) y 150 ng de ADN. La PCR se llevó a cabo con un ciclo de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido de 36 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, apareamiento a 52°C por 30 s y extensión a 72°C por 2 min. Todos los productos de PCR se sembraron y corrieron en un gel de agarosa al 1% teñido con GelRed en TAE 1X (Tris-acetato 0.04 M, EDTA 0.001 M, pH 8.0) y se visualizaron bajo luz UV (Figura suplementaria 1). Los productos de PCR se purificaron con el kit ADN Puriprep GP-kit (Inbio Highway). Luego se enviaron a Macrogen para su secuenciación bidireccional con el método Sanger. Las secuencias obtenidas se analizaron utilizando el programa BioEdit y se compararon con la base de datos BLASTn para su identificación (Altschul *et al.*, 1997).

2.4. Caracterización fisicoquímica

2.4.1. Determinación de pH

La determinación de pH se realizó utilizando un pHmetro Sartorius Pro Series calibrado y utilizando una sonda Ohaus ST210.

2.4.2. Determinación de Acidez

Una alícuota de 10 mL de kombucha se desgasificó por agitación en shaker durante 15 min y se tituló con NaOH 0.1 N hasta pH 8.2 (punto de inflexión de la fenolftaleína). Brevemente, la muestra de kombucha desgasificada se colocó en un

vaso de precipitados con dos gotas del indicador fenolftaleína. Se agregó la solución de NaOH, cargada en una bureta graduada, gota a gota, hasta el primer cambio de color (pH 8.2). Se registró el volumen agregado de NaOH. La acidez total titulable se expresó en mEq/L, mediante la fórmula:

$$\text{Acidez Total} = (\text{Volumen NaOH} * \text{concentración NaOH} * 1000) / \text{masa kombucha}$$

Donde los volúmenes se expresaron en mL, la masa en g y la concentración en eq/L.

2.4.3. Cuantificación de alcohol y densidad

Una muestra de 50 mL de kombucha se desgasificó por agitación en shaker durante 15 min y se centrifugó a 7.000 rpm. Luego, se inyectó una muestra de agua destilada (blanco) y la muestra de kombucha en un alcoholímetro Anton Paar Alex 500. Se registró el % v/v de etanol en modo sidra y en modo cerveza, ya que son los modos en los cuales el alcoholímetro tiene mayor sensibilidad a bajas concentraciones de alcohol. Con el mismo instrumento se obtuvieron los valores de densidad (g/mL) en base a la cual se calculó la concentración de alcohol en g/100 mL.

2.4.4. Determinación de ácidos orgánicos, azúcares y etanol

El contenido de ácidos orgánicos en las muestras de kombucha se determinó de acuerdo a Neffe-Skocinska *et al* (2017). Una muestra de 10 mL de cada muestra de kombucha se desgasificó por agitación en shaker durante 15 min, se centrifugó a 7.000 rpm durante 10 min a 4°C y se filtró con filtros de nylon de 0.45 µm. Se agregaron 2 mL de muestra filtrada en un matraz y se llevó a volumen de 10 mL con agua miliQ. Los ensayos se realizaron en un Cromatógrafo Líquido marca Waters 600E, autosampler Waters 717 plus y detector de índice de refracción Waters 2414. La separación se realizó con una columna cromatográfica Rezex™ROA-Organic acid - 300 x 7.8 mm. Una solución de ácido sulfúrico 0.005N se usó como fase móvil usando un flujo de 0,6 mL/min. El volumen de la muestra inyectada fue de 10 µL. Se realizaron 2 inyecciones por muestra. Para la adquisición y procesamiento de datos se empleó el software Empower 2. El análisis cuantitativo se logró a través de curvas de calibración.

Se prepararon soluciones stock de cada estándar según la siguiente tabla, teniendo en cuenta las concentraciones de cada compuesto encontradas habitualmente en kombucha:

Compuesto	Peso (g) / Volumen (mL)	Volumen final (mL)	Concentración final Stock (g/100 mL)	g/L
Glucosa	1	10	10	100
Fructosa	1	10	10	100
Ácido acético	0.3	10	3	30
Ácido láctico	0.1	10	1	10
Ácido glucurónico	0.3	10	3	30
Etanol	1	10	10	100

Curvas de calibración: Se prepararon curvas de calibración de cinco puntos a partir de cada una de las soluciones stock, con diluciones al medio las primeras cuatro y dilución al quinto la última.

Glucosa y fructosa (g/L): 100-50-25-12,5-2,5

Acético (g/L): 30-15-7,5-3,75-0,75

Láctico (g/L): 10-5-2,5-1,25-0,25

Glucurónico (g/L) 30-15-7,5-3,75-0,75

Etanol(%): 10-5-2,5-1,25-0,25

Se pasaron 800 µl de cada punto de la curva a viales para HPLC y se mantuvieron refrigerados hasta procesamiento.

Condiciones de la corrida cromatográfica:

Fase móvil: Agua milli-Q con ácido sulfúrico 0,005 N.

Temperatura de Columna: 60°C.

Temperatura de Detector RI: 40°C.

Para cada punto de los estándares, se graficó el área del compuesto versus la concentración correspondiente, obteniendo la curva de calibración y la ecuación lineal de ajuste a la curva. Ingresando en la ecuación el área obtenida para cada compuesto presente en la muestra, se obtuvo la concentración del mismo (Figura suplementaria 2). La suma de glucosa y fructosa se consideró como “azúcar remanente”, ya que la sacarosa es hidrolizada cuando se corre en la columna cromatográfica utilizada.

2.5. Evaluación de perfil sensorial

El perfil sensorial de las muestras fue evaluado por el panel de cata entrenado en kombucha del CRELTEC. Un total de siete panelistas aplicó un análisis descriptivo a las muestras de kombucha indicando niveles de presencia de los descriptores especificados según KBI utilizando una escala de 0 (no presente) a 5 (muy intenso) (ASBC, 2009; Tran *et al.*, 2020b).

Los descriptores evaluados fueron:

- Aromas: afrutado, especiado, herbal, terroso, floral, ácido acético, ácido láctico y alcohol.
- Sabor y sensaciones en boca: afrutado, especiado, ácido acético, ácido láctico, alcohol, amargor, dulzor, astringencia y carbonatación.
- Deméritos: aroma y sabor a sulfuros (huevo podrido), acetato de etilo (solvente, acetona), ácido butírico (vómito de bebé o lácteo) y oxidado (trapo mojado o cartón)

Además, se les solicitó a los panelistas que indicaran el grado de tomabilidad que presentaba la muestra en una escala del 0 (tomabilidad muy baja) y 5 (tomabilidad alta).

2.6. Análisis de datos

Los microorganismos fueron agrupados taxonómicamente (a nivel de familia, género y especie cuando fue posible) y de acuerdo a sus características metabólicas se calculó tanto el recuento (UFC/mL) como el porcentaje de cada tipo de

microorganismo por kombucha y por medio de cultivo. Los gráficos se realizaron con el programa GraphPad Prism 9.3.0.

Las determinaciones fisicoquímicas se realizaron en tres muestras que correspondieron a tres envases (latas o botellas) diferentes del mismo lote.

Se calculó y se graficó la media \pm el desvío estándar de cada parámetro analizado (pH, acidez total, y concentraciones de ácidos, etanol y azúcares por HPLC) con el programa GraphPad Prism 9.3.0.

Además, se compararon las mediciones de etanol obtenidas con el alcoholímetro en modo sidra y cerveza con las obtenidas por HPLC utilizando el test t pareado con el programa R commander versión R 4.1.0. Se tomó un nivel de significancia de $p < 0,05$.

Para la descripción sensorial general, se promediaron los valores de todas las kombuchas para cada descriptor. Para la caracterización sensorial de sabores, aromas y deméritos se promediaron los valores de cada descriptor para cada kombucha. Se realizaron gráficos de araña con el programa Excel 2016.

En los casos de relación entre variables, como variables fisicoquímicas y/o sensoriales, se realizaron Análisis de Componentes Principales (ACP) y de agrupación jerárquica, de forma similar a Tran *et al.* (2022a). Tanto los análisis como los gráficos fueron realizados con el paquete R Commander, versión R 4.1.0. Para los ACP, se buscó que se explicara como mínimo un 70% de la varianza en los primeros dos componentes. Debido a esto, se eliminaron las variables muy correlacionadas, conservando aquellas de mayor interés (Figura suplementaria 13). Se graficaron las primeras dos componentes en forma de biplots. Para el análisis de cluster y agrupación jerárquica, se utilizaron las primeras dos componentes obtenidas. Para la separación de los grupos, se utilizó el método de Ward y distancia euclidiana.

3. Resultados

3.1. Resultados de encuesta a productores

Se realizó una encuesta a los productores para obtener datos relevantes sobre la producción de kombucha. Ocho productores contestaron la encuesta. Las kombuchas provinieron de CABA, Río Negro, Córdoba y Buenos Aires. La mayoría de las muestras fueron de sabor jengibre y en formato lata. La capacidad de producción de cada empresa estuvo entre 1000 y 2500 litros mensuales. Según los resultados de la encuesta, el proceso de fermentación de las kombuchas fue variable entre productores: el tiempo de fermentación fue desde 6 hasta 29 días, el azúcar agregado al inicio de la fermentación varió entre 3,8 y 6,7 g/100 mL, la mitad de los productores declararon usar carbonatación artificial y el 70% contestó que realiza mediciones de pH y grados Brix.

3.2. Caracterización microbiológica

3.2.1. Recuento de microorganismos

Las muestras de kombuchas se sembraron en diferentes medios de cultivo y se realizó un recuento de colonias en placa para cada tipo de medio.

En todas las muestras hubo crecimiento de microorganismos aunque las kombuchas presentaron concentraciones microbianas variables. La kombucha K6 presentó el número más bajo con $1 \cdot 10^5 \pm 9 \cdot 10^3$ UFC/mL. En cambio, la muestra K3 presentó el recuento total más alto con $3 \cdot 10^7 \pm 9 \cdot 10^4$ UFC/mL.

3.2.2. Clasificación de microorganismos a nivel de familia y género

Con el fin de identificar los microorganismos presentes en kombucha, se aislaron los distintos tipos de colonias de cada medio y se identificaron mediante secuenciación de las regiones 16S (bacterias) e ITS (levaduras). Se encontraron 27 especies distintas entre todas las kombuchas analizadas, agrupadas en siete familias (Figura 3 y 4). En bacterias, la familia más diversa fue *Acetobacteraceae*, encontrándose seis especies, y con al menos algún representante en el 70% de las kombuchas. En segundo lugar se ubicó la familia *Lactobacillaceae*, con cinco especies encontradas. Esta familia estuvo presente en el 30% de las muestras. Además, se identificaron las familias *Bacillaceae* y *Leuconostocaceae*.

Por otra parte, las levaduras fueron agrupadas en tres familias. La más numerosa fue *Saccharomycetaceae*, con ocho especies en total. Esta familia se encontró en todas las marcas de kombucha analizadas. Además, se encontraron cuatro especies de la familia *Saccharomycodaceae* que se detectó en el 40% de las kombuchas. La familia de levaduras con menos especies correspondió a *Pichiaceae*, y se encontró en el 30% de las muestras.

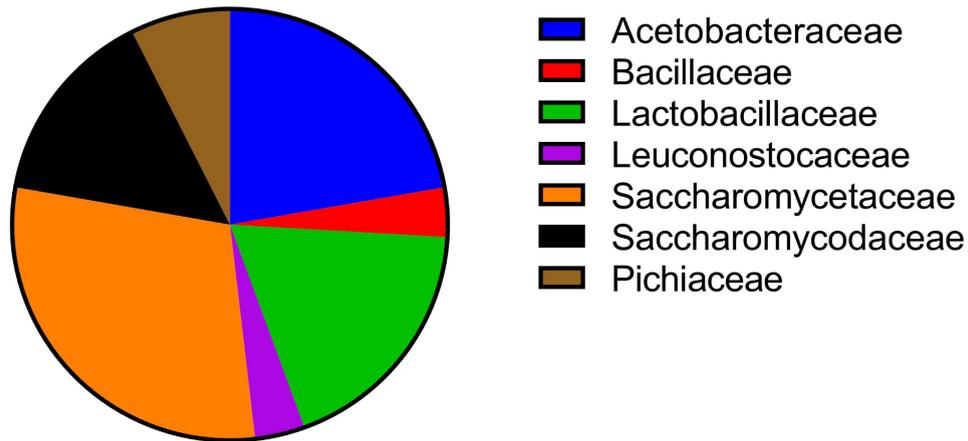


Figura 3. Microorganismos identificados en kombucha agrupados por familia

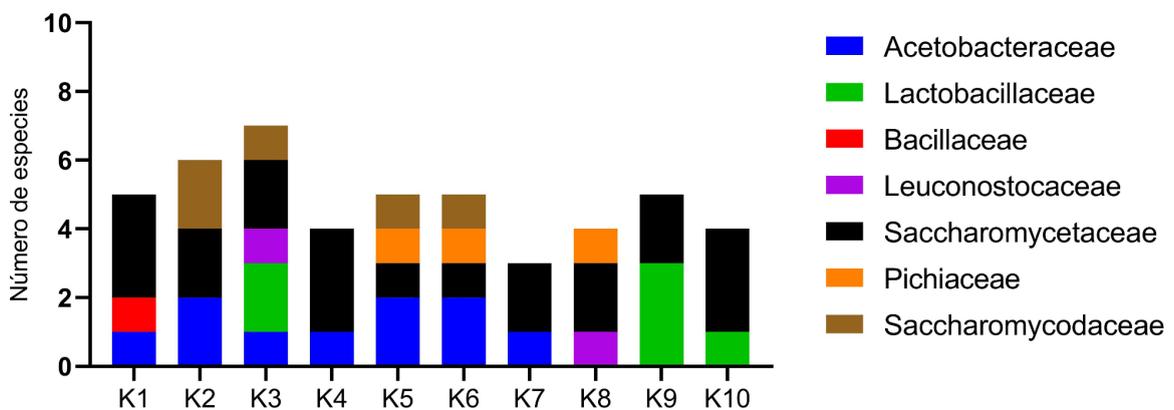


Figura 4. Distribución de familias de microorganismos por kombucha.

En cuanto al análisis por género, se detectaron 15 géneros de bacterias y levaduras en las kombuchas estudiadas (Figura 5). En bacterias, los géneros *Lactobacillus* y *Acetobacter* fueron los más diversos, con cuatro y tres especies encontradas, respectivamente. El género *Acetobacter* fue identificado en el 60% de los productos, mientras que *Lactobacillus* se detectó en el 30% de las kombuchas. Además, se identificó un representante de los géneros *Gluconobacter*, *Komagataeibacter*, *Gluconacetobacter*, *Liquorilactobacillus* y *Oenococcus*.

En cuanto a las levaduras, el género predominante fue *Hanseniaspora*, con cuatro especies. Además, se detectaron dos especies de cada uno de los siguientes géneros: *Lachancea*, *Pichia*, *Saccharomyces* y *Brettanomyces*. Por último, los géneros *Schizosaccharomyces* y *Zygosaccharomyces* estuvieron representados por una única especie cada uno. Por otra parte, el 60% de las kombuchas presentó en su composición microbiológica una especie del género *Saccharomyces*, mientras que el 90% presentó al género *Brettanomyces*, que estuvo ausente únicamente en K5. El género *Pichia* se encontró en el 40% de las kombuchas, mientras que *Hanseniaspora* estuvo presente en el 30% de los productos. Además, el género *Lachancea* fue identificado en el 20% de las kombuchas.

3.2.3. Clasificación de microorganismos a nivel de especie

Las especies de microorganismos identificados se detallan en la Tabla 1. En el caso de las bacterias, la especie más encontrada fue *Acetobacter papayae* (Figura suplementaria 8), presente en el 30% de las kombuchas, seguida de *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus naghensis* (Figura suplementaria 9), *Gluconobacter oxydans* (Figura suplementaria 10) y *Acetobacter tropicalis*, las cuales se detectaron en el 20% de las kombuchas cada una (Figura 6 A).

Por su parte, las levaduras *Brettanomyces anomalus* (Figura suplementaria 3), *Saccharomyces cerevisiae* (Figura suplementaria 5) y *Brettanomyces bruxellensis* (Figura suplementaria 4) fueron identificadas en el 60%, 50% y 40% de las kombuchas, respectivamente, mientras que *Zygosaccharomyces bailii*, *Pichia kudriavzevii* y *Hanseniaspora guillermondii* se detectaron en el 20% de las kombuchas (Figura 6 B).

La cantidad de especies de bacterias y levaduras detectadas por producto fue variable, desde K7 con solo tres especies encontradas, hasta K3 con siete especies (Figura 7).

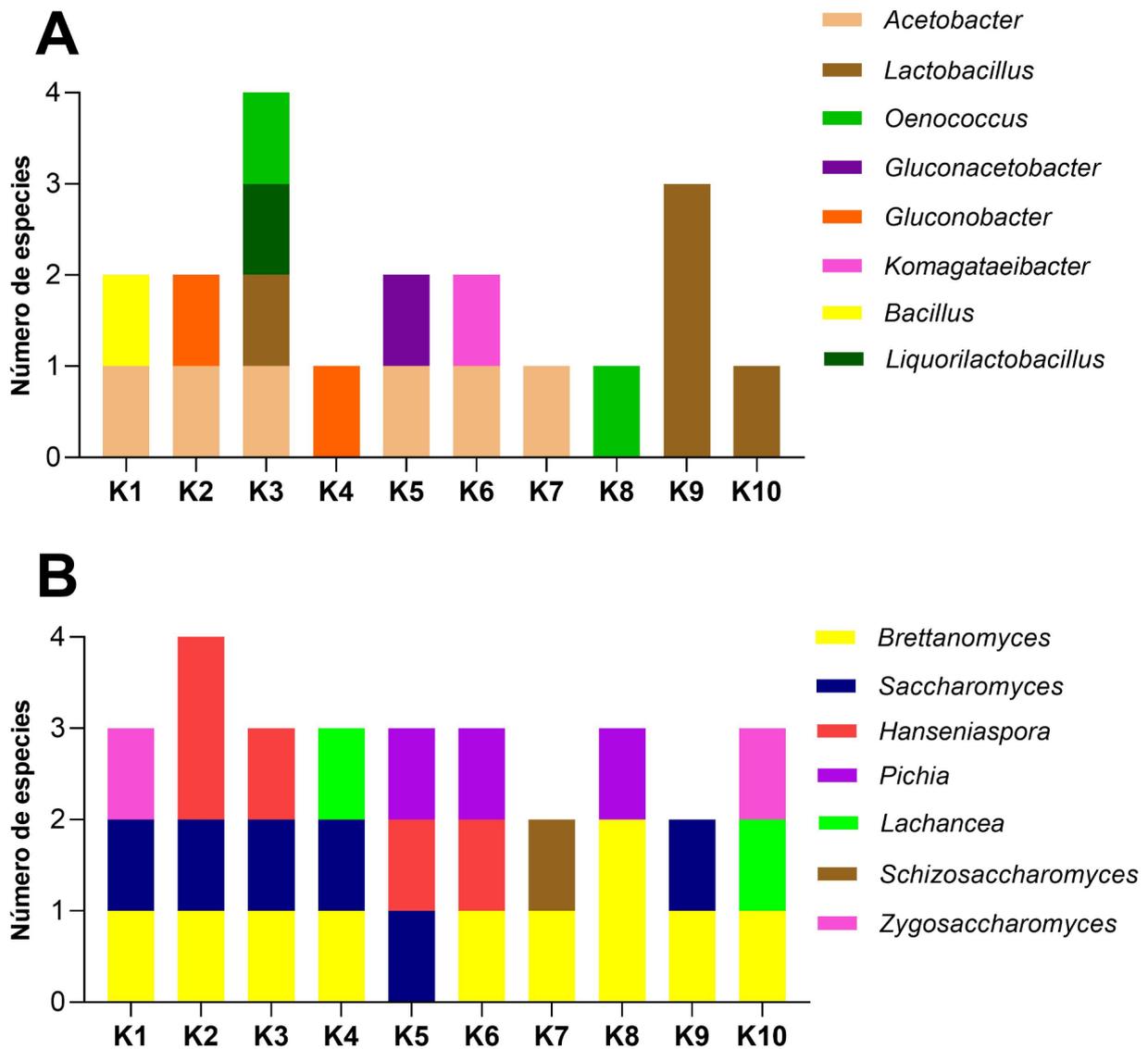


Figura 5. Distribución de géneros de bacterias (A) y levaduras (B) por kombucha.

