

UNIVERSIDAD TÉCNICA NACIONAL

Sede Atenas

Ingeniería en Tecnología de Alimentos

Estudio de viabilidad técnica para obtención de proteína microbiana a partir de un cultivo simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY) subproducto de la elaboración de kombucha para ser utilizado en alimentación humana

Trabajo final de graduación para optar por el grado de
LICENCIATURA EN INGENIERÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Thamara González Rojas

Jimena Rojas Torres

Isabella Sáenz Céspedes

Mariangela Tretti Beckles

Atenas, Costa Rica

2025

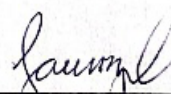
DECLARACIÓN JURADA

Yo, Thamara González Rojas, portadora de la cédula de identidad número 118240463, junto a Jimena Rojas Torres, portadora de la cédula de identidad número 208170322, Isabella Sáenz Céspedes, portadora de la cédula de identidad número 118690855 y Mariangela Tretti Beckles, portadora de la cédula de identidad número 117820300, estudiantes de la Universidad Técnica Nacional (UTN), en la carrera de Ingeniería en Tecnología de Alimentos, conocedoras de las sanciones legales con que la Ley Penal de la República de Costa Rica castiga el falso testimonio y el delito de perjurio que pueda ocasionarse ante el (la) Director (a) de Carrera y quienes constituyen el Tribunal Examinador de este trabajo de investigación, juramos solemnemente que este trabajo de investigación es una obra original, respetando las leyes y que ha sido elaborada siguiendo las disposiciones exigidas por la Universidad Técnica Nacional (UTN), así como con los derechos de autor.

En fe de lo anterior, firmamos en la ciudad de Atenas, a los veintinueve días del mes de agosto del 2025.



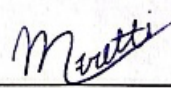
Thamara González Rojas
118240463



Isabella Sáenz Céspedes
118690855



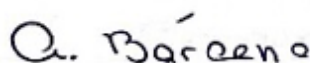
Jimena Rojas Torres
208170322



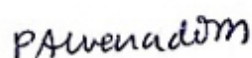
Mariangela Tretti Beckles
117820300

HOJA DE APROBACIÓN

Este Trabajo Final de Graduación fue aprobado por el Tribunal Evaluador como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería en Tecnología de Alimentos.



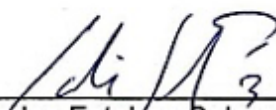
Ana María Bárcenas Parra
Director de Carrera



Priscilla Alvarado Marengo
Tutora del TFG



Maynor Alberto Vargas Vargas
Lector TFG



Carlos Esteban Solera Ramírez
Lector TFG

DEDICATORIA

A mi familia, por estar siempre a mi lado, por su apoyo incondicional, por confiar en mí y motivarme a seguir adelante sin importar las dificultades. A mis seres queridos, por darme fuerzas cuando más lo necesité. Y me dedico este logro a mí, por todo el esfuerzo, dedicación y perseverancia que me permitieron culminar con esta licenciatura.

Thamara González

A mi familia, por ser mi motor y mi mayor inspiración. Gracias por cada palabra de aliento y por estar siempre, en cada paso del camino. A mis amigas, por su compañía, sus risas, sus mensajes de ánimo y por recordarme que nunca estoy sola. A todas las personas que creyeron en mí, incluso en los momentos en que yo misma dudaba. Y a mí, por no rendirme, por seguir adelante a pesar del cansancio. Hoy me siento orgullosa por haber llegado hasta aquí.

Jimena Rojas

A mi familia, por su apoyo constante, por estar siempre presentes y por ser mi base. A mis amigas, por acompañarme en este proceso con su compañía y comprensión. Y a mí misma, por la dedicación, la paciencia y la constancia puesta en cada paso. Este logro es el reflejo del esfuerzo compartido.

Isabella Sáenz

Dedico este logro a mí por toda la dedicación y esfuerzo durante meses. También, a mi familia por siempre estar ahí apoyándome desde el primer día que inicié la carrera hasta ahora. A mis amigas de la universidad, a quienes conocí los primeros años de carrera y que siguen estando presente.