	Especie	Kombuchas
Bacterias	<i>Acetobacter papayae</i>	K3, K5, K6
	<i>Oenococcus oeni</i>	K3, K8
	<i>Lactobacillus Naghensis</i>	K9, K10
	<i>Gluconobacter oxydans</i>	K2, K4
	<i>Acetobacter tropicalis</i>	K1, K7
	<i>Liquorilactobacillus nageri</i>	K3
	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	K9
	<i>Lactobacillus nagelii</i>	K9
	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	K3
	<i>Komagataeibacter saccharivorans</i>	K6
	<i>Gluconacetobacter liquefaciens o dulcium</i>	K5
	<i>Bacillus megaterium</i>	K1
	<i>Acetobacter ghanensis</i>	K2
Levaduras	<i>Brettanomyces anomalus</i>	K1, K2, K4, K6, K8, K10
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	K1, K2, K4, K5, K9
	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	K3, K7, K8, K9
	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	K1, K10
	<i>Pichia kudriavzevii</i>	K5, K8
	<i>Hanseniaspora guillermondii</i>	K2, K5
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	K7
	<i>Saccharomyces pastorianus o uvarum</i>	K3
	<i>Pichia membranifaciens</i>	K6
	<i>Lachancea fermentati</i>	K4
	<i>Lachancea cidri</i>	K10
	<i>Hanseniaspora vinalis</i>	K6
	<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	K3
<i>Hanseniaspora osmophila</i>	K2	

Tabla 1. Especies de bacterias y levaduras identificadas en kombuchas.

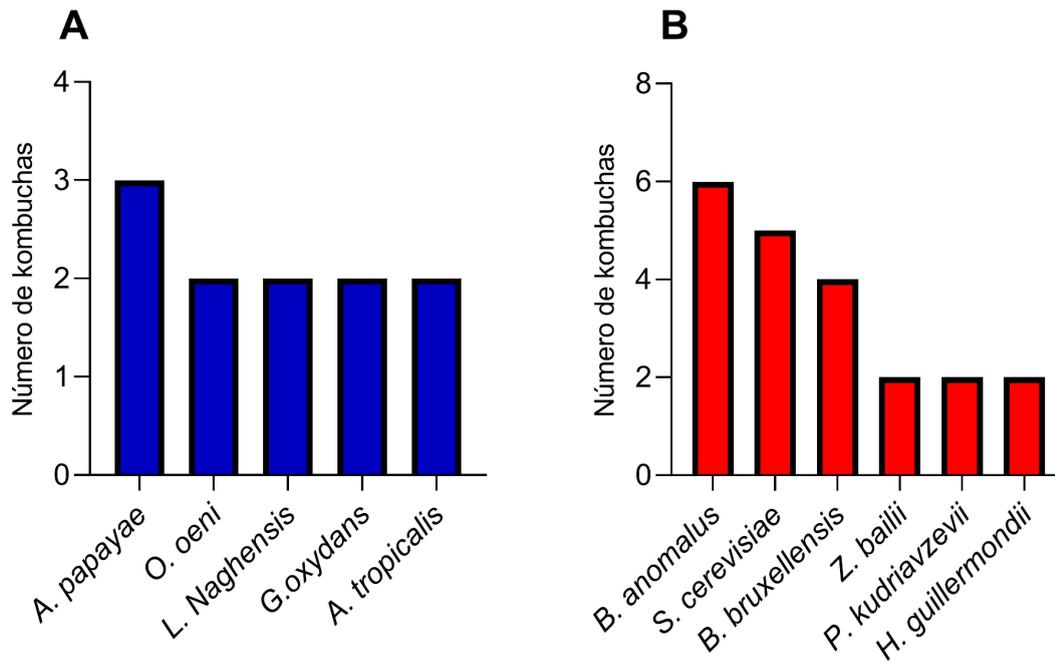


Figura 6. Principales especies aisladas de bacterias (A) y levaduras (B) en kombucha.

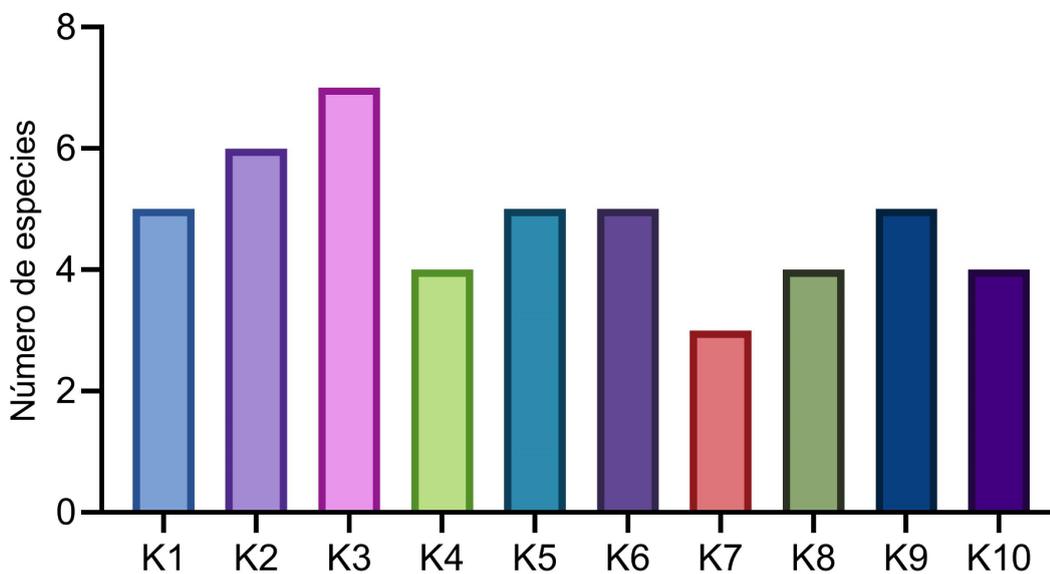


Figura 7. Cantidad de especies identificadas por kombucha.

3.3. Caracterización fisicoquímica

Con el fin de realizar la caracterización fisicoquímica de las kombuchas comerciales argentinas, se midieron el pH, la acidez y los ácidos orgánicos, así como también

las concentraciones de azúcares y etanol en las muestras recibidas. Los resultados de esta sección se resumen en la tabla suplementaria 2.

3.3.1. Azúcares

Se calcularon los niveles de azúcares remanentes de la fermentación sumando las concentraciones de glucosa y fructosa medidas por HPLC. Se encontró gran variabilidad en los niveles de azúcares de las kombuchas estudiadas (Figura 8). En promedio, las kombuchas mostraron una concentración de azúcares remanentes de $3,32 \pm 1,58$ g/100 mL. La marca que menos azúcares presentó fue K8 con 0,06 g/100mL, mientras que la kombucha con mayor concentración de azúcar remanente fue K5 con 5,68 g/100 mL.

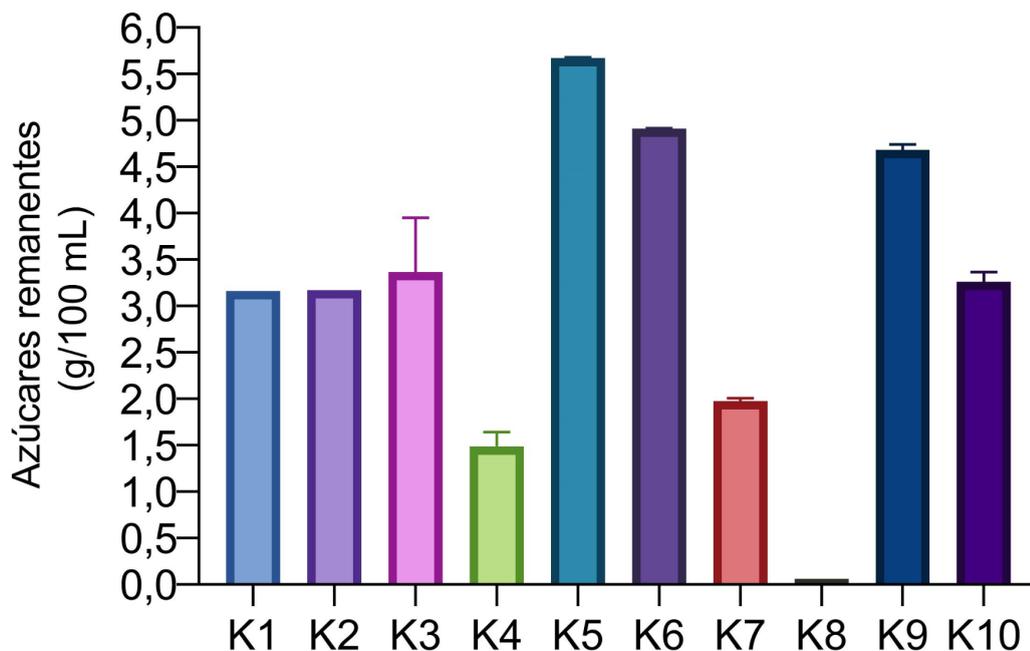


Figura 8. Cuantificación de azúcares remanentes en kombuchas. Se grafica la media \pm desvío estándar de muestras independientes.

3.3.2. Acidez, pH y ácidos orgánicos

A medida que avanza la fermentación, el pH de la kombucha desciende por la síntesis de ácidos orgánicos que liberan protones en solución (Suhre *et al.*, 2021). El

pH de todas las kombuchas analizadas se ubicó por debajo de 4 (Figura 9 A). El valor promedio obtenido fue de $3,41 \pm 0,34$. La marca K5 tuvo el pH más bajo (2,7), mientras que K2 y K4 presentaron los valores más altos (3,79 y 3,76, respectivamente).

La acidez total presentó gran variabilidad (Figura 9 B). En promedio, la acidez de todas las kombuchas fue de $58,28 \pm 29,90$ mEq/L. La kombucha K7 tuvo la mayor acidez con 122,38 mEq/L, mientras que K8 tuvo la menor con 14,2 mEq/L.

El ácido predominante en la mayoría de las kombuchas fue el ácido acético, con un valor promedio de todos los productos de $0,22 \pm 0,15$ g/100 mL (Figura 10 A). Este compuesto fue encontrado en todas las kombuchas y, en general, con concentraciones inferiores a 0,3 g/100 mL, excepto por la kombucha K7 que duplica este valor con 0,60 g/100 mL. Cabe destacar el caso de la kombucha K2, en la que el único ácido encontrado fue el acético y en valores bajos (0,09 g/100 mL). La kombucha K8 tuvo la menor concentración con 0,04 g/100 mL.

En el 70% de las marcas de kombucha analizadas se encontró ácido láctico en concentraciones muy variables, con un promedio de $0,07 \pm 0,06$ g/100 mL (Figura 10 B). Las marcas K3 y K9 registraron los valores más altos de este ácido (0,17 y 0,12 g/100 mL) y en concentraciones muy similares a las de ácido acético encontrado en dichas kombuchas (0,18 y 0,16 g/100 mL). En cambio en las kombuchas K2, K5 y K7 no se detectó ácido láctico.

El ácido glucurónico estuvo presente en el 50% de las muestras analizadas, con niveles máximos en K9 (0,13 g/100 mL), K5 (0,11 g/100 mL) y K7 (0,10 g/100 mL) (Figura 10 C). La concentración media de ácido glucurónico en las kombuchas que lo presentaron fue más alta que la concentración media de ácido láctico ($0,09 \pm 0,04$ g/100 mL), pero fue detectado en menor cantidad de muestras.

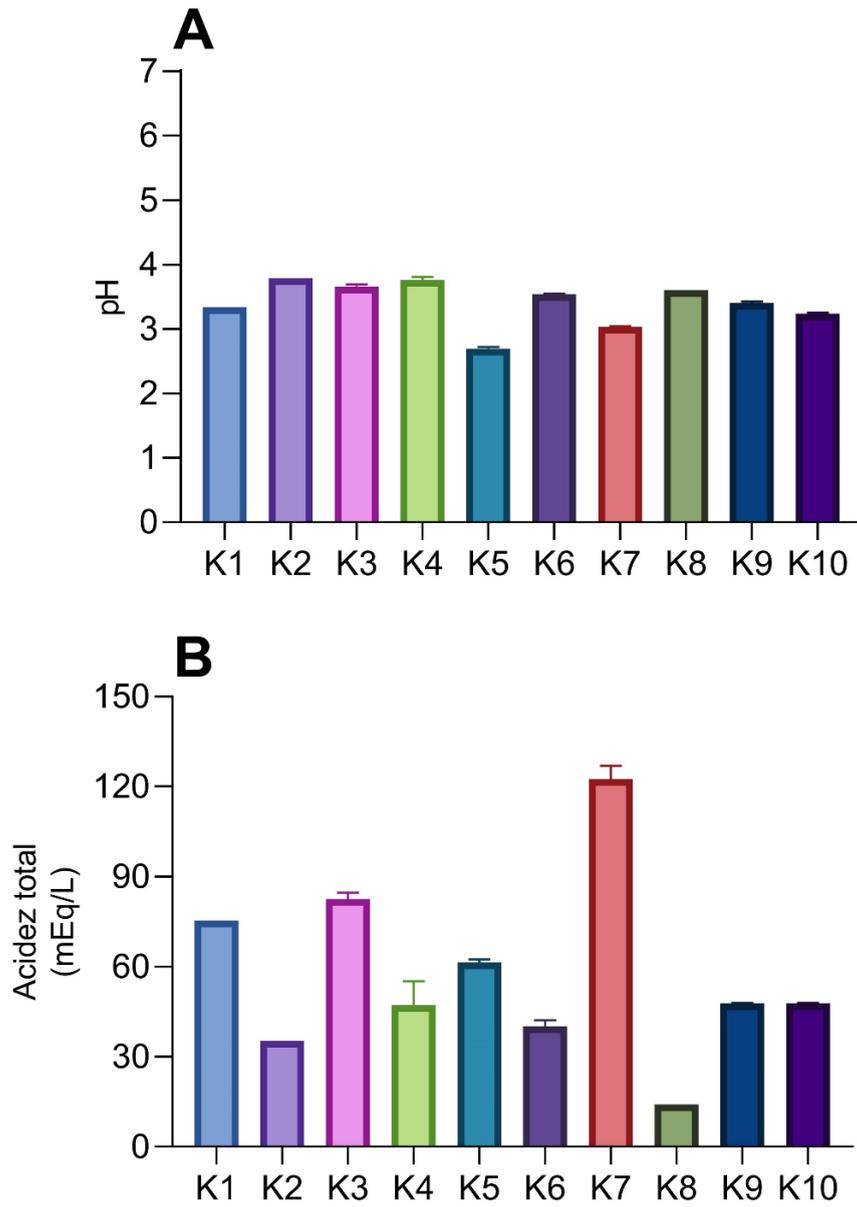


Figura 9. Valores de pH (A) y acidez total titulable (B) en kombuchas. Se grafica la media \pm desvío estándar de muestras independientes.

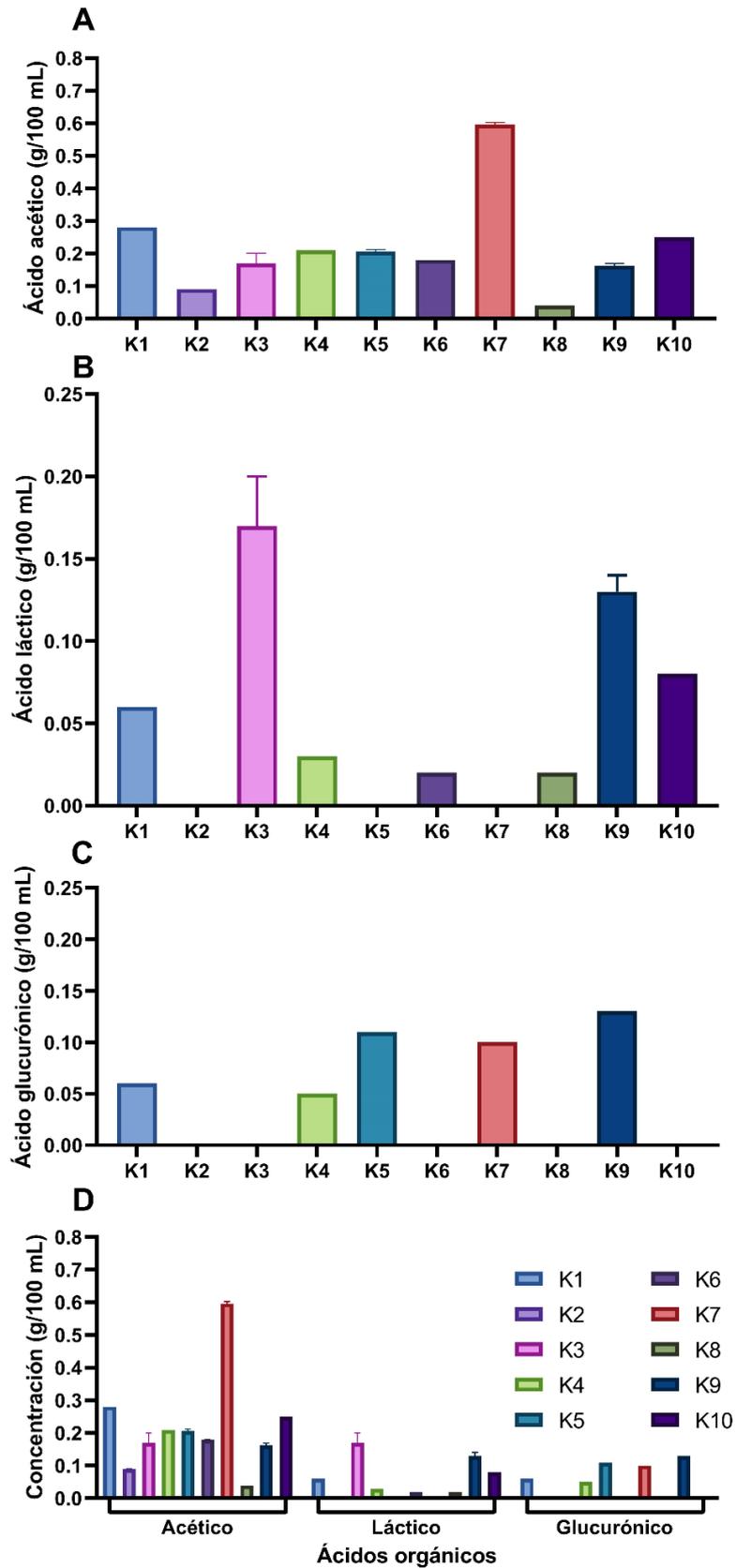


Figura 10. Cuantificación de ácidos orgánicos en kombuchas: ácido acético (A), ácido láctico (B), ácido glucurónico (C) y todos los ácidos (D). Se grafica la media \pm desvío estándar de muestras independientes.

3.3.3. Etanol

El etanol presente en la kombucha es producido por levaduras a partir de la fermentación de glucosa o fructosa (Jayabalan, 2014). Para este trabajo, se utilizaron dos métodos diferentes de cuantificación de etanol, el alcoholímetro y la cromatografía líquida. El alcoholímetro Alex 500 posee varios modos de medición de alcohol, pero ninguno para kombucha, por lo que se utilizaron los modos para sidra y cerveza. Estas mediciones se compararon con las concentraciones de etanol determinadas por HPLC con el fin de definir cuál de los dos modos era el más apropiado para su uso en estas bebidas.

Los resultados muestran que las mediciones de etanol con alcoholímetro en modo “cerveza” y por HPLC presentaron diferencias significativas (p-valor: 0,005). En cambio, cuando se compararon las mediciones del alcoholímetro en modo “sidra” con las de HPLC, no hubo diferencias significativas (p-valor: 0,20) (Tabla suplementaria 3). Por lo tanto, el modo “sidra” sería el más apropiado para las mediciones de etanol en kombucha.

Según el CAA, la kombucha es una bebida analcohólica, por lo que la concentración máxima permitida para este compuesto es de 0,5% v/v. La concentración promedio de etanol de todas las kombuchas medida por HPLC fue de $1,44 \pm 0,76$ g/100 mL (1,44% v/v) (Figura 11). La kombucha K10 presentó la mayor concentración con 2,35% v/v, aunque cerca se encontraron K8 y K2 (2,28% v/v y 2,19% v/v, respectivamente). Las menores concentraciones de etanol se hallaron en K5 y K6 con 0,33% v/v y 0,42% v/v, respectivamente. Cabe destacar que solo estas dos últimas marcas de kombucha tuvieron niveles de etanol por debajo de 0,5% v/v.

3.3.4. Análisis multivariado y agrupación de kombuchas

Con el objetivo de agrupar las kombuchas comerciales estudiadas relacionando las variables químicas más importantes, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP).

La primera componente explicó el 41,4% de la variabilidad y separó a las kombuchas fundamentalmente entre aquellas con mayor concentración de etanol, de productos con mayor cantidad de azúcares remanentes. La segunda, explicó el 28,7% de la varianza y discriminó entre kombuchas con mayor cantidad de ácido acético y glucurónico, de otras con mayores concentraciones de ácido láctico

(Figura suplementaria 14). Se graficó un biplot en función de los componentes descritos (Figura 12). En base a estos análisis, se realizó una agrupación jerárquica en cluster de las marcas de kombucha (Figura 13), formándose cinco grupos.

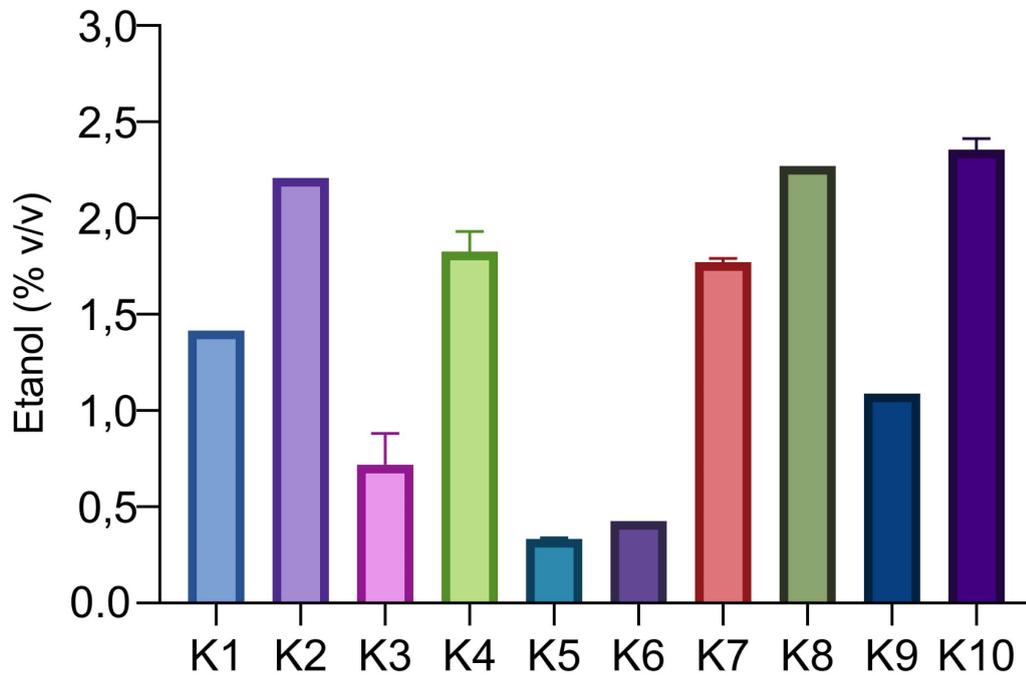


Figura 11. Cuantificación de etanol en kombuchas medidas por HPLC. Se grafica la media \pm desvío estándar de muestras independientes.

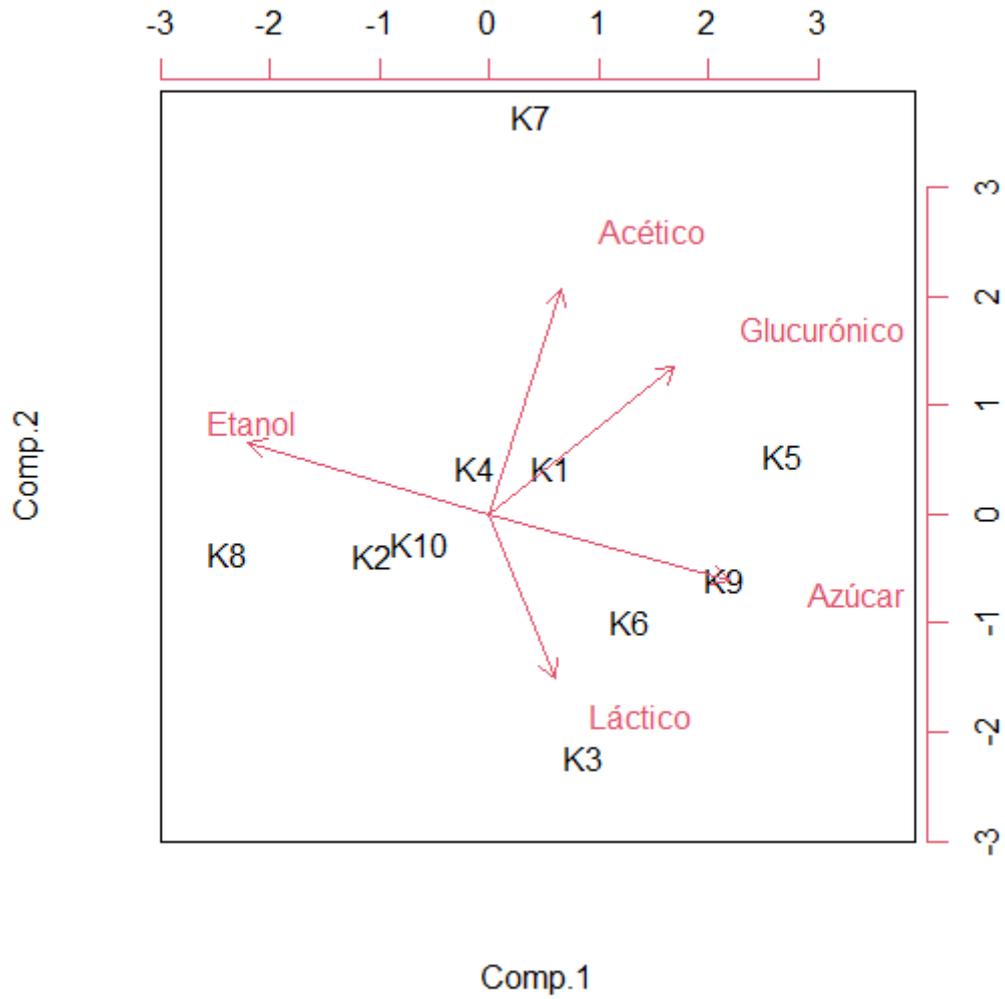


Figura 12. Biplot basado en ACP con variables fisicoquímicas de kombuchas.

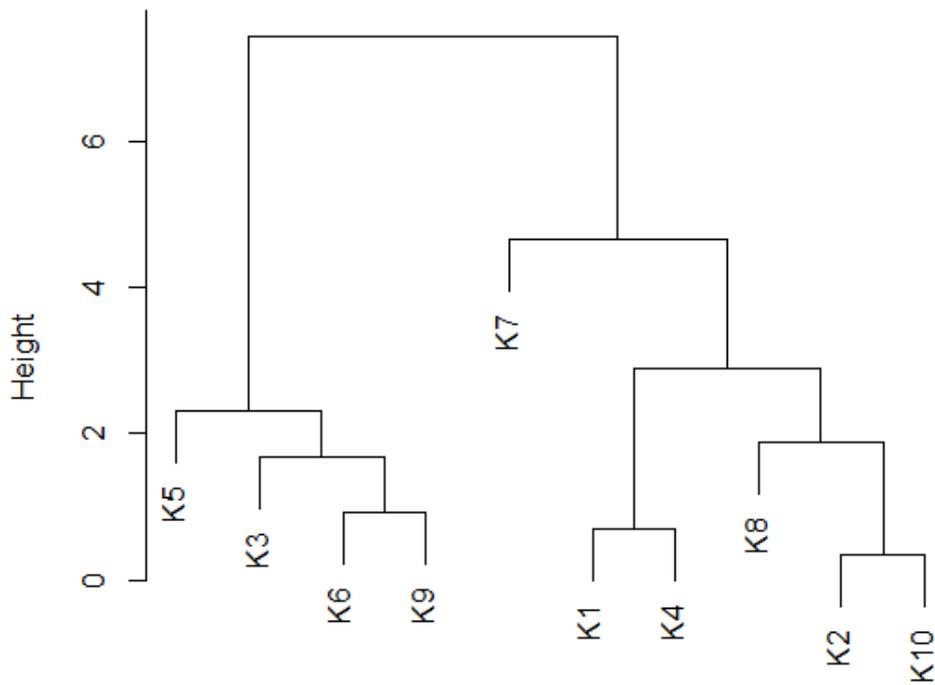


Figura 13. Dendrograma derivado del análisis de cluster de kombuchas.

El primer grupo comprendió a la kombucha K5. Esta muestra presentó la menor concentración de etanol. Además, tuvo una concentración de ácido acético de 0,231 g/100 mL, cercana al promedio general. A su vez presentó una alta concentración de ácido glucurónico y azúcares remanentes. No se detectaron niveles de ácido láctico.

Las kombuchas K3, K6 y K9 conformaron el segundo grupo, que tuvo concentraciones de ácido láctico y glucurónico muy variables (promedio de las 3 kombuchas: $0,10 \pm 0,08$ g/100 mL y $0,04 \pm 0,08$ g/100 mL, respectivamente). A su vez, promedió una concentración de 0,17 \pm 0,01 g/100 mL de ácido acético, por debajo del promedio general. Además, este grupo presentó la segunda mayor concentración de azúcares remanentes y la segunda menor concentración promedio de etanol. En el dendograma, K3 se observa separada del grupo ya que presenta una mayor concentración de ácido láctico y menor concentración de azúcares remanentes.

El tercer grupo estuvo compuesto por la kombucha K7 que presentó la mayor concentración de ácido acético y, al igual que en el primer grupo, no se detectó ácido láctico. Este grupo tuvo la segunda mayor concentración de ácido glucurónico, la segunda menor concentración de azúcares remanentes y una concentración intermedia de etanol.

El cuarto grupo correspondió a las kombuchas K1 y K4. Presentó una concentración media de ácido acético, láctico y glucurónico de $0,24 \pm 0,05$ g/100 mL, $0,04 \pm 0,02$ g/100 mL y $0,05 \pm 0,01$ g/100 mL, respectivamente. La concentración promedio de azúcares remanentes fue de 3,05 g/100 mL, y tuvo en promedio $1,60 \pm 0,3$ % v/v de etanol. Todos estos valores se encontraron cercanos a la media de cada compuesto.

El último grupo estuvo conformado por las kombuchas K2, K8 y K10. Se caracterizó fundamentalmente por tener las kombuchas con mayor cantidad de etanol ($2,27 \pm 0,08$ % v/v) y no presentar niveles de ácido glucurónico. A su vez tuvo concentraciones variables de ácido acético, láctico y azúcares remanentes ($0,12 \pm 0,10$ g/100 mL, $0,03 \pm 0,04$ g/100 mL y $2,16 \pm 1,82$ g/100 mL). En el dendograma, K8 se observa separada ya que presenta menor concentración de ácido acético y azúcares remanentes respecto al promedio del grupo.

3.4. Caracterización sensorial

3.4.1. Descripción general

Las kombuchas fueron analizadas de acuerdo a una serie de descriptores sensoriales, según lo sugerido por KBI. En la evaluación sensorial, predominaron los aromas afrutados y especiados y, en menor medida, los aromas herbal y acético, siendo este último característico de la kombucha. También se detectó el aroma floral. El aroma a alcohol, ácido láctico y “terroso” prácticamente no fueron identificados (Figura 14).

En cuanto al sabor, las kombuchas fueron descritas como dulces, carbonatadas, ácidas, especiadas y afrutadas. También se apreció cierta astringencia y en menor medida, amargor, mientras que el alcohol no fue percibido (Figura 15).

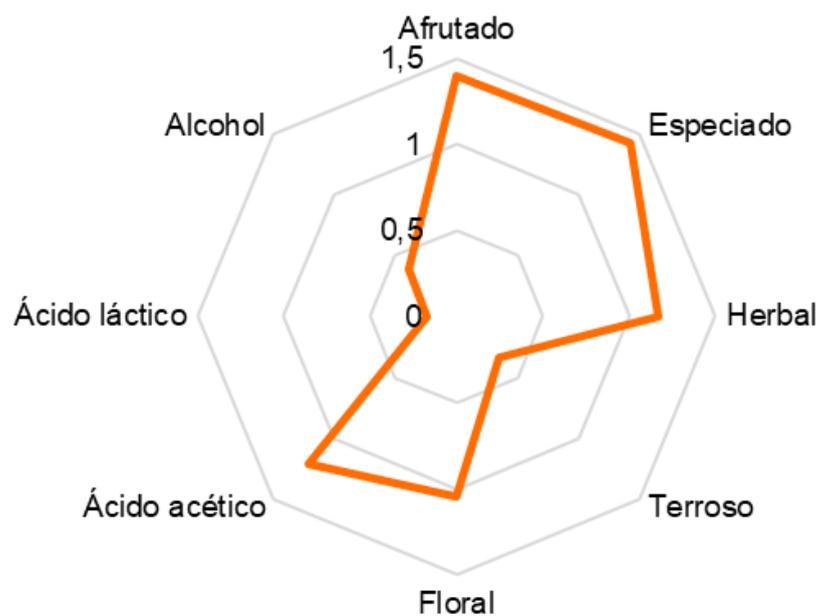


Figura 14. Descriptores aromáticos detectados en kombuchas

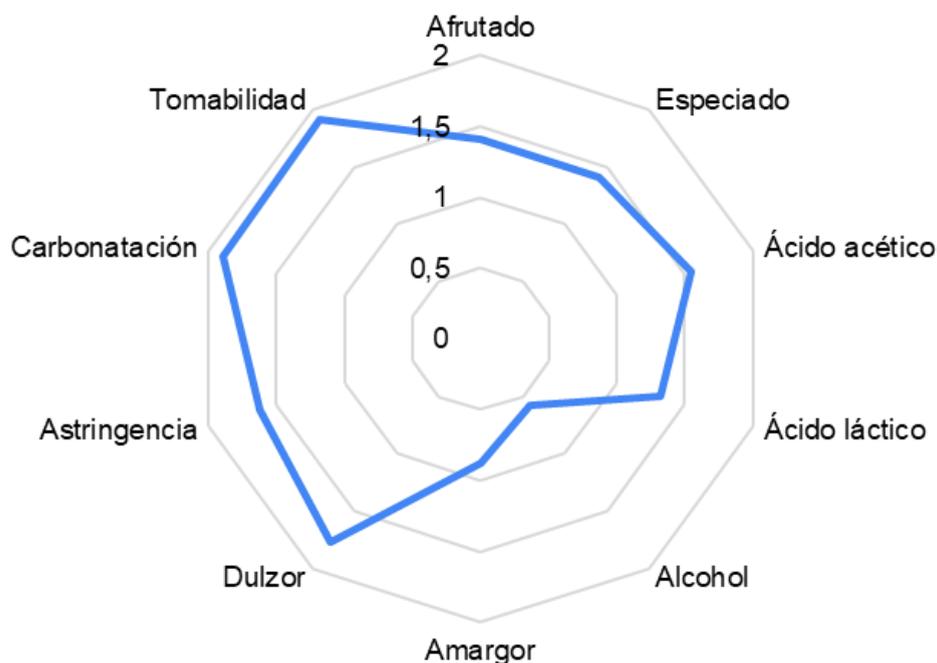


Figura 15. Descriptores de sabor y sensaciones en boca detectados en kombuchas.

3.4.2. Aromas, sabores y sensaciones en boca

El aspecto sensorial de la kombucha se asocia generalmente al dulzor, con sabores y aromas afrutados, especiados, ácidos, entre otros (Tran *et al.*, 2020a; Bishop *et al.*, 2022a). Con el fin de caracterizar sensorialmente a las kombuchas comerciales y agrupar variables, se realizaron ACP con sus respectivos biplots para las variables de aroma, sabor y sensaciones en boca (Figura 16).

Para el aspecto de aromas, el primer componente explicó el 54,6% de la varianza total, separando a las kombuchas de aroma más ácido de aquellas con aromas más afrutados, florales y especiados. El segundo componente discriminó a las kombuchas entre aquellas de aromas herbales y especiados, de las afrutadas y florales. Ambos componentes permitieron explicar el 79,5% de la varianza total (Figura suplementaria 15).

Como puede observarse en la figura 16, la kombucha K7 fue percibida con un aroma avinagrado, dado por el ácido acético. Las muestras K3, K4 y K8 también fueron detectadas como ácidas y avinagradas, aunque en menor medida. En los demás productos no se detectó el aroma ácido, aunque K2 y K6 fueron detectados como más herbales y especiados, mientras que K5 y K10 más florales y afrutados. En cambio, las kombuchas K1 y K9 no se destacaron por ningún descriptor aromático en particular, ya que fueron evaluadas con puntuaciones promedio.

En el caso de las variables de sabor y sensaciones en boca, el componente principal discriminó a las kombuchas de acuerdo a su tomabilidad. Esta variable se encontró asociada positivamente a la percepción de afrutado y dulce, y negativamente a la percepción de amargor, astringencia y alcohol. La segunda componente dividió a las muestras principalmente por su sabor a ácido acético y láctico. Ambas componentes permitieron explicar el 78,3% de la varianza total (Figura suplementaria 16).

En función del biplot asociado (Figura 17), las kombuchas K4, K5, K6 y K9 tuvieron un sabor afrutado, dulce, con una alta tomabilidad y leve carbonatación. La kombucha K1 también fue percibida de esta forma, aunque predominó la sensación en boca de su carbonatación. Las muestras K3 y K7 fueron percibidas con un sabor ácido, tanto acético como láctico y, en menor medida, a alcohol. En cambio, K2 presentó una fuerte astringencia, sabor a alcohol y amargo. De K8 también se tuvo una percepción similar, con la diferencia de que en esta última no se detectó acidez. En la kombucha K10 no predominó ningún sabor en particular.