Mariangela Tretti

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos plenamente a la Universidad Técnica Nacional, sede Atenas, por el acompañamiento y apoyo durante el período de ejecución del presente trabajo. Para todas nosotras es un orgullo formar parte de esta institución.

A Priscilla Alvarado Marengo, nuestra tutora de tesis, quien nos ha brindado la oportunidad de formar parte de su seminario y proyecto, además de su guía, paciencia y dedicación en todos estos meses. Desde el primer curso que llevamos con ella, nos ha inspirado a ser mejores profesionales y a seguir nuestros sueños.

A nuestros lectores, Maynor Vargas Vargas y Carlos Solera Ramírez, por dar seguimiento al trabajo y brindarnos sus conocimientos para mejorar la investigación. También, a todos los otros docentes que formaron parte de nuestro desarrollo dentro de la institución y a todos aquellos colegas que conocimos dentro de la universidad y en el ámbito laboral.

TABLA DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN JURADA	Error! Bookmark not defined.
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	vi
TABLA DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE APÉNDICES	xiii
RESUMEN	xiv
I. INTRODUCCIÓN	15
1.1 Área de estudio	16
1.2 Delimitación del problema	16
1.3 Justificación	20
1.4 Antecedentes	22
1.5 Objetivos	29
1.5.1 Objetivo general	29
1.5.2 Objetivos específicos	29
II. MARCO TEÓRICO	31
2.1 Proteínas	32
2.1.1 Generalidades	32
2.1.2 Principales fuentes	34
2.1.2.1 Fuentes convencionales.	35
2.1.2.2. Fuentes alternativas.	38
2.1.3. Proteínas de origen microbiano	41
2.1.3.1 Breve reseña.	41
2.1.3.2 Principales procesos para obtención de proteína microbiana.	43
2.1.3.3 Principales sustratos utilizados.	44
2.1.3.4 Ventajas y desventajas.	45
2.2 Kombucha	47
2.2.1 Breve reseña de la kombucha	47
2.2.2 Proceso	49
2.2.4 Generación de la biomasa	51
2.2.5 Características de la biomasa (composición química)	52
2.3 Fermentación	54
2.3.1 Definición	54
2.3.2 Fermentación alcohólica	56

2.3.3 Fermentación acética	57
2.3.5 Cultivos microbianos	60
2.3.6 Cultivos simbióticos	61
2.5 Métodos de análisis	62
2.5.1 Análisis proximal	62
2.5.1.1 Humedad.	63
2.5.1.2 Proteína.	64
2.5.1.3 Grasa.	67
2.5.1.4 Fibra cruda.	69
2.5.1.5 Cenizas.	70
2.6 Análisis estadístico	74
2.6.1 Análisis de varianza de dos vías	74
2.6.1.1 Prueba post-hoc de Tukey.	75
III. MARCO METODOLÓGICO	76
3.1 Tipo de enfoque	77
3.1.1 Tipo de investigación	77
3.2 Sujetos y fuente de información	78
3.3 Pregunta generadora	78
3.4 Variables	80
3.5 Población y muestra	83
3.6 Descripción de la metodología	83
3.7 Pruebas preliminares	83
3.7.1 Preparación de infusiones	84
3.7.2 Descripción de etapas	85
3.8 Pruebas definitivas	87
3.9 Análisis fisicoquímicos	89
3.9.1 pH	89
3.9.2 Sólidos solubles	89
3.9.3 Temperatura	90
3.9.4 Tasa de crecimiento	90
3.10 Análisis proximal	91
3.10.1 Humedad y cenizas	91
3.10.2 Proteína	91
3.10.3 Grasa cruda	92
3.10.4 Carbohidratos totales	92
3.10.5 Fibra dietética soluble e insoluble	92
3.10.5.1 Fibra insoluble.	93
3.11 Técnicas e instrumentos para recolección de información	93