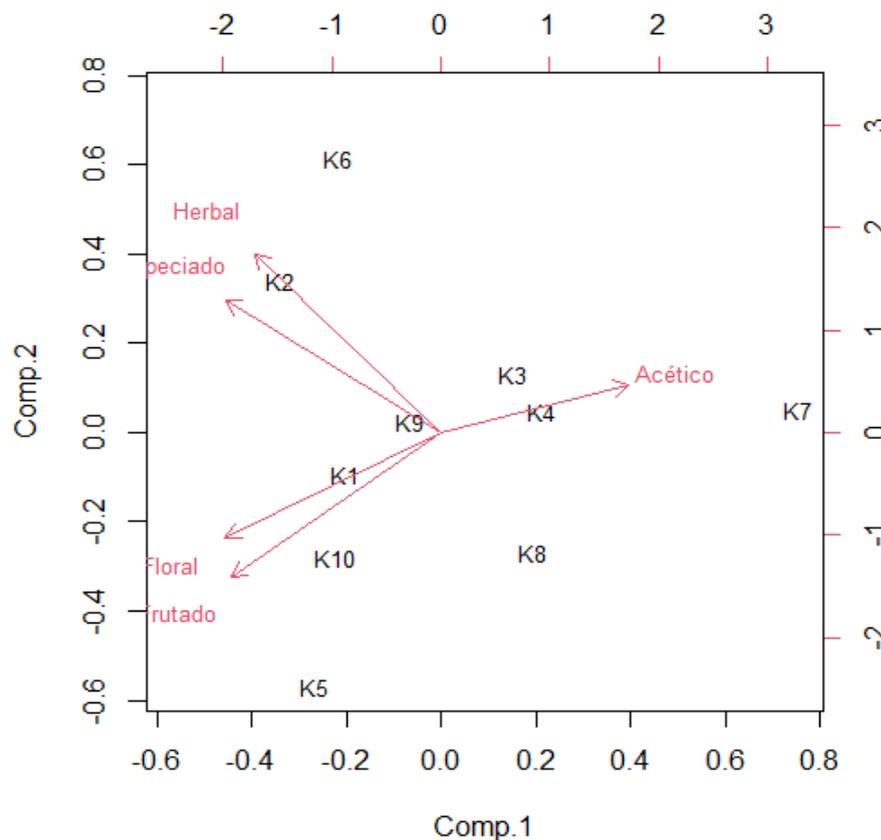


Figura 16. Biplot de perfiles aromáticos de kombuchas.

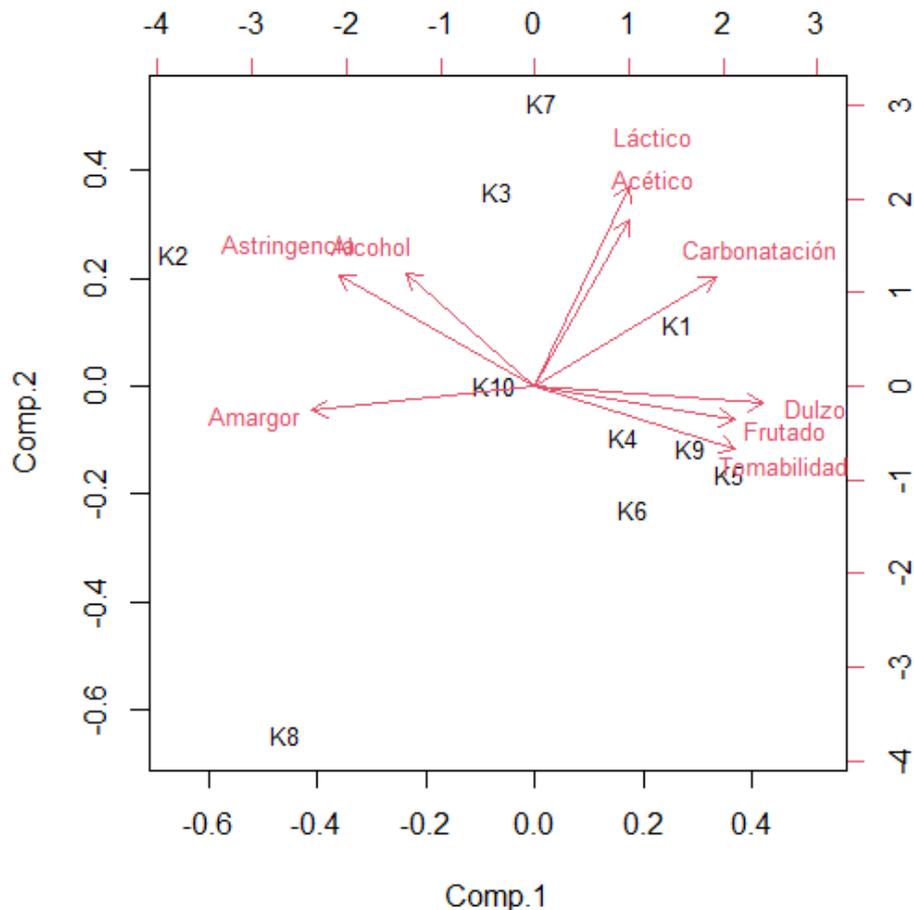


Figura 17. Biplot de descriptores de sabor y sensaciones en boca de kombuchas.

3.4.3. Deméritos

Las kombuchas pueden tener aromas y sabores indeseables, como el de los sulfuros (huevo podrido), acetato de etilo (solvente o acetona), ácido butírico (vómito de bebé o lácteo) y oxidado (trapo mojado o cartón) (KBI). Se realizó un ACP para caracterizar a las kombuchas comerciales de acuerdo a las variables de sabor.

El primer componente permitió diferenciar a las kombuchas con alta tomabilidad, de aquellas que presentaron sabor a oxidado y lácteo. El segundo componente separó a las kombuchas con sabor a sulfuro de aquellas con sabor a solvente. Ambas componentes permitieron explicar el 86,5% de la varianza total (Figura suplementaria 17).

A partir del biplot obtenido (Figura 18), se observa que en los productos K4 y K7 predominó el gusto a sulfuros. En la kombucha K8 se percibieron prácticamente todos los deméritos estudiados. En las kombuchas K2 y K3 se detectó el sabor a solvente, y en menor medida a lácteo y oxidado. Las muestras K6 y K10

presentaron una tomabilidad aceptable, aunque con sabor a solvente. En cambio, en las kombuchas K1, K5 y K9 no se percibieron sabores considerados deméritos, y presentaron una alta tomabilidad.

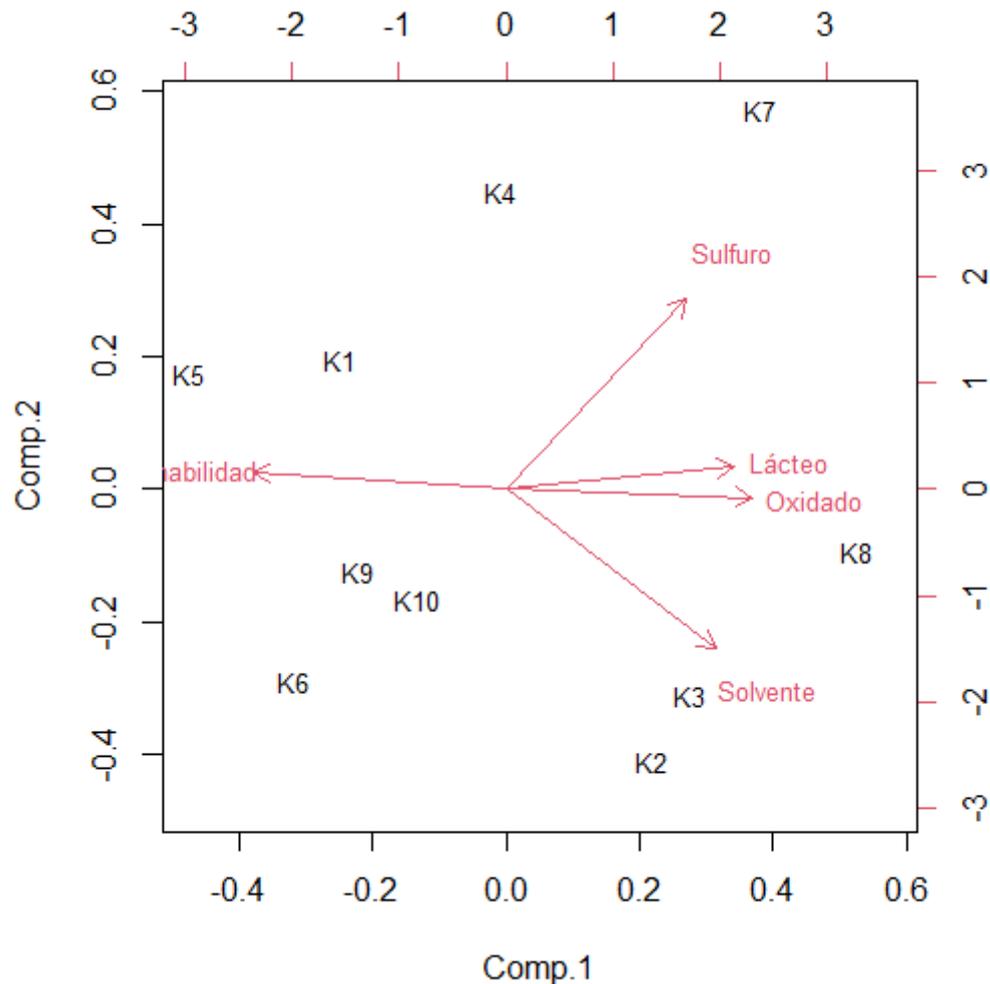


Figura 18. Biplot de descriptores de deméritos de sabor y tomabilidad de kombuchas.

3.4.4. Relación entre características fisicoquímicas y sensoriales

Si bien sustancias como el etanol, ácidos orgánicos y azúcares remanentes suelen ser detectadas por los panelistas, pueden encontrarse asociadas a otros descriptores o bien no ser percibidas en función de sus concentraciones y contexto fisicoquímico (Bishop *et al.*, 2022a). Con el fin de relacionar las características fisicoquímicas de las kombuchas analizadas y las características sensoriales percibidas por los panelistas, se realizó un ACP con descriptores normalmente asociados a un compuesto, y sus respectivas cantidades encontradas en el análisis

químico. Este análisis alcanzó a explicar el 74% de la variabilidad total (Figura suplementaria 18), y separó a las kombuchas dulces de aquellas astringentes, amargas y con sabor a alcohol. A su vez, distinguió a las kombuchas que presentaban mayor acidez.

En base al biplot asociado, la concentración de ácido acético y el sabor avinagrado se encontraron relacionadas, indicando que el ácido acético presente en las muestras fue detectado por los panelistas. El sabor dulce también se detectó y estuvo relacionado con la cantidad de azúcares remanentes. En el caso del alcohol, hubo una leve correlación entre el sabor y su concentración, mientras que su presencia fue relacionada a la astringencia y amargor de la bebida (Figura 19).

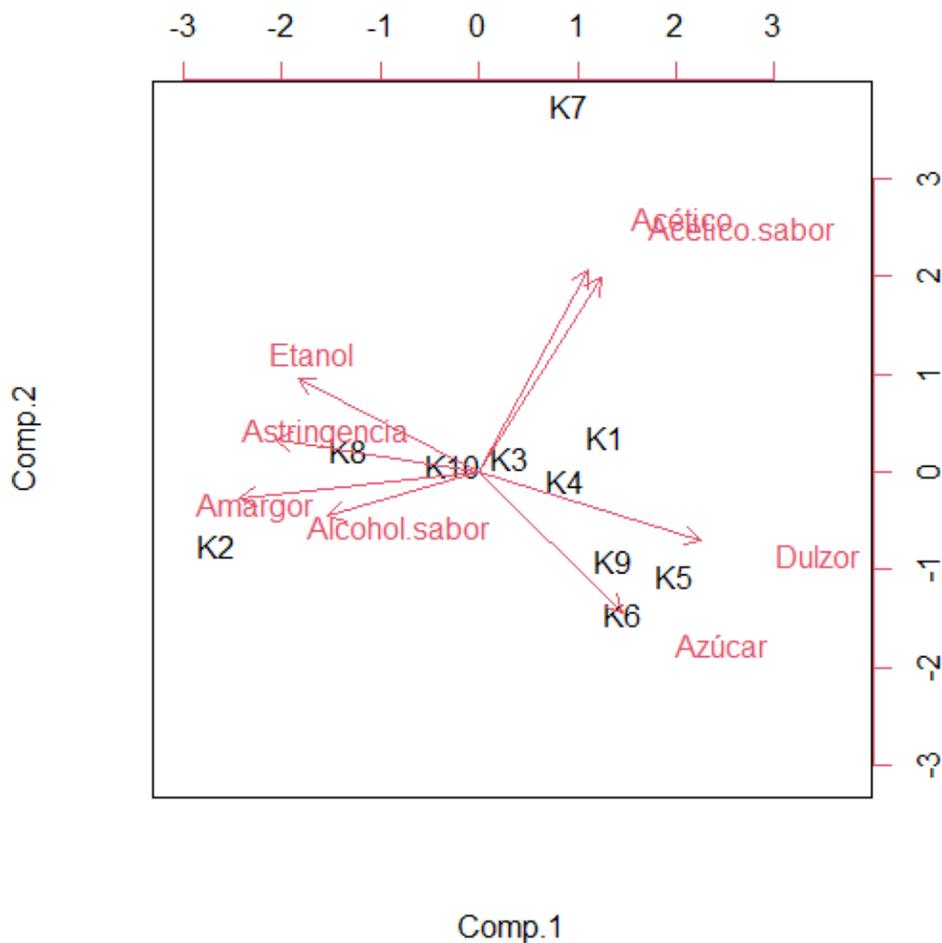


Figura 19. Biplot de detección de descriptores sensoriales asociados a los componentes químicos de las kombuchas.

4. Discusión

La kombucha es una bebida fermentada cuyo consumo y producción industrial se encuentra en pleno crecimiento (Kim y Adhikari, 2020; Kitwetchaoren *et al.*, 2023). En este trabajo se estudiaron las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales de diez kombuchas comerciales argentinas, siendo el primer estudio de estas bebidas en nuestro país, y uno de los pocos a nivel internacional (Suhre *et al.*, 2021; Andreson *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2022). En base a los resultados obtenidos, se pudo determinar una gran heterogeneidad en las kombuchas estudiadas, tanto en los aspectos microbiológicos y fisicoquímicos como en los sensoriales.

En cuanto al análisis microbiológico de las kombuchas estudiadas, el recuento de microorganismos fue variable, en un rango de diferencia de 2 órdenes de magnitud (10^5 hasta 10^7 UFC/mL). En otros trabajos, se han determinado recuentos de entre 10^4 y 10^8 UFC/mL (Jarrell *et al.*, 2000; Bishop (a) *et al.*, 2022), valores que incluyen a los encontrados en el presente estudio. La variabilidad presentada en el recuento de microorganismos podría deberse a que cada productor utiliza inóculos de diferentes fuentes y en diferentes cantidades, y también a diferencias en el proceso de producción y al uso de filtros luego de la fermentación.

Los géneros de bacterias *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* y *Lactobacillus* y los de levaduras *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Brettanomyces* y *Schizosaccharomyces* encontrados en kombuchas argentinas se encuentran en el listado de géneros enumerados en el CAA. Los géneros de bacterias *Bacillus*, *Komagataeibacter* y *Liquorilactobacillus*, y los de levaduras *Hanseniaspora* y *Lachancea* no se encuentran descritos en el CAA, aunque han sido frecuentemente encontrados en kombuchas y también fueron encontrados en este trabajo (Reva *et al.*, 2015; Suhre *et al.*, 2021; Andreson *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2022).

La composición bacteriana en las kombuchas argentinas estuvo dominada fundamentalmente por BAA y BAL. Todos los géneros encontrados en este estudio ya han sido reportados en kombucha. En otros trabajos se han descrito otros géneros como *Paenibacillus* sp, *Pseudomonas* sp, *Zymomonas* sp, *Leustonoc* sp, *Propionibacterium* sp y hasta coliformes fecales (Jayabalan, 2014; Dutta y Paul, 2019; Kaashyap *et al.*, 2021; Suhre *et al.*, 2021; Andreson *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2022; Bishop *et al.*, 2022a). En este trabajo, la cantidad máxima encontrada de familias de bacterias por kombucha ha sido de tres, mientras que en ciertos estudios por metagenómica han encontrado desde solo una familia hasta una veintena por

kombucha (Gaggia *et al.* 2018). La mayoría de los trabajos realizados en kombucha han considerado a las BAA como el grupo dominante dentro de las bacterias (Kim y Adhikari, 2020; Tran *et al.*, 2022a; Bishop *et al.*, 2022b). En este trabajo, a pesar de que las BAA fueron las más frecuentes en las muestras de kombucha, éstas no fueron detectadas en todos los productos estudiados. Su ausencia pudo deberse a que el método de cultivo y aislamiento no fue lo suficientemente sensible como para detectarlas. Esto puede atribuirse a la dificultad de cultivo de las BAA, ya que son microorganismos nutricionalmente demandantes y presentan dificultades de adaptación desde un alimento fermentado a un medio de cultivo artificial (Mamlouk y Gullo, 2013; Gomes *et al.*, 2018; Lynch *et al.*, 2019; Bishop *et al.*, 2022a). Para la identificación de todas las especies presentes en kombuchas argentinas podría aplicarse un método independiente de cultivo pero más sensible, como el análisis por metagenómica. Sin embargo, Andreson *et al.* (2022), y Yang *et al.* (2022) estudiaron las comunidades microbiológicas de kombuchas comerciales con dicho método, y en algunas de ellas no se detectaron BAA. En todas las kombuchas donde no se encontraron BAA, tanto las de este trabajo como las de los citados previamente, las comunidades bacterianas estuvieron dominadas por BAL.

Las levaduras son parte fundamental del acervo microbiológico de las kombuchas. Son las encargadas de descomponer el azúcar agregado al comienzo de la fermentación en glucosa y fructosa, así como también producir etanol, dióxido de carbono y algunos compuestos aromáticos (Jayabalan, 2014; Villarreal-Soto *et al.*, 2018; Kim y Adhikari, 2020; Ferremi leali *et al.*, 2022; Rocha Guzmán *et al.*, 2023). Los géneros de levaduras encontradas en las kombuchas estudiadas fueron variables; mientras que algunos como *Schizosaccharomyces* o *Zygosaccharomyces* se encontraron en una o dos kombuchas, los géneros *Saccharomyces* y *Brettanomyces* se encontraron en la mayoría de los productos. Otros trabajos también han reportado la dominancia de algún género específico de levaduras como *Brettanomyces* (Reva *et al.*, 2015; Andreson *et al.*, 2022; Landis *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2022), *Pichia* o *Saccharomyces* (Gaggia *et al.*, 2018). A su vez, la cantidad de especies de levaduras encontradas por kombucha ha sido de dos a tres. Esta diversidad se corresponde con la misma observada por Andreson *et al.* (2022), estudio que se realizó por metagenómica. Todas las especies de levaduras descritas en este trabajo ya han sido reportadas en otros trabajos (Jayabalan, 2014; Kaashyap *et al.*, 2021). Respecto al perfil sensorial de la kombucha, Tran *et al.*

(2022b) y Bishop *et al.* (2022a) demostraron que los géneros *Pichia* y *Hanseniaspora* aportan un perfil aromático más complejo a la bebida. También se ha descrito que algunas especies son capaces de producir ciertos ácidos orgánicos, como ácido acético.

En cuanto a sus características fisicoquímicas las kombuchas se destacan por su bajo pH y concentraciones variables de ácidos orgánicos, etanol y azúcares remanentes (Miranda *et al.*, 2022). La principal fuente de energía para sostener el metabolismo del consorcio microbiano de la kombucha proviene del azúcar que se agrega al momento de preparar el té. Si bien se han estudiado alternativas, como el uso de melazas (Angela *et al.*, 2020), lo más usual es utilizar el azúcar común (sacarosa). A partir de la escisión del disacárido se obtiene glucosa y fructosa, sustratos para la formación de los compuestos orgánicos producidos por los microorganismos. El azúcar residual presente en una kombucha comercial es aquel que no fue utilizado durante la fermentación, o que fue agregado en el momento de saborizar la bebida y depende de gran cantidad de factores, como la concentración de azúcar inicial, el tiempo y temperatura de fermentación y el consorcio microbiano (Dutta y Paul, 2019; Bishop *et al.*, 2022b). Las kombuchas analizadas en este trabajo han mostrado una gran variación en la concentración de azúcares remanentes (0,06 - 5,68 g/100 mL), lo que coincide con otros trabajos. Kim y Adhikari (2020) recopilaron las concentraciones de azúcares de kombuchas de diferentes productores comerciales de Estados Unidos, encontrando valores entre 0,85 y 5,75 g/100 mL, similares a los reportados en kombuchas estonas por Andreson *et al.* (2022). Por otra parte, Gaggia *et al.* (2018) estudiaron kombuchas preparadas con té negro y verde, y diferentes tiempos de fermentación, reportando entre 4,6 y 5,2 g/100 mL de azúcares remanentes.

En Argentina, recientemente se ha promulgado la Ley de Promoción de la Alimentación Saludable (también conocida como “Ley de Etiquetado Frontal”). El objetivo es concientizar a la población respecto a los alimentos que poseen elevadas concentraciones de nutrientes críticos. Las bebidas analcohólicas deben llevar la etiqueta de “exceso en azúcar” cuando el 20% o más de sus calorías provengan de los azúcares añadidos y éstos sean mayores a 0,5 g/100 mL. En las bebidas fermentadas, el azúcar residual representa el 100% de las calorías, por lo tanto, el límite de azúcar en estas bebidas para evitar el etiquetado frontal es de 0,5 g/100 mL. En las kombuchas analizadas, una única muestra estuvo por debajo de

este umbral. La kombucha busca instalarse en la sociedad como un producto saludable, sin embargo, según la actual ley de etiquetado frontal, el 90% de las kombuchas estudiadas debería tener colocado un octógono negro indicando “exceso en azúcares”. Esto se contradice con uno de los primeros ensayos clínicos realizados con kombucha, en el que se ha probado que el consumo de kombucha disminuye los niveles de azúcar e insulina en sangre, aún cuando se consumen kombuchas azucaradas. Los mecanismos aún no están claros, aunque se cree que este efecto podría estar relacionado a las altas concentraciones de ácidos orgánicos, polifenoles y taninos presentes en la bebida (Atkinson *et al.*, 2023). Además, teniendo en cuenta que las bebidas gaseosas presentan niveles de azúcares que duplican a los máximos encontrados en las kombuchas argentinas, estos productos serían una elección más saludable, comparados con las gaseosas industriales.

El pH de la kombucha disminuye a medida que se desarrolla la fermentación, debido a la producción de ácidos orgánicos, que se disocian en solución acuosa liberando protones (Amarasinghe *et al.*, 2018). En el análisis de kombuchas argentinas, el pH osciló entre 2,7 y 3,8, coincidiendo con lo reportado en otros trabajos, que informaron un rango de pH de 2,8-3,7; 2.9-3.4 y 3-3,2, en kombuchas comerciales estonas, brasileñas y estadounidenses, respectivamente (Andreson *et al.*, 2022; Suhre *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2022). Según el CAA, el pH debe encontrarse entre 2,5 y 4,2, por lo que la totalidad de las kombuchas estudiadas en este trabajo cumplieron con este requisito. Por otra parte, la acidez total de las kombuchas argentinas se encontró dentro de los rangos reportados por otros trabajos (Suhre *et al.*, 2021; Andreson *et al.*, 2022).

El ácido acético es el compuesto más importante en la kombucha, ya que es el que brinda su característico aroma y sabor avinagrado (Bishop *et al.*, 2022a). Este ácido es producido a partir de etanol por bacterias de los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* y *Komagataeibacter* en condiciones de aerobiosis (Villarreal-Soto *et al.*, 2018). Debido a que el ácido acético es el ácido mayoritario en la kombucha, compone la mayor parte de la acidez, lo que fue observado en este estudio como una correlación positiva entre la acidez total y la concentración de ácido acético. En trabajos anteriores se han reportado valores de ácido acético que oscilan entre 0,05 y 0,35 g/100 mL (Cardoso *et al.*, 2020; Malbasa *et al.*, 2008; Gaggia *et al.* 2018; Neffe-Skocinska *et al.*, 2017; Ivanisova *et al.*, 2019).

La concentración media de ácido acético en las kombuchas analizadas en este trabajo fue variable. Esta variabilidad también es reportada por Andreson *et al.* (2022) en diferentes kombuchas comerciales de Estonia, detectando valores que oscilaron entre 0,03 y 0,64 g/100 mL. Sin embargo, otros trabajos han analizado kombuchas con concentraciones más elevadas: Chakravorty *et al.* (2016) describen una kombucha con una concentración de ácido acético de 1,6 g/100 mL, tras 21 días de fermentación, mientras que Villarreal-Soto *et al.* (2018) reportaron valores promedio de 1,1 g/100 mL tras 30 días de fermentación. Estas altas concentraciones podrían deberse al extenso período de fermentación (Ivanisova *et al.*, 2019). Sin embargo, ciertos análisis en kombucha reportan una concentración de 0,81 g/100 mL en muestras con apenas 7 días de fermentación (Velicánsky *et al.*, 2014). Según los datos declarados por los productores argentinos, los tiempos de fermentación estuvieron entre los 6 y 29 días. Estos tiempos no estuvieron relacionados con las cantidades de ácido acético encontradas, ya que la kombucha que presentó la mayor concentración de ácido acético se fermentó durante 21 días, sin embargo las kombuchas de mayor y menor tiempo de fermentación, presentaron valores de ácido acético cercanos al promedio. Por lo tanto, la concentración de ácido acético no dependería solo del tiempo de fermentación. El ácido acético se detectó en todas las muestras, aún cuando no se encontraron BAA en todos los productos analizados. Esto puede deberse a la baja sensibilidad de detección de BAA por cultivo (Mamlouk y Gullo, 2013; Gomes *et al.*, 2018), o también a que este ácido haya sido producido por otros microorganismos que sí se encontraron en estas kombuchas, como *Brettanomyces* spp. o *Lachancea cidri*. Estas levaduras son capaces de producir ácido acético a partir de glucosa en condiciones de aerobiosis (Smith y Van Grinsven, 1984; Gerós *et al.*, 2000; Castro-Martínez *et al.*, 2004; Villarreal *et al.*, 2022).

El ácido láctico es producido normalmente por BAL a partir de la glucosa. Suele encontrarse en menor proporción al ácido acético y a veces no se detecta o está ausente. En este trabajo fue encontrado en el 70% de los productos analizados con valores similares a los reportados por Ismaiel *et al.* (2016) (0,07 g/100 mL). Además, hubo ausencia de ácido láctico en algunas kombuchas, lo que coincide con lo reportado en otros trabajos (Gramza-Michalowska *et al.*, 2016; Tran *et al.*, 2020b; Andreson, 2022). En este trabajo, las BAL correspondieron principalmente a los géneros *Lactobacillus* y *Liquorilactobacillus*. El ácido láctico fue detectado en todos

los productos que presentaban BAL. Sin embargo, en algunas kombuchas que contenían ácido láctico en bajas concentraciones, no se detectaron BAL, lo que podría deberse a que las BAL estuvieran en cantidades menores a la sensibilidad del método utilizado para detectarlas o a que el ácido láctico fuera producido por otros microorganismos. Por ejemplo, en K4, si bien no se encontraron BAL, se detectó a *Lachancea fermentati*, una levadura productora de ácido láctico (Bellut *et al.* 2020). El caso de K8, kombucha que también presentó ácido láctico, resulta interesante debido a que la única BAL encontrada fue *Oenococcus oeni*, bacteria que produce ácido láctico a partir de ácido málico (Lorentzen *et al.*, 2019; Suhre *et al.*, 2021) y que está adaptada a altas concentraciones de etanol (Lorentzen *et al.*, 2019), lo cual es concordante con los niveles de alcohol detectados en la muestra. Esta bacteria también fue encontrada en otras kombuchas (Coton *et al.*, 2017; Suhre *et al.*, 2021).

El ácido glucurónico es considerado el compuesto saludable más importante de la kombucha (Villarreal-Soto *et al.*, 2018). Este ácido actúa capturando toxinas presentes en el organismo, haciéndolas hidrosolubles y permitiendo su eliminación por orina (Martínez Leal *et al.*, 2020). En kombuchas, el ácido glucurónico se forma a partir del ácido glucónico, el cual a su vez es producido a partir de glucosa. Ambas conversiones están catalizadas por enzimas presentes en BAA (Martínez Leal *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2022). Se ha reportado gran variabilidad en la concentración de ácido glucurónico en kombuchas. Neffe-Skocinska *et al.* (2017) determinaron el contenido de este ácido, obteniendo concentraciones de entre 0,004 y 0,006 g/100 mL, mucho menores a las detectadas en este trabajo. Por otra parte, Jayabalan (2007) analizó kombuchas con 0,170 g/100 mL, valores similares a los estudiados por Ismaiel *et al.* (2016), con 0,186 g/100 mL y cercanos a los valores máximos de las kombuchas argentinas. Según Lynch *et al.* (2019), la tasa de síntesis de ácido glucónico, precursor del ácido glucurónico, depende de la especie y cepa, siendo los géneros *Gluconobacter* y *Gluconacetobacter* los que producirían mayores cantidades de ácido glucónico (y consecuentemente, ácido glucurónico). Estos géneros fueron encontrados en tres kombuchas, dos de las cuales presentaron dicho compuesto.

El etanol es uno de los compuestos producidos por levaduras y actúa como sustrato para la síntesis de ácido acético por parte de las BAA. En la producción de kombucha, al final de la fermentación se busca la menor concentración posible de

etanol, ya que es considerada una bebida analcohólica. En este trabajo, se midió el contenido de etanol por métodos distintos, siendo el HPLC la forma más precisa de medirlo. Además, se determinó que podría utilizarse el alcoholímetro en modo “sidra” para la medición de etanol en kombuchas, un método mucho más veloz, económico y que no requiere de personal especializado para su uso. Las concentraciones de etanol medidas en kombuchas en otros estudios varían notablemente, desde 0% hasta 2,75% v/v (Miranda *et al.* 2022; Andreson *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2022; Gaggia *et al.*, 2018; Villarreal-Soto *et al.*, 2018; Neffe-Skocinska *et al.*, 2017). En concordancia con estos valores, las kombuchas analizadas en este trabajo presentaron niveles de alcohol muy variables, desde 0,33 hasta 2,37% v/v. Los resultados indican que solo el 20% de las kombuchas estudiadas cumplen con lo estipulado por el CAA al tener menos de 0,5% v/v de etanol. Los niveles de etanol permitidos en bebidas analcohólicas varían notablemente entre países. Si bien en Argentina y EE.UU. el límite es de 0,5% v/v, algunas regiones de Europa disponen un límite de 1,2% v/v. Incluso, en Colombia el límite máximo permitido para bebidas analcohólicas es de 2,5% v/v (KBI). Para evitar altas concentraciones de etanol en las kombuchas, algunos productores suelen diluir o pasteurizar sus productos (Dutta y Paul, 2019). Se han desarrollado patentes para evitar los altos niveles de etanol (Kim y Adhikari, 2020; Tull, 2020). La concentración de etanol principalmente varía en función del tiempo de fermentación, la oxigenación y el consorcio microbiano (Dutta y Paul, 2019; Amarasinghe *et al.*, 2018). Si bien la producción de etanol está dada casi exclusivamente por levaduras, es responsabilidad de las bacterias transformarlo en ácido acético. Este proceso a su vez es dependiente de la concentración de oxígeno durante la fermentación, ya que las BAA transforman el etanol en ácido acético en presencia de oxígeno. El contacto con el oxígeno puede darse por aireación artificial durante el proceso o por contacto a través de la superficie del fermentador que varía según su geometría y superficie expuesta: a este parámetro se lo llama superficie interfacial específica (Tran *et al.*, 2022b). Para añadir más complejidad, no todas las levaduras ven limitada su capacidad de producir etanol en condiciones de aerobiosis. En ciertas levaduras, como las del género *Brettanomyces*, se da el llamado efecto Custer, en el que las tasas de fermentación alcohólica son más altas en aerobiosis que en ausencia de oxígeno (Custers, 1940; Castro Martínez *et al.* 2004; Steensels *et al.* 2015). Incluso, para algunos géneros como *Saccharomyces* puede darse el efecto

Crabtree, en el cual altas concentraciones de azúcares provocan que las levaduras opten por la fermentación en lugar de la respiración en presencia de oxígeno (Pfeiffer y Morley, 2014). En base a todos estos factores, es esperable que la concentración de alcohol sea difícil de controlar en el proceso de producción de kombucha.

Además de la mejora en la preservación, nutrición y funcionalidad a través de la fermentación, los alimentos fermentados poseen aromas, sabores y texturas únicos (Hutkins, 2019). La kombucha, en este sentido, no es una excepción. En aspectos generales ha sido descrita como similar a la sidra, aunque también con un sabor fuerte y único (Bishop *et al.*, 2022a; Tran *et al.*, 2020b). En lo que respecta al aroma, las kombuchas analizadas en este trabajo se percibieron afrutadas, especiadas, con aroma avinagrado, y en menor medida, con aroma herbal. En los pocos trabajos en los que se describen las características sensoriales de las kombuchas generalmente predominaron los aromas asidrados, afrutados y avinagrados (Tran *et al.*, 2020b; Bishop *et al.*, 2022b). Según Tran *et al.* (2022a) *B. bruxellensis* y *A. indonesiensis* en conjunto representarían el consorcio mínimo para producir una bebida con las características sensoriales de la kombucha. El aroma asidrado está dado por la actividad de levaduras, especialmente por las del género *Brettanomyces* (Steensels *et al.*, 2015; Ferremi leali *et al.*, 2022), mientras que el avinagrado se asocia al ácido acético producido por BAA. El aroma herbal se encuentra relacionado a los compuestos propios del té como el linalool. Según los autores citados, estos se perderían durante la fermentación, por lo que no deberían percibirse en kombucha. Sin embargo, Tran *et al.* (2020b) aclaran que el perfil aromático de las kombuchas es un campo que se encuentra escasamente estudiado, por lo que cualquier afirmación al respecto se encuentra poco respaldada.

En lo que respecta al sabor y sensaciones en boca, las kombuchas analizadas en este trabajo se han percibido como dulces, carbonatadas, levemente ácidas, astringentes y afrutadas. Además, han obtenido un alto valor de tomabilidad. Todo esto se condice con lo reportado por Ivanisova *et al.* (2019), que describieron a las kombuchas como agridulces, avinagradas, con regusto afrutado, y agradables de beber. En base a la bibliografía disponible, solo Andreson *et al.* (2022) han descrito kombuchas comerciales sensorialmente. Los autores pudieron clasificar a un conjunto de kombuchas de acuerdo a su sabor dulce y afrutado, y a otro grupo con sabor a té o herbal. Las kombuchas analizadas en este trabajo se han podido

clasificar de la misma manera, aunque por medio de su descripción aromática. Además, se han podido diferenciar de acuerdo a su aroma ácido. En cuanto a la capacidad de percepción de los compuestos, el estudio de Andreson *et al.* (2022) presentó una buena correlación entre el gusto ácido y dulzor y sus respectivos valores obtenidos en laboratorio. Por otra parte en este trabajo, no solo el sabor a ácido acético y dulzor fueron bien percibidos, si no que además el etanol fue asociado al amargor y astringencia. Según Bishop *et al.* (2022a) esto es esperable, ya que la kombucha suele tener concentraciones de etanol inferiores al umbral de detección, por lo que se asocia su presencia al amargor.

En cuanto a los deméritos, se cree que la síntesis de estos compuestos estaría asociada a determinadas especies de microorganismos, así como las relaciones entre ellas (Tran *et al.*, 2022a). Si bien Andreson *et al.* (2022) identifican gustos desagradables asociados a la presencia de *Pseudomonas* sp., no existen trabajos que analicen la presencia de deméritos en kombuchas comerciales. En este trabajo, se han detectado sulfuros, acetato de etilo, ácido butírico y óxidos, afectando negativamente a la tomabilidad de las kombuchas cuando estuvieron presentes.

El análisis de componentes principales con variables fisicoquímicas permitió separar a las kombuchas de acuerdo a sus concentraciones de ácidos orgánicos, azúcares remanentes y etanol. Se pudieron distinguir principalmente a las kombuchas con alto contenido de etanol, respecto de aquellas ricas en azúcares remanentes, lo que podría asociarse a kombuchas con mayor actividad de levaduras respecto a las de menor actividad microbiana, respectivamente. Esto podría deberse a muchos factores que influyen en el proceso de producción, como los distintos niveles de oxigenación, la proporción de levaduras con respecto a BAA, la concentración de azúcares iniciales, tiempos y temperaturas de fermentación, entre otros. En segundo lugar, se pudo discriminar a las kombuchas con altos niveles de ácido acético y ácido glucurónico, producidos por BAA, y por otro lado, a las kombuchas con altos niveles de ácido láctico, producido por BAL.

En cuanto al análisis de agrupación jerárquica, el primer grupo estuvo formado por una única kombucha, que presentó los niveles más altos de azúcares remanentes y los menores niveles de etanol. Según datos suministrados por los productores fue la única de fermentación corta (6 días), lo que podría explicar dichos valores. Además, tuvo una de las mayores concentraciones de ácido glucurónico, lo que concuerda con la presencia de *Gluconacetobacter liquefaciens* o *dulcium* (Lynch *et al.*, 2019).

Por otra parte, fue la única kombucha en la que no se encontró al género *Brettanomyces*. Estas levaduras tienen la peculiaridad de producir ácido acético y de tener su metabolismo más activo en presencia de oxígeno (Custers, 1940; Steensels *et al.*, 2015). Además, en condiciones de aerobiosis son capaces de producir una familia de compuestos químicos que le brindan a los fermentos un sabor rancio (en inglés: *mousy off-flavour*) (Snowdon *et al.*, 2006). La ausencia de esta levadura se corresponde con el aspecto sensorial de la K5, ya que fue la kombucha que presentó la menor cantidad de deméritos y mayor tomabilidad. Sensorialmente también pudo estar favorecida por sus bajos niveles de etanol y altas concentraciones de azúcares. En resumen, esta kombucha se percibió dulce, afrutada, tuvo una alta tomabilidad, baja detección de deméritos y elevadas concentraciones de ácido glucurónico, considerado muy saludable (Martínez Leal *et al.*, 2020).

El segundo grupo presentó una gran variabilidad en las concentraciones de ácido láctico y glucurónico. Las muestras K6 y K9 fueron percibidas como dulces y afrutadas y presentaron una alta tomabilidad. La kombucha K3 fue detectada principalmente como ácida debido a sus altas concentraciones de ácido láctico. Si bien K3 y K9 tienen concentraciones similares de este ácido, es posible que una mayor concentración de azúcares en K9 haya enmascarado la acidez. La baja concentración de azúcar, sumada al sabor a solvente, explicaría la menor tomabilidad de K3 en este grupo.

El tercer grupo se conformó por una única kombucha (K7) que presentó la mayor concentración de ácido acético. En esta kombucha (y en K1, con la segunda mayor concentración de ácido acético) se identificó una especie de BAA (*A. tropicalis*), que estaría asociada a una alta producción de ácido acético (Lynch *et al.*, 2019). La alta concentración de este ácido fue detectada en el estudio sensorial tanto en sabor como en aroma.

El cuarto grupo estuvo conformado por kombuchas con valores fisicoquímicos promedio. Sensorialmente, tanto en aromas, como sabores y deméritos, tuvo percepciones cercanas a la media.

El último grupo estuvo conformado por las tres kombuchas más alcohólicas. Además, estas kombuchas no presentaron ácido glucurónico. En función de lo declarado por los productores, estas kombuchas se fermentaron en tanques cerrados, o con una abertura pequeña, lo que explicaría los altos niveles de etanol.

Sensorialmente estas kombuchas tuvieron una baja tomabilidad, probablemente debido a los altos niveles de alcohol y a que dos de ellas presentaron gran cantidad de deméritos, lo que podría asociarse a problemas en el proceso de fermentación o contaminaciones.