3.12 Técnicas de análisis de la información	94
IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS	95
4.1 Resultados y análisis objetivo N.º 1	96
4.1.1 Prueba preliminar N.º 1	96
4.1.2 Prueba preliminar N.º 2	98
4.1.3 Prueba preliminar N.º 3	101
4.2 Resultados y análisis de los objetivos N.º 2 y N.º 3	101
4.2.1 Seguimiento del avance de la fermentación	102
4.2.1.1 Comportamiento del pH en el medio de cultivo líquido.	102
4.2.1.2 Comportamiento de los sólidos solubles en el medio de cultivo líquido.	107
4.2.1.3 Comportamiento de la temperatura del medio de cultivo líquido.	112
4.2.1.4 Comportamiento del crecimiento del SCOBY a lo largo del tiempo de fermentación.	115
4.2.2 Composición química del SCOBY.	121
4.2.2.1 Contenido de humedad.	123
4.2.2.2 Contenido de ceniza.	125
4.2.2.3 Contenido de grasa total.	127
4.2.2.4 Contenido de proteína.	129
4.2.2.5 Contenido de carbohidratos.	136
4.2.2.6 Contenido de fibra.	139
4.2.2.6.1 Fibra soluble.	139
4.2.2.6.2 Fibra insoluble.	143
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	147
5.1 Conclusiones	148
5.2 Recomendaciones	150
VI. REFERENCIAS	151
VII. APÉNDICES	187

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química en base seca de la biomasa generada por el SCOBY reportada por diversos autores	53
Tabla 2. Operacionalización de variables	80
Tabla 3. Valores promedio de pH del medio de cultivo líquido para distintos tiempos de fermentación y para las concentraciones de azúcar	106
Tabla 4. Contenido promedio de sólidos solubles en el medio de cultivo líquido para los distintos tiempos de fermentación y para una concentración inicial de 7,0 % de azúcar en el sustrato	110
Tabla 5. Contenido promedio de sólidos solubles en el medio de cultivo líquido para los distintos tiempos de fermentación y para una concentración inicial de 10,5 % de azúcar en el sustrato	111
Tabla 6. Comportamiento de la temperatura promedio en función del tiempo de fermentación, para la concentración de 7,0 % de azúcar en el sustrato	114
Tabla 7. Comportamiento de la temperatura promedio en función del tiempo de fermentación, para la concentración de 10,5 % de azúcar en el sustrato	115
Tabla 8. Comportamiento de la tasa de crecimiento en función del tiempo de fermentación, para la concentración de 7,0 % de azúcar en el sustrato	119
Tabla 9. Comportamiento de la tasa de crecimiento en función del tiempo de fermentación, para la concentración de 10,5 % de azúcar en el sustrato	119
Tabla 10. Composición química promedio del SCOBY (g/100 g) en función del tiempo de fermentación, para la concentración de 7,0 % de azúcar en el sustrato	122
Tabla 11. Composición química promedio del SCOBY (g/100 g) en función del tiempo de fermentación, para la concentración de 10,5 % de azúcar en el sustrato	122
Tabla 12. Masa del SCOBY para las tres corridas definitivas a lo largo del tiempo de fermentación	192
Tabla 13. Aumento de masa del SCOBY para las tres corridas definitivas a lo largo del tiempo de fermentación	193