Es de destacar que las kombuchas con mayor tomabilidad tuvieron las mayores concentraciones de azúcares remanentes, concentraciones de ácido acético moderadas, y la menor cantidad de deméritos y alcohol. En Argentina, el mercado de bebidas analcohólicas se encuentra dominado por bebidas muy azucaradas, por lo que es de esperar que el azúcar sea percibido como positivo por algunos consumidores. Sin embargo, otros grupos de consumidores buscan bebidas bajas en azúcares priorizando la salud. Por lo tanto, la variabilidad de las kombuchas argentinas en cuanto a su dulzor y acidez abarcaría a un amplio espectro de consumidores.

5. Conclusiones

En conclusión, se puede destacar la gran heterogeneidad hallada en las kombuchas comerciales argentinas, tanto en su composición microbiológica como en sus características fisicoquímicas y sensoriales. Se identificaron diversos géneros de levaduras y bacterias ya reportados en otros trabajos. El ácido acético fue el ácido predominante, contribuyendo al característico aroma y sabor avinagrado de la kombucha, aunque también se detectaron niveles variables de ácido láctico y glucurónico. Los valores de pH se encontraron dentro de los límites establecidos por el CAA, sin embargo, en la mayoría de los casos se superó el límite de etanol permitido y las concentraciones de azúcar fueron mayores al límite establecido por la Ley de Etiquetado Frontal, planteando importantes desafíos para los productores. La tomabilidad de la kombucha fue asociada al dulzor y sabores afrutados, mientras que se relacionó negativamente con la astringencia, amargor, alcohol y deméritos. Este trabajo constituye el primer estudio de kombuchas comerciales de Argentina y uno de los pocos a nivel internacional contribuyendo al análisis de calidad y a la vinculación con los productores de nuestro país. Además, gracias a este trabajo, se ha conformado el primer banco de microorganismos aislados de kombucha. Este estudio destaca la diversidad microbiológica, fisicoquímica y sensorial presente en estos productos. Se espera que estos hallazgos sean de utilidad tanto para los productores de kombucha como para los consumidores interesados en esta cada vez más popular bebida fermentada.

6. Referencias

- Amarasinghe, H., Weerakkody, N. S., & Waisundara, V. Y. (2018). Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha “Tea Fungus” during extended periods of fermentation. *Food science & nutrition*, 6(3), 659-665.
- American Society of Brewing Chemists. (2009). *ASBC methods of analysis*. American Society of Brewing Chemists.
- Andreson, M., Kazantseva, J., Kuldjärv, R., Malv, E., Vaikma, H., Kaleda, A., ... & Vilu, R. (2022). Characterisation of chemical, microbial and sensory profiles of commercial kombuchas. *International Journal of Food Microbiology*, 373, 109715.
- Angela, C., Young, J., Kordayanti, S., & Devanthi, P. V. P. (2020). Isolation and screening of microbial isolates from kombucha culture for bacterial cellulose production in sugarcane molasses medium. *KnE Life Sciences*.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389-3402.
- Atkinson, F. S., Cohen, M., Lau, K., & Brand-Miller, J. C. (2023). Glycemic index and insulin index after a standard carbohydrate meal consumed with live kombucha: A randomised, placebo-controlled, crossover trial. *Frontiers in Nutrition*, 10.
- Beena Divya, J., Kulangara Varsha, K., Madhavan Nampoothiri, K., Ismail, B., & Pandey, A. (2012). Probiotic fermented foods for health benefits. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), 377-390.
- Bellut, K., Krogerus, K., & Arendt, E. K. (2020). *Lachancea fermentati* strains isolated from kombucha: fundamental insights, and practical application in low alcohol beer brewing. *Frontiers in Microbiology*, 11, 764.
- Bishop, P., Pitts, E. R., Budner, D., & Thompson-Witrick, K. A. (2022a). Kombucha: Biochemical and microbiological impacts on the chemical and flavor profile. *Food Chemistry Advances*, 100025.
- Bishop, P., Pitts, E. R., Budner, D., & Thompson-Witrick, K. A. (2022b). Chemical composition of kombucha. *Beverages*, 8(3), 45.
- Campbell-Platt, G. (1994). Fermented foods—a world perspective. *Food research international*, 27(3), 253-257.
- Capítulo XIII “BEBIDAS FERMENTADAS”. Artículo 1084 bis. Código Alimentario Argentino (2022).
- Cardoso, R. R., Neto, R. O., dos Santos D'Almeida, C. T., do Nascimento, T. P., Pressete, C. G., Azevedo, L., ... & de Barros, F. A. R. (2020). Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food research international*, 128, 108782.

- Castro-Martínez, C., Escudero-Abarca, B. I., Gomez Rodriguez, J., Hayward-Jones, P. M., & Aguilar-Uscanga, M. G. (2005). Effect of physical factors on acetic acid production in *Brettanomyces* strains. *Journal of food process engineering*, 28(2), 133-143.
- Chaves-López, C., Serio, A., Grande-Tovar, C. D., Cuervo-Mulet, R., Delgado-Ospina, J., & Paparella, A. (2014). Traditional fermented foods and beverages from a microbiological and nutritional perspective: the Colombian heritage. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 1031-1048.
- Coelho, R. M. D., de Almeida, A. L., do Amaral, R. Q. G., da Mota, R. N., & de Sousa, P. H. M. (2020). Kombucha. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 22, 100272.
- Cotón, M., Pawtowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloume-Labarthe, L., ... & Cotón, E. (2017). Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS microbiology ecology*, 93(5).
- Custers, M. T. J. (1940). Onderzoekingen over het gistgeslacht *Brettanomyces*. <http://resolver.tudelft.nl/uuid:cf291eee-a075-4f95-b0fe-a38c63329a4d>
- Deb, S., & Jolvis Pou, K. R. (2016). A review of withering in the processing of black tea. *Journal of Biosystems Engineering*, 41(4), 365-372.
- Dufresne, C., & Farnworth, E. (2000). Tea, Kombucha, and health: a review. *Food research international*, 33(6), 409-421.
- Dutta, H., & Paul, S. K. (2019). Kombucha drink: Production, quality, and safety aspects. En *Production and management of beverages* (pp. 259-288). Woodhead Publishing.
- Ferrari A, Vinderola G, Weill R. (2020). Alimentos fermentados: microbiología, nutrición, salud y cultura. 1a ed . Ciudad Autónoma de Buenos Aires : Instituto Danone del Cono Sur
- Ferremi Leali, N., Binati, R. L., Martelli, F., Gatto, V., Luzzini, G., Salini, A., ... & Salvetti, E. (2022). Reconstruction of Simplified Microbial Consortia to Modulate Sensory Quality of Kombucha Tea. *Foods*, 11(19), 3045-1.
- Gerós, H., Azevedo, M. M., & Cássio, F. (2000). Biochemical studies on the production of acetic acid by the yeast *Dekkera anomala*. *Food Technology and Biotechnology*, 38(1), 59-62.
- Gomes, R. J., de Fatima Borges, M., de Freitas Rosa, M., Castro-Gómez, R. J. H., & Spinosa, W. A. (2018). Acetic acid bacteria in the food industry: systematics, characteristics and applications. *Food technology and biotechnology*, 56(2), 139.
- González-Téllez SV, Vázquez Olivares DA, Espinosa-Raya J, Gómez-Pliego R. (2019). 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 Vol.4. 237-249

- Gaggia, F., Baffoni, L., Galiano, M., Nielsen, D. S., Jakobsen, R. R., Castro-Mejía, J. L., ... & Di Gioia, D. (2018). Kombucha beverage from green, black and rooibos teas: A comparative study looking at microbiology, chemistry and antioxidant activity. *Nutrients*, 11(1), 1.
- Gramza-Michałowska, A., Kulczyński, B., Xindi, Y., & Gumienna, M. (2016). Research on the effect of culture time on the kombucha tea beverage? its antiradical capacity and sensory value. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 15(4), 447-457.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2001). *Molecular cloning. A Laboratory Manual* 4th. Ed.
- Hutkins, R. W. (2019). *Microbiology and Technology of Fermented Foods*, 2nd edition. Wiley Blackwell.
- Ismaiel, A. A., Bassyouni, R. H., Kamel, Z., & Gabr, S. M. (2016). Detoxification of patulin by Kombucha tea culture. *CyTA-Journal of Food*, 14(2), 271-279
- Ivanišová, E., Meňhartová, K., Terentjeva, M., Harangozo, L., Kántor, A., & Kačániová, M. (2020). The evaluation of chemical, antioxidant, antimicrobial and sensory properties of kombucha tea beverage. *Journal of food science and technology*, 57, 1840-1846.
- Jakubczyk, K. J. P., Piotrowska, G., & Janda, K. (2020). Characteristics and biochemical composition of kombucha–fermented tea. *Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu*, 26(2), 94-96.
- Jayabalan, R., Malbaša, R. V., Lončar, 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(4), 538-550.
- Jayabalan, R., Marimuthu, S., & Swaminathan, K. (2007). Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*, 102(1), 392-398.
- Jarrell, J., Cal, T., & Bennett, J. W. (2000). The Kombucha consortia of yeasts and bacteria. *Mycologist*, 14(4), 166-170.
- Kaashyap, M., Cohen, M., & Mantri, N. (2021). Microbial diversity and characteristics of kombucha as revealed by metagenomic and physicochemical analysis. *Nutrients*, 13(12), 4446.
- Kim, J., & Adhikari, K. (2020). Current trends in kombucha: Marketing perspectives and the need for improved sensory research. *Beverages*, 6(1), 15.
- Kitwetcharoen, H., Phung, L. T., Klanrit, P., Thanonkeo, S., Tippayawat, P., Yamada, M., & Thanonkeo, P. (2023). Kombucha Healthy Drink—Recent

Advances in Production, Chemical Composition and Health Benefits. *Fermentation*, 9(1), 48.

- Kombucha Brewers International. Recuperado el 25 de junio de 2023 de <https://kombuchabrewers.org/>
- Laavanya, D., Shirkole, S., & Balasubramanian, P. (2021). Current challenges, applications and future perspectives of SCOBY cellulose of Kombucha fermentation. *Journal of Cleaner Production*, 295, 126454.
- Landis, E. A., Fogarty, E., Edwards, J. C., Popa, O., Eren, A. M., & Wolfe, B. E. (2022). Microbial Diversity and Interaction Specificity in Kombucha Tea Fermentations. *Msystems*, 7(3), e00157-22.
- Lavefve, L., Marasini, D., & Carbonero, F. (2019). Microbial ecology of fermented vegetables and non-alcoholic drinks and current knowledge on their impact on human health. *Advances in food and nutrition research*, 87, 147-185.
- Li, S., Zhang, Y., Gao, J., Li, T., Li, H., Mastroyannis, A., ... & Chang, K. (2022). Effect of Fermentation Time on Physiochemical Properties of Kombucha Produced from Different Teas and Fruits: Comparative Study. *Journal of Food Quality*, 2022.
- Lončar, E., Djurić, M., Malbaša, R., Kolarov, L. J., & Klašnja, M. (2006). Influence of working conditions upon kombucha conducted fermentation of black tea. *Food and Bioproducts Processing*, 84(3), 186-192.
- Lorentzen, M. P., Campbell-Sills, H., Jorgensen, T. S., Nielsen, T. K., Coton, M., Coton, E., ... & Lucas, P. M. (2019). Expanding the biodiversity of *Oenococcus oeni* through comparative genomics of apple cider and kombucha strains. *BMC genomics*, 20, 1-15.
- Lv, H. P., Zhang, Y. J., Lin, Z., & Liang, Y. R. (2013). Processing and chemical constituents of Pu-erh tea: A review. *Food Research International*, 53(2), 608-618.
- Lynch, K. M., Zannini, E., Wilkinson, S., Daenen, L. and Arendt, E. K. (2019) 'Physiology of acetic acid bacteria and their role in vinegar and fermented beverages', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. doi: 10.1111/1541-4337.12440
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). Brock: Biología de los microorganismos 10 Ed. *Editorial Pearson Prentice Hall Iberia, Madrid. Pp, 1064.*
- Malbaša, R., Lončar, E., & Djurić, M. (2008). Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. *Food chemistry*, 106(3), 1039-1045.
- Mamlouk, D., & Gullo, M. (2013). Acetic acid bacteria: physiology and carbon sources oxidation. *Indian journal of microbiology*, 53, 377-384.

- Marco, M. L., Sanders, M. E., Gänzle, M., Arrieta, M. C., Cotter, P. D., De Vuyst, L., ... & Hutkins, R. (2021). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(3), 196-208.
- Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2014). Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food microbiology*, 38, 171-178.
- Martínez Leal, J., Valenzuela Suárez, L., Jayabalan, R., Huerta Oros, J., & Escalante-Aburto, A. (2018). A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CyTA-Journal of Food*, 16(1), 390-399.
- Martínez-Leal, J., Ponce-García, N. & Escalante-Aburto, A. Recent Evidence of the Beneficial Effects Associated with Glucuronic Acid Contained in Kombucha Beverages. *Curr Nutr Rep* 9, 163–170 (2020). <https://doi.org/10.1007/s13668-020-00312-6>
- Matsumoto, C., Miedema, M. D., Ofman, P., Gaziano, J. M., & Sesso, H. D. (2014). An expanding knowledge of the mechanisms and effects of alcohol consumption on cardiovascular disease. *Journal of cardiopulmonary rehabilitation and prevention*, 34(3), 159-171.
- Miranda, J. F., Ruiz, L. F., Silva, C. B., Uekane, T. M., Silva, K. A., Gonzalez, A. G. M., & Lima, A. R. (2022). Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. *Journal of Food Science*, 87(2), 503-527.
- Muhialdin, B. J., Osman, F. A., Muhamad, R., Che Wan Sapawi, C. W. N. S., Anzian, A., Voon, W. W. Y., & Hussin, A. S. (2019). Effects of sugar sources and fermentation time on the properties of tea fungus (kombucha) beverage. *International Food Research Journal*, 26(2).
- Neffe-Skocińska, K., Sionek, B., Ścibisz, I., & Kołożyn-Krajewska, D. (2017). Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. *Cyta-journal of food*, 15(4), 601-607.
- Pfeiffer, T., & Morley, A. (2014). An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Frontiers in molecular biosciences*, 1, 17.
- PRO engineering and Manufacturing. Pasteurized kombucha: everything you should know about the pasteurization of kombucha tea. Recuperado el 25 de junio de 2023 de <https://prowm.com/pasteurization/kombucha-tea/tunnel-batch-pasteurizers/>
- R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Ramírez, J. A., Parra, J. A., & Aldana, A. A. (2017). Análisis de técnicas de recuento de Microorganismos. *Mente Joven*, 6, 01-08.

- Reva, O. N., Zaets, I. E., Ovcharenko, L. P., Kukharenko, O. E., Shpylova, S. P., Podolich, O. V., ... & Kozyrovska, N. O. (2015). Metabarcoding of the kombucha microbial community grown in different microenvironments. *AMB Express*, 5(1), 1-8.
- Rocha-Guzmán, N. E., González-Laredo, R. F., Moreno-Jiménez, M. R., Gallegos-Infante, J. A., Mancera-Rodríguez, J., & Rosales-Villarreal, M. C. (2023). Kombucha analogs from maqui juice: Consortium age and sugar concentration effects on anthocyanin stability and its relationship with antioxidant activity and digestive enzyme inhibition. *Food Chemistry*, 421, 136158.
- Şanlier, N., Gökçen, B. B., & Sezgin, A. C. (2017). Health benefits of fermented foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(3), 506-527.
- Schneier P. (2020). La fermentación: una mirada antropológica. En: Ferrari A., Vinderola G., Weill R. Alimentos Fermentados: Microbiología, nutrición, salud y cultura. 19-40.
- Silva Júnior, J. C., Mafaldo, Í. M., de Lima Brito, I., & de Magalhães Cordeiro, A. M. T. (2022). Kombucha: Formulation, chemical composition, and therapeutic potentialities. *Current Research in Food Science*.
- Smith, M. T., & Van Grinsven, A. M. (1984). *Dekkera anomala* sp. nov., the teleomorph of *Brettanomyces anomalus*, recovered from spoiled soft drinks. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 50, 143-148.
- Soares, M. G., de Lima, M., & Schmidt, V. C. R. (2021). Technological aspects of kombucha, its applications and the symbiotic culture (SCOBY), and extraction of compounds of interest: A literature review. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 539-550.
- Steensels, J., Daenen, L., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H., & Verstrepen, K. J. (2015). *Brettanomyces* yeasts: From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *International journal of food microbiology*, 206, 24-38.
- Suhre, T., Mann, M. B., Kothe, C. I., Rocha, A. L. G., Celso, P. G., Varela, A. P. M., ... & Frazzon, J. (2021). Microbial community and physicochemical characterization of kombuchas produced and marketed in Brazil. *Journal of Food Science and Nutrition Research*, 4(4), 302-316.
- Tran, T., Billet, K., Torres-Cobos, B., Vichi, S., Verdier, F., Martin, A., ... & Tourdot-Maréchal, R. (2022a). Use of a minimal microbial consortium to determine the origin of kombucha flavor. *Frontiers in Microbiology*, 13.
- Tran, T., Grandvalet, C., Verdier, F., Martin, A., Alexandre, H., & Tourdot-Maréchal, R. (2020a). Microbial dynamics between yeasts and acetic acid bacteria in kombucha: impacts on the chemical composition of the beverage. *Foods*, 9(7), 963.

- Tran, T., Grandvalet, C., Verdier, F., Martin, A., Alexandre, H., & Tourdot-Maréchal, R. (2020b). Microbiological and technological parameters impacting the chemical composition and sensory quality of kombucha. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 2050-2070.
- Tran, T., Verdier, F., Martin, A., Alexandre, H., Grandvalet, C., & Tourdot-Maréchal, R. (2022b). Oxygen management during kombucha production: Roles of the matrix, microbial activity, and process parameters. *Food Microbiology*, 105, 104024.
- Tull, T Space-efficient, high throughput fermenting system for producing alcohol-limited kombucha. (2020). Patent US10787634B2
- Velićanski, A. S., Cvetković, D. D., Markov, S. L., Tumbas Šaponjac, V. T., & Vulić, J. J. (2014). Antioxidant and antibacterial activity of the beverage obtained by fermentation of sweetened lemon balm (*Melissa officinalis* L.) tea with symbiotic consortium of bacteria and yeasts. *Food technology and biotechnology*, 52(4), 420-429.
- Villarreal, P., Quintrel, P. A., Olivares-Muñoz, S., Ruiz, J. J., Nespolo, R. F., & Cubillos, F. A. (2022). Identification of new ethanol-tolerant yeast strains with fermentation potential from central Patagonia. *Yeast*, 39(1-2), 128-140.
- Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J. P., & Taillandier, P. (2018). Understanding kombucha tea fermentation: a review. *Journal of food science*, 83(3), 580-588.
- Wacher C. (1993) Alimentos y bebidas fermentados tradicionales. en M. García-Garibay, R. Quintero-Ramírez, & A. López Munguía (Eds.), *Biología alimentaria* (pp. 313–349). México, D.F: LIMUSA.
- Wang, K., Gan, X., Tang, X., Wang, S., & Tan, H. (2009). Determination of d-saccharic acid-1, 4-lactone from brewed kombucha broth by high-performance capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, 878(3-4), 371-374.
- Wang, B., Rutherford-Markwick, K., Zhang, X. X., & Mutukumira, A. N. (2022). Kombucha: Production and Microbiological Research. *Foods*, 11(21), 3456.
- Wang, S., Zhang, L., Qi, L., Liang, H., Lin, X., Li, S., ... & Ji, C. (2020). Effect of synthetic microbial community on nutraceutical and sensory qualities of kombucha. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(10), 3327-3333.
- Wang, Z., Ahmad, W., Zhu, A., Geng, W., Kang, W., Ouyang, Q., & Chen, Q. (2023). Identification of volatile compounds and metabolic pathway during ultrasound-assisted kombucha fermentation by HS-SPME-GC/MS combined with metabolomic analysis. *Ultrasonics Sonochemistry*, 94, 106339.
- Watawana, M. I., Jayawardena, N., Gunawardhana, C. B., & Waisundara, V. Y. (2015). Health, wellness, and safety aspects of the consumption of kombucha. *Journal of Chemistry*, 2015.

- Yang, J., Lagishetty, V., Kurnia, P., Henning, S. M., Ahdoot, A. I., & Jacobs, J. P. (2022). Microbial and chemical profiles of commercial kombucha products. *Nutrients*, 14(3), 670.

7. Agradecimientos

Es para mí un verdadero placer aprovechar este espacio, agradeciendo a todos aquellos que me han ayudado y apoyado durante el desarrollo de esta tesina.

A mi directora Lucía, por tu infinita paciencia, predisposición y todo lo que me enseñaste en este tiempo: una fuente de admiración!,

A mi codirector Diego, por hacerme un lugar en el grupo y ayudarme a corregir esta tesis,

A la Universidad Nacional del Comahue y el Centro Regional Universitario Bariloche,

A los "CPA": Lu, Pablo y Eli, no solo por enseñarme gran parte de las técnicas necesarias para los análisis, sino por aguantarme todos los días en el laboratorio,

A los productores, que confiaron en nosotros, y nos brindaron las muestras necesarias para el desarrollo de esta tesis,

A Clara y Juli, por haberme ayudado a recolectar los datos sensoriales,

A Mariana y Andrea, por su ayuda en la medición por HPLC,

Al equipo de evaluación: Andrea, Sol, Nadia y Mariana, por sus correcciones y sugerencias. Sus aportes han mejorado significativamente este trabajo,

A mis compañeros del lab: Nachi, Caro, Nacho, Martín, Andre, Maca, Mica, Agus (X2), Vicky, Fran, Nati y Mati, por su compañía y ayuda,

A Alexandra, que cansada de este monopolístico sistema está logrando esparcir el conocimiento a todos,

A Vero, por permitir quejarme de problemas cuya solución se basa en el sentido común, a la vez de reírnos con cierta angustia sobre el día a día,

A mis suegros, por haberme regalado un hermoso y necesario descanso de un mes,

A Melita, por haberme ayudado a leer todos esos papers y libros. Te extraño,

A Martina, por haber transitado esta etapa tan importante juntos, y ser la esperanza de que todo será mejor. Te amo con cada célula de mi ser,

A Mamá, Papá, Feli, Abu, Bololo, Oma y Opa: con todo mi corazón, esta tesis se la dedico a ustedes.

8. Apéndice

Medio de cultivo	WLD	MRS	ADS
Microorganismos objetivo	Bacterias ácido acéticas y mesófilos totales	Bacterias ácido lácticas	Levaduras
Composición	Actidiona (cicloheximida), 0,004 g/L	Agar, 12 g/L	Agar, 15 g/L
	Agar, 20 g/L	Citrato de hidrógeno diamónico, 2 g/L	Dextrosa 40 g/L
	Verde de bromocresol, 0,022 g/L	Fosfato de hidrógeno dipotásico, 2 g/L	Peptona especial 10 g/L
	Cloruro de calcio, 0,125 g/L	D(+) glucosa, 20 g/L	
	Hidrolizado enzimático de caseína, 5 g/L	Sulfato de magnesio, 0,1 g/L	
	Dextrosa, 50 g/L	Sulfato de manganeso, 0,05 g/L	
	Cloruro férrico, 0,0025 g/L	Extracto de carne, 5 g/L	
	Sulfato de magnesio, 0,125 g/L	Acetato de sodio, 5 g/L	
	Sulfato de manganeso, 0,0025 g/L	Peptona universal, 10 g/L	
	Fosfato monopotásico, 0,55 g/L	Extracto de levadura, 5 g/L	
	Cloruro de potasio, 0,425 g/L		
Extracto de levadura, 4 g/L			

Tabla suplementaria 1. Detalle de medios de cultivo utilizados

Muestra	Azúcares remanentes (g/100 mL)	Acidez total (mEq/L)	pH	Ácido acético (g/100 mL)	Ácido láctico (g/100 mL)	Ácido glucurónico (g/100 mL)	Etanol (%V/V)
K1	3,16*	75,47*	3,34*	0,28*	0,06*	0,06*	1,4*
K2	3,17*	35,32*	3,79*	0,09*	0	0	2,19*
K3	3,37±0,58	82,53±2,16	3,66±0,03	0,18±0,03	0,17±0,03	0	0,71±0,16
K4	2,95±0,15	47,19±8,03	3,76±0,05	0,21±0	0,03±0	0,05±0	1,81±0,10
K5	5,68±0,01	61,52±0,88	2,7±0,02	0,231±0,01	0	0,11±0	0,33±0,01
K6	4,91±0,01	40,03±2,21	3,54±0,01	0,18±0	0,02±0	0	0,42±0
K7	1,98±0,03	122,38±4,57	3,04±0,01	0,6±0	0	0,1±0	1,76±0,02
K8	0,06*	14,2*	3,61*	0,04*	0,02*	0	2,28*
K9	4,68±0,06	47,64±0,33	3,4±0,02	0,16±0	0,13±0,01	0,13±0	1,07±0
K10	3,26±0,10	56,54±1,21	3,24±0,01	0,25±0	0,08±0	0	2,35±0,06

Tabla suplementaria 2. Resumen de caracterización fisicoquímica de kombuchas.

* indica que fue analizada solo una muestra.

	Alcoholímetro		HPLC
	Cerveza	Sidra	
K1	1,18	1,28	1,4
K2	1,96	2,02	2,19
K3	0,773	0,893	0,71
K4	1,42	1,7	1,81
K5	0,226	0,306	0,33
K6	0,286	0,406	0,42
K7	1,713	1,793	1,76
K8	2,2	2,26	2,28
K9	0,973	1,026	1,07
K10	2,126	2,173	2,35

Tabla suplementaria 3. Determinación de concentraciones de etanol en kombuchas con alcoholímetro y HPLC. Alcoholímetro “cerveza” vs HPLC, p-valor: 0,004; alcoholímetro “sidra” vs HPLC, p-valor: 0,20. Prueba t pareada.

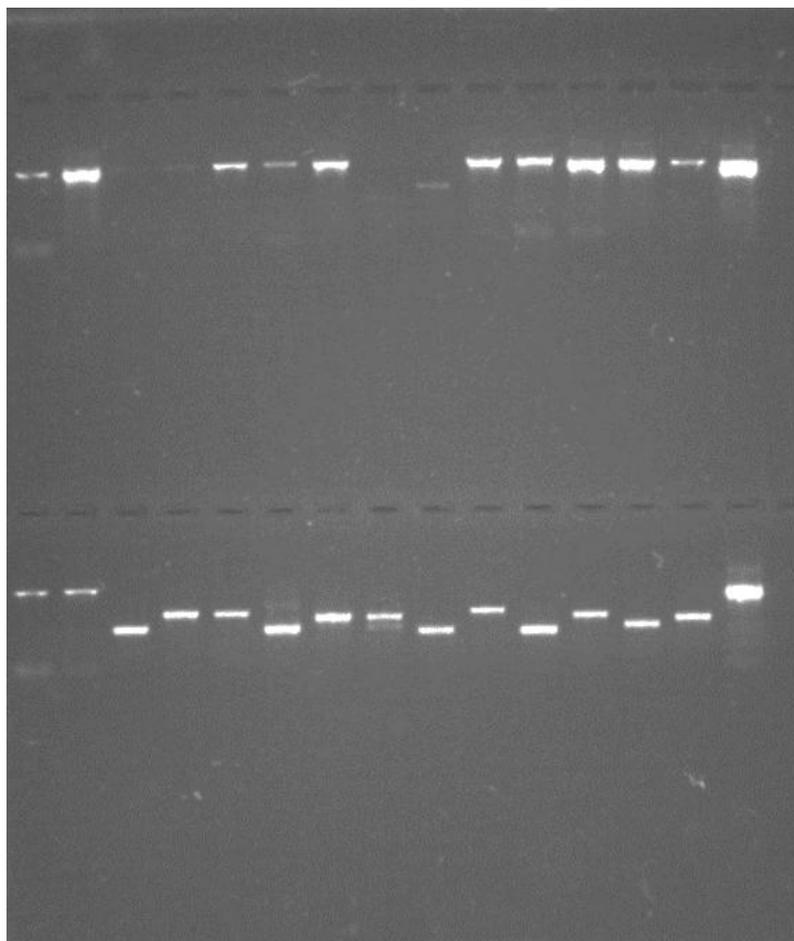


Figura suplementaria 1. Electroforesis de productos de PCR de aislamientos de bacterias y levaduras de kombuchas. Calles superiores: producto de amplificación del gen 16S de bacterias, calles inferiores: producto de amplificación de región ITS de levaduras.

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	4A	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	21_12_22_Mtras Kombucha
Vial:	12	Acq. Method Set:	AZUCARES
Injection #:	1	Processing Method:	Azúcares Gral_2022
Injection Volume:	10.00 ul	Channel Name:	410
Run Time:	30.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	
Date Acquired:	12/22/2022 2:21:12 AM ART		
Date Processed:	12/22/2022 10:49:24 AM ART		

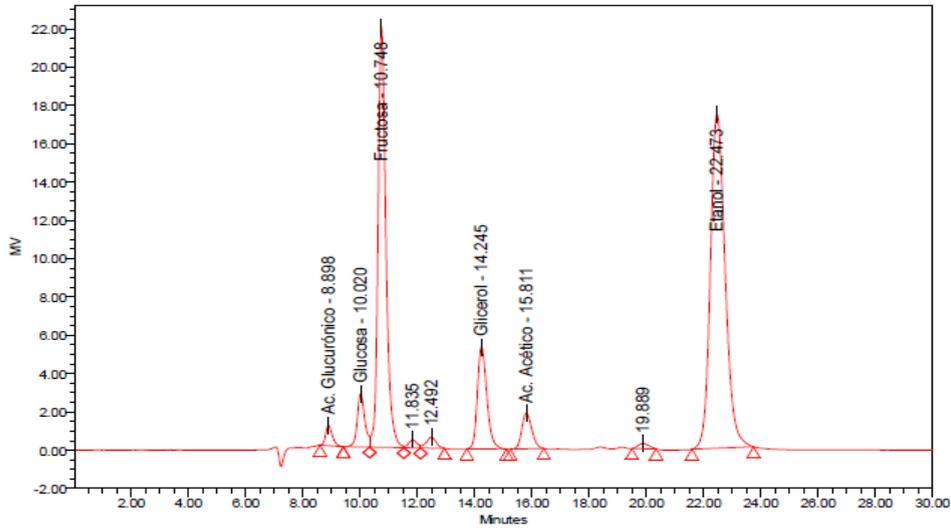


Figura suplementaria 2. Cromatograma de HPLC para una muestra de kombucha



Figura suplementaria 3. Fotografía de células de Brettanomyces anomalus. Aumento: 400X

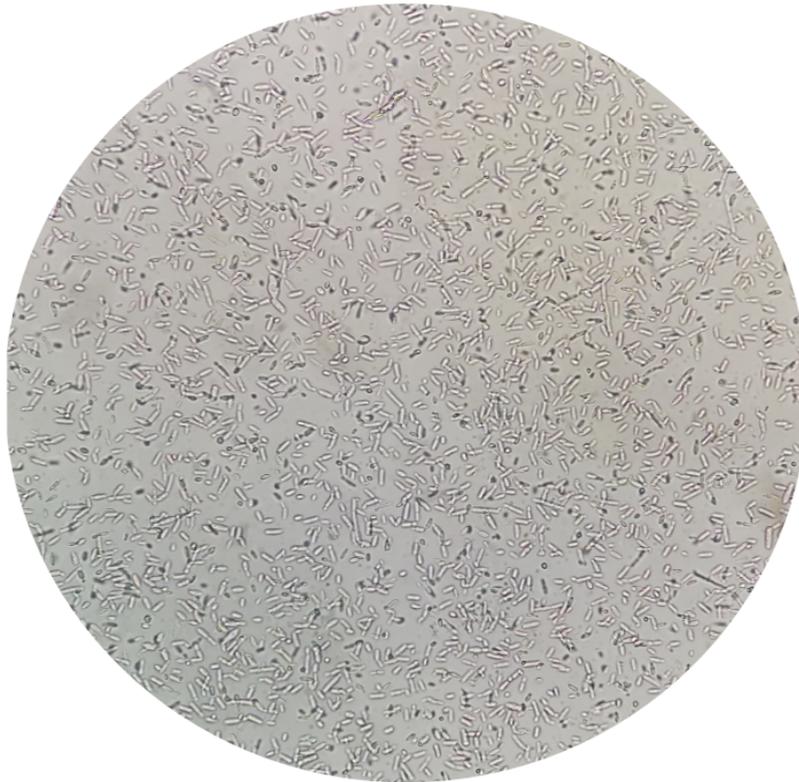


Figura suplementaria 4. Fotografía de células de Brettanomyces bruxellensis. Aumento: 400X

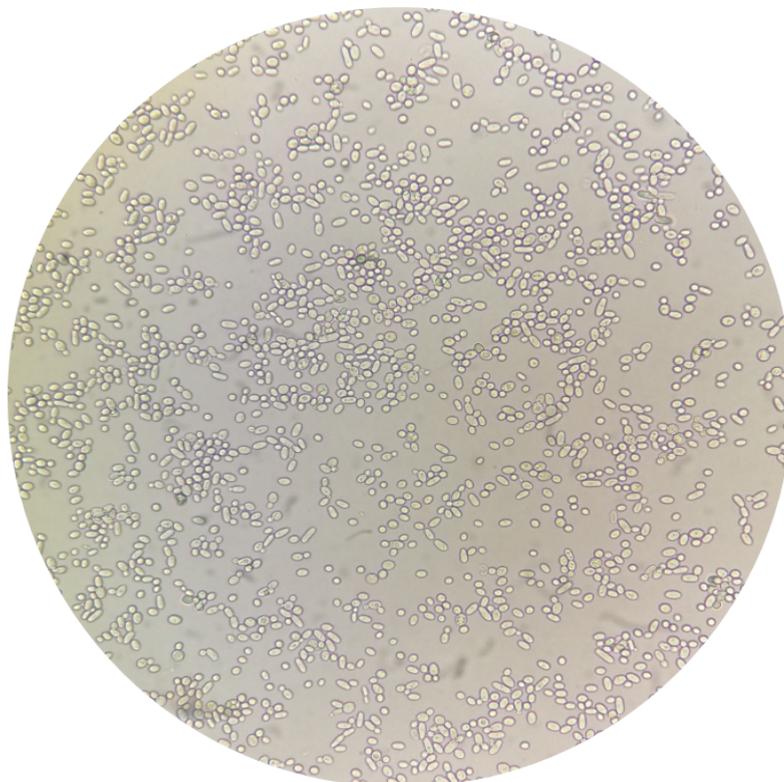


Figura suplementaria 5. Fotografía de células de Saccharomyces cerevisiae. Aumento:400X

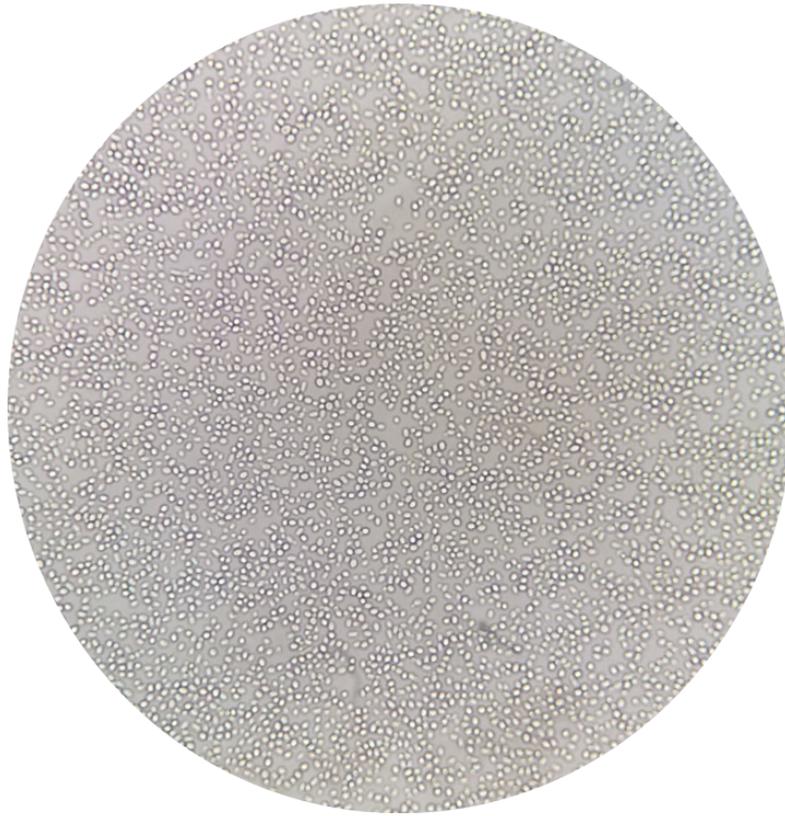


Figura suplementaria 6. Fotografía de células de Lachancea fermentati. Aumento: 400X

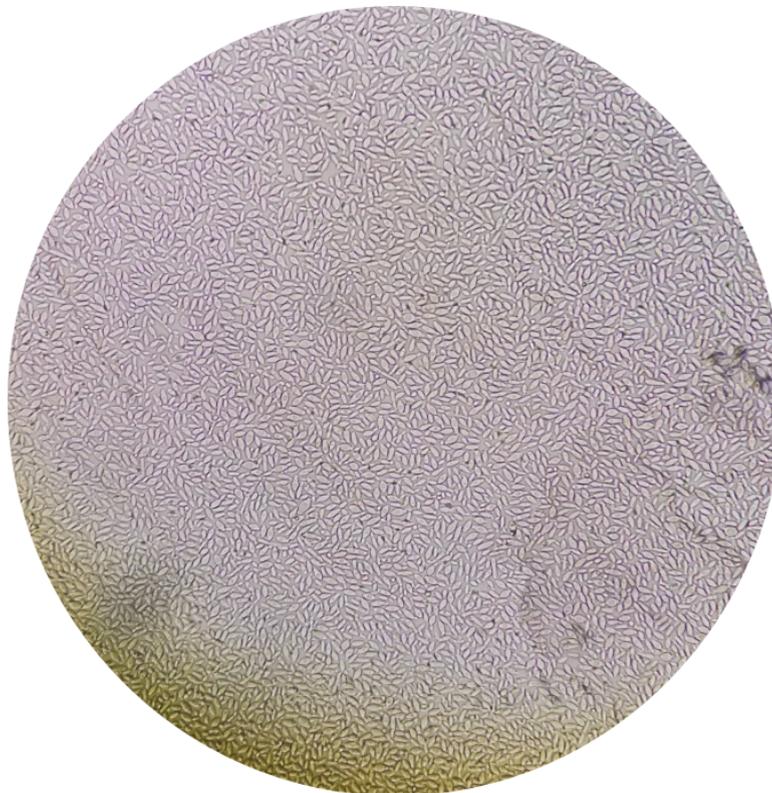


Figura suplementaria 7. Fotografía de células de Hanseniaspora valbyensis. Aumento: 400X

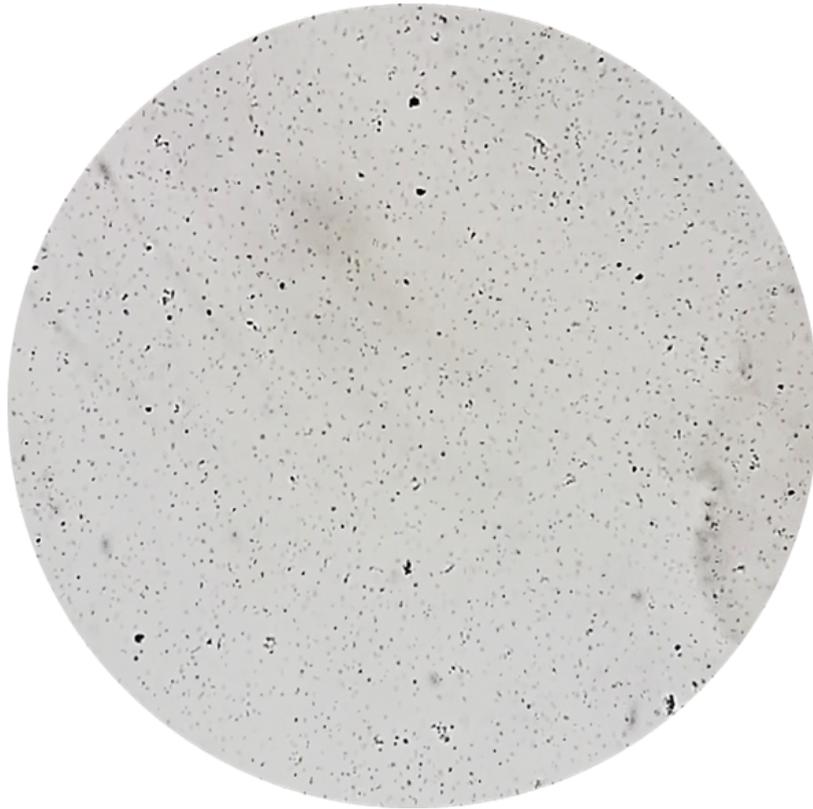


Figura suplementaria 8. Fotografía de células de Acetobacter tropicalis. Aumento: 400X

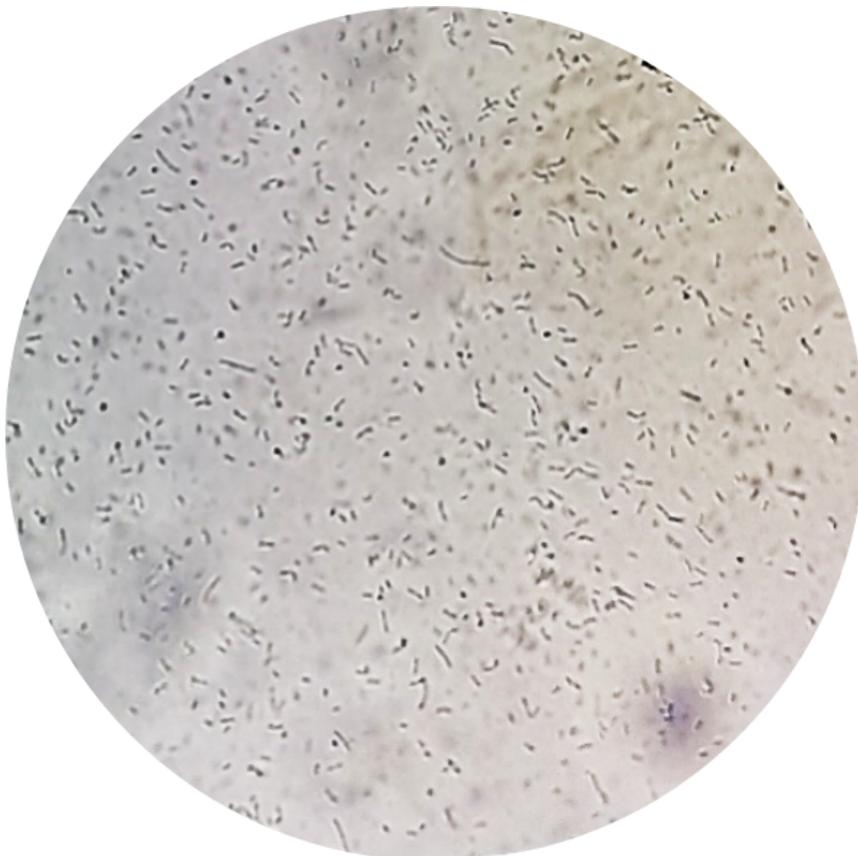


Figura suplementaria 9. Fotografía de células de Lactobacillus naghensis. Aumento:400X

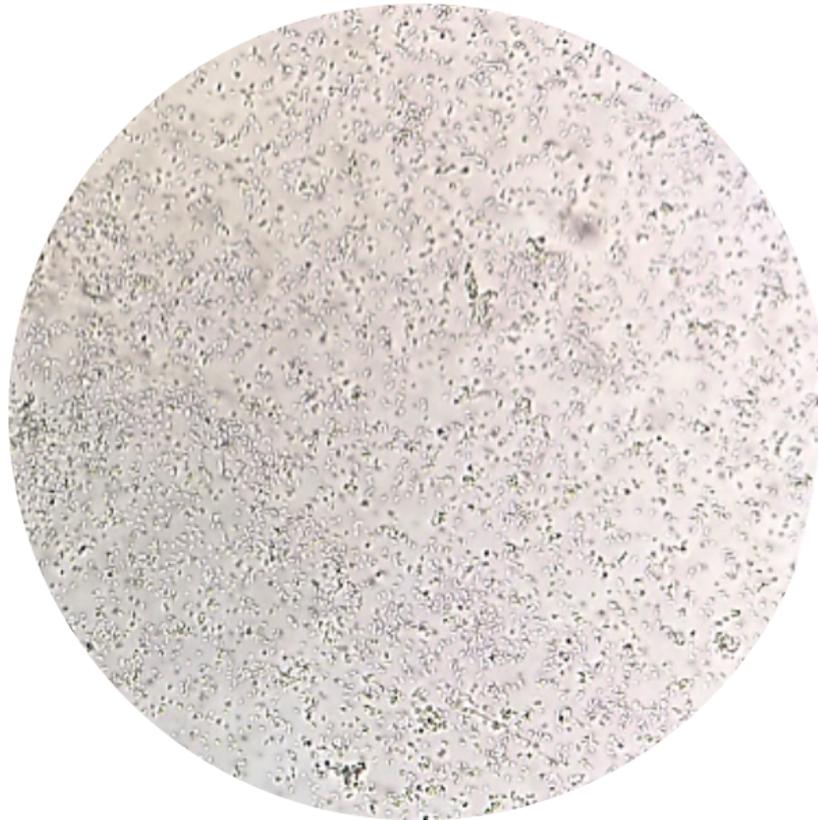


Figura suplementaria 10. Fotografía de células de Gluconobacter oxydans. Aumento: 400X



Figura suplementaria 11. Fotografía de células de Komagataeibacter saccharivorans. Aumento: 400X

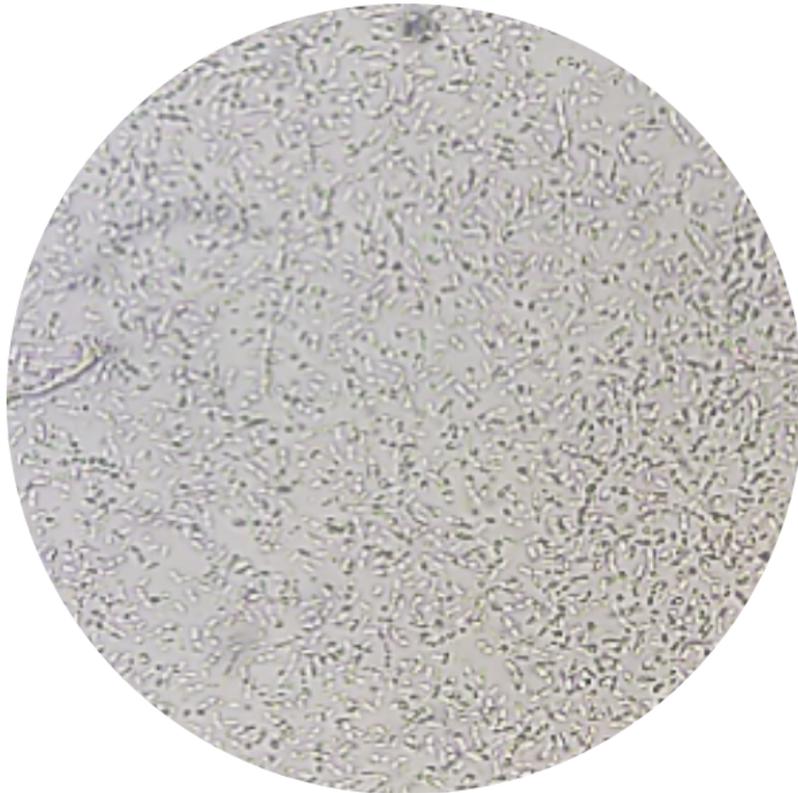


Figura suplementaria 12. Fotografía de células de Bacillus megaterium. Aumento: 400X

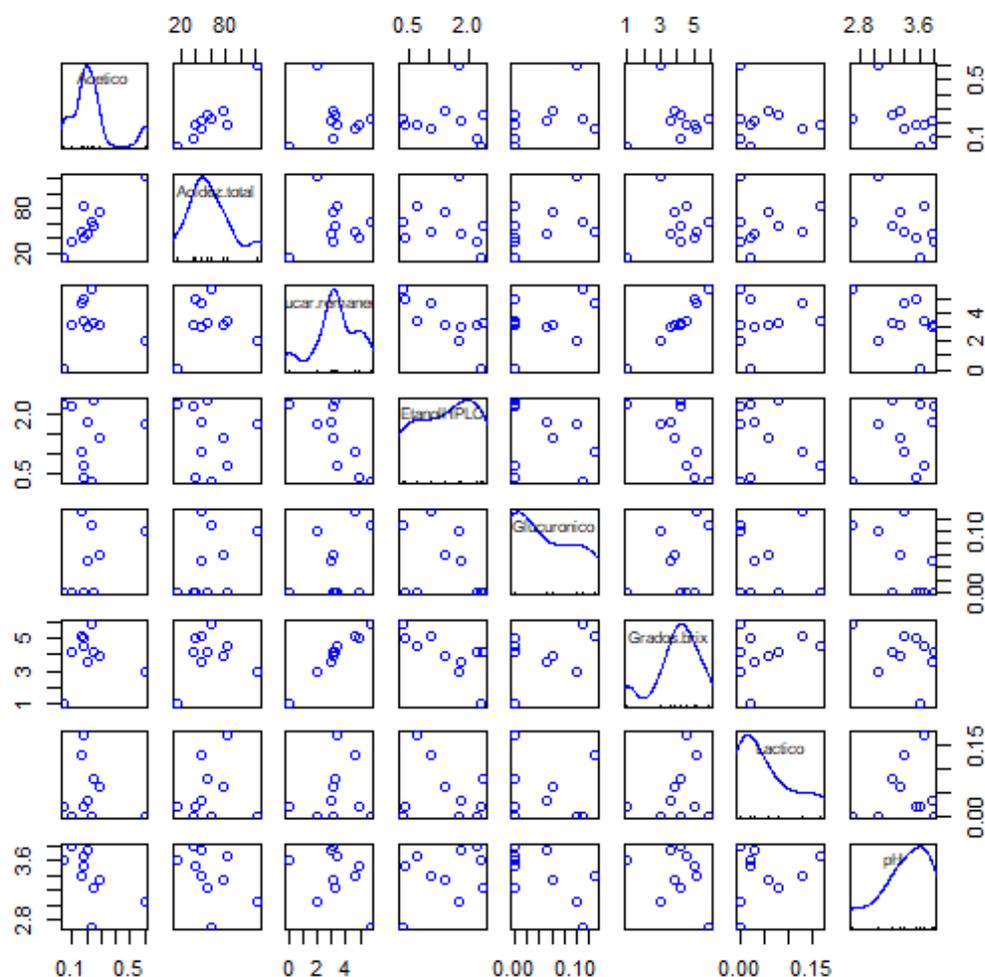


Figura suplementaria 13. Matriz de diagramas de dispersión para variables fisicoquímicas de kombuchas comerciales argentinas. Se observa una fuerte correlación entre la concentración de ácido acético y la acidez total.

```

Component loadings:
      Comp.1      Comp.2      Comp.3      Comp.4      Comp.5
Acetico      0.1812485  0.6834030  0.3468566  0.601486395  0.13421588
Azucar.remanente 0.6022000 -0.1970203 -0.2992709  0.056270324  0.71120237
EtanolHPLC   -0.6029757  0.2188004  0.1809116 -0.321339176  0.67272487
Glucuronico  0.4629963  0.4480776  0.1901439 -0.729214807 -0.13019964
Lactico      0.1629689 -0.4954757  0.8492607  0.005887807  0.08164916

Component variances:
      Comp.1      Comp.2      Comp.3      Comp.4      Comp.5
2.0730754  1.4341778  0.8198193  0.4401909  0.2327366

Importance of components:
      Comp.1      Comp.2      Comp.3      Comp.4      Comp.5
Standard deviation  1.4398178  1.1975716  0.9054387  0.66346884  0.48242780
Proportion of Variance 0.4146151  0.2868356  0.1639639  0.08803818  0.04654732
Cumulative Proportion 0.4146151  0.7014506  0.8654145  0.95345268  1.00000000

```

Figura suplementaria 14. "Loadings" y proporción de varianza de análisis de componentes principales de variables fisicoquímicas.

```

Component loadings:
      Comp.1      Comp.2      Comp.3      Comp.4      Comp.5
Ácido.acético  0.4118215  0.1653927  0.87436628  0.04160383  0.1918359
Especiado     -0.4729384  0.4584937  0.22516341  0.50038696 -0.5148079
Floral        -0.4746554 -0.3639686  0.39223161 -0.62113021 -0.3202822
Frutado      -0.4617315 -0.4973921  0.17321118  0.48249303  0.5259311
Herbal       -0.4101690  0.6185117 -0.03061535 -0.35955493  0.5647899

Component variances:
      Comp.1      Comp.2      Comp.3      Comp.4      Comp.5
2.73322184  1.24181390  0.65246471  0.28639771  0.08610183

Importance of components:
      Comp.1      Comp.2      Comp.3      Comp.4      Comp.5
Standard deviation  1.6532458  1.1143670  0.8077529  0.53516139  0.29343114
Proportion of Variance  0.5466444  0.2483628  0.1304929  0.05727954  0.01722037
Cumulative Proportion  0.5466444  0.7950071  0.9255001  0.98277963  1.00000000

```

Figura suplementaria 15. "Loadings" y proporción de varianza de análisis de componentes principales de descriptores aromáticos.

```

      Comp.1      Comp.2      Comp.3      Comp.4      Comp.5      Comp.6      Comp.7      Comp.8      Comp.9
Acético       0.1765829  0.49978357  0.48538513  0.2249150  0.37945532  0.22070987  0.2159980  0.417079995  0.13978309
Alcohol      -0.2407179  0.34052386 -0.59104065 -0.1851172 -0.07600567  0.19752349  0.6192430  0.109674878  0.04709679
Amargor     -0.4149051 -0.07437714 -0.19148871 -0.1733133  0.40118021 -0.38499613 -0.2814727  0.598156257 -0.09711351
Astringencia -0.3656618  0.33508350 -0.19536502  0.1455258  0.15599706  0.40698857 -0.5561385 -0.281371582  0.34092600
Carbonatación 0.3373245  0.32849860  0.02846401 -0.7812207  0.17479535  0.07387201 -0.2118844 -0.152560245 -0.25100734
Dulzor       0.4260523 -0.05252995 -0.19539508 -0.1718737 -0.23586444 -0.12674237 -0.1433229  0.307446621  0.74915930
Frutado     0.3727325 -0.10249332 -0.36904917  0.2407825  0.68590234 -0.22611832  0.1303950 -0.333885633  0.07948652
Láctico     0.1755036  0.60008795 -0.19123678  0.3392844 -0.32521907 -0.49565020 -0.2045748 -0.004827794 -0.25317345
Tomabilidad  0.3741379 -0.18752551 -0.35843908  0.2258164 -0.05041066  0.52923586 -0.2389057  0.384387627 -0.39739371

Component variances:
      Comp.1      Comp.2      Comp.3      Comp.4      Comp.5      Comp.6      Comp.7      Comp.8      Comp.9
5.075663473  1.975737526  1.250853918  0.326505310  0.157171466  0.120777185  0.058998485  0.032853575  0.001439063

Importance of components:
      Comp.1      Comp.2      Comp.3      Comp.4      Comp.5      Comp.6      Comp.7      Comp.8      Comp.9
Standard deviation  2.2529233  1.4056093  1.1184158  0.57140643  0.3964486  0.34753012  0.242896037  0.181255551  0.0379349901
Proportion of Variance  0.5639626  0.2195264  0.1389838  0.03627837  0.0174635  0.01341969  0.006555387  0.003650397  0.0001598959
Cumulative Proportion  0.5639626  0.7834890  0.9224728  0.95875114  0.9762146  0.98963432  0.996189707  0.999840104  1.0000000000

```

Figura suplementaria 16. "Loadings" y proporción de varianza de análisis de componentes principales de descriptores de sabor y sensaciones en boca.

```

      Comp.1      Comp.2      Comp.3      Comp.4      Comp.5
Lácteo.Sabor  0.4523509  0.09220723  0.8027014  0.3464057  0.1501664
Oxidado.Sabor 0.4909647 -0.03245329 -0.4431549  0.5929989 -0.4581118
Solvente.Sabor 0.4158154 -0.63825675 -0.2331284 -0.0918742  0.5974413
Sulfuros.Sabor 0.3590338  0.76067849 -0.3014212 -0.1554636  0.4212354
TOMABILIDAD  -0.5025182  0.06664211 -0.1186613  0.7040920  0.4829163

Component variances:
      Comp.1      Comp.2      Comp.3      Comp.4      Comp.5
3.46479961  0.86278038  0.40070384  0.19887735  0.07283882

Importance of components:
      Comp.1      Comp.2      Comp.3      Comp.4      Comp.5
Standard deviation  1.8613972  0.9288597  0.63301172  0.44595667  0.26988668
Proportion of Variance  0.6929599  0.1725561  0.08014077  0.03977547  0.01456776
Cumulative Proportion  0.6929599  0.8655160  0.94565677  0.98543224  1.00000000

```

Figura suplementaria 17. "Loadings" y proporción de varianza de análisis de componentes principales de descriptores de sabor considerados deméritos y tomabilidad.

	Comp.1	Comp.2	Comp.3	Comp.4	Comp.5	Comp.6	Comp.7	Comp.8
Acético	0.2161244	0.59364308	0.25195576	0.28349289	0.315699464	0.3551914	0.4425171	0.1880950
Acético.sabor	0.2430892	0.57267779	0.28262192	-0.21128466	0.008257258	-0.4055645	-0.4389188	-0.3622582
Alcohol.sabor	-0.3016248	-0.13229986	0.61474433	0.33398557	-0.299127145	0.3999402	-0.2055892	-0.3322140
Amargor	-0.4792383	-0.07895908	0.00259097	0.04835285	0.651185753	-0.2272624	0.2305199	-0.4826188
Astringencia	-0.4065347	0.09651736	0.42884594	-0.26017100	-0.301442303	-0.4370002	0.4056681	0.3569495
Azúcar	0.2856931	-0.41437185	0.46962498	0.15257280	0.463416393	-0.2265074	-0.2697331	0.4050100
Dulzor	0.4425531	-0.20092339	0.01176662	0.46864370	-0.279260421	-0.4151043	0.4229317	-0.3388835
Etolol	-0.3616723	0.27294764	-0.27226993	0.67120183	-0.056010129	-0.2883919	-0.3161151	0.2895068

Importance of components:

	Comp.1	Comp.2	Comp.3	Comp.4	Comp.5	Comp.6	Comp.7	Comp.8
Standard deviation	2.0136943	1.3696770	1.1758896	0.69936685	0.34776676	0.241769684	0.120219303	0.057816675
Proportion of Variance	0.5068706	0.2345019	0.1728395	0.06113925	0.01511772	0.007306572	0.001806585	0.000417846
Cumulative Proportion	0.5068706	0.7413725	0.9142120	0.97535128	0.99046900	0.997775569	0.999582154	1.000000000

Figura suplementaria 18. “Loadings” y proporción de varianza de análisis de componentes principales de descriptores sensoriales de sabor asociados a componentes químicos