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Equipo de extracción Soxhlet	69
Figura 2. Diagrama de flujo de pruebas preliminares	84
Figura 3. Diagrama de flujo de pruebas definitivas	88
Figura 4. Evidencia visual de la contaminación microbiana durante la fermentación preliminar 1 (muestras desechadas)	97
Figura 5. Comportamiento promedio del pH del medio de cultivo líquido en función del tiempo de fermentación para las dos concentraciones de azúcar	103
Figura 6. Comportamiento de los sólidos solubles en función del tiempo de fermentación, para ambas concentraciones de azúcar en el sustrato	108
Figura 7. Comportamiento de la temperatura del medio de cultivo líquido a lo largo del tiempo de fermentación para ambas concentraciones de azúcar	113
Figura 8. Comportamiento del crecimiento de la tasa de crecimiento del SCOBY en función del tiempo de fermentación, para ambas concentraciones de azúcar en el sustrato	116
Figura 9. Interacción entre el tiempo de fermentación y concentración de azúcar en función de la tasa de crecimiento	120
Figura 10. Comportamiento del contenido de humedad en función del tiempo de fermentación, para las dos concentraciones de azúcar en el sustrato	123
Figura 11. Comportamiento del contenido de cenizas (base seca) en función del tiempo de fermentación, para las dos concentraciones de azúcar en el sustrato	126
Figura 12. Comportamiento del contenido de grasa (base seca) en función del tiempo de fermentación, para las dos concentraciones de azúcar en el sustrato	128
Figura 13. Comportamiento del contenido de proteína (base seca) en función del tiempo de fermentación, para las dos concentraciones de azúcar en el sustrato	130
Figura 14. Interacción entre el tiempo de fermentación y concentración de azúcar para el contenido de proteína en el cultivo simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY)	133
Figura 15. Correlación entre el contenido de proteína en base seca y la tasa de crecimiento del SCOBY para una concentración de sustrato de 7,0 % de azúcar	134
Figura 16. Comportamiento del contenido de carbohidratos (base seca) en función del tiempo de fermentación, para las dos concentraciones de azúcar en el sustrato	137
Figura 17. Comportamiento del contenido de fibra soluble (base seca) en función del tiempo de fermentación, para las dos concentraciones de azúcar en el sustrato	140
Figura 18. Interacción entre el tiempo de fermentación y concentración de azúcar para el contenido de fibra soluble en el cultivo simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY)	141
Figura 19. Comportamiento del contenido de fibra insoluble (base seca) en función del tiempo de fermentación, para las dos concentraciones de azúcar en el sustrato	143

Figura 20. Interacción entre el tiempo de fermentación y concentración de azúcar para el contenido de fibra insoluble en el cultivo simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY)	145
Figura 21. Análisis de varianza de dos vías para el comportamiento del pH del medio de cultivo	207
Figura 22. Prueba post-hoc de Tukey para el comportamiento del pH del medio de cultivo	207
Figura 23. Análisis de varianza de dos vías para los sólidos solubles del medio de cultivo	208
Figura 24. Prueba post-hoc de Tukey para los sólidos solubles del medio de cultivo	208
Figura 25. Descripción estadística del efecto de la concentración de azúcar en el contenido de sólidos solubles	209
Figura 26. Análisis de varianza de dos vías para la temperatura del medio de cultivo	209
Figura 27. Prueba post-hoc de Tukey para la temperatura del medio de cultivo	209
Figura 28. Análisis de varianza de dos vías para la tasa de crecimiento del SCOBY	210
Figura 29. Prueba post-hoc de Tukey para la tasa de crecimiento del SCOBY	210
Figura 30. Descripción estadística del efecto de la concentración de azúcar en la tasa de crecimiento del SCOBY	211
Figura 31. Análisis de varianza de dos vías para la humedad del SCOBY	211
Figura 32. Análisis de varianza de dos vías para las cenizas (base seca) del SCOBY	212
Figura 33. Análisis de varianza de dos vías para la grasa total (base seca) del SCOBY	212
Figura 34. Análisis de varianza de dos vías para la proteína total (base seca) del SCOBY	212
Figura 35. Análisis de medias para la proteína total (base seca) del SCOBY	213
Figura 36. Análisis de correlación de Pearson para la interacción entre la proteína total (base seca) y la tasa de crecimiento del SCOBY	213
Figura 37. Análisis de varianza de dos vías para los carbohidratos totales (base seca) del SCOBY	213
Figura 38. Análisis de varianza de dos vías para la fibra dietética soluble (base seca) del SCOBY	214
Figura 39. Prueba post-hoc de Tukey para la fibra dietética soluble (base seca) del SCOBY	214
Figura 40. Análisis de varianza de dos vías para la fibra dietética insoluble (base seca) del SCOBY	215
Figura 41. Prueba post-hoc de Tukey para la fibra dietética insoluble (base seca) del SCOBY	216

ÍNDICE DE APÉNDICES

Apéndice 1. Resultados obtenidos del análisis proximal para los días 14 y 21 para las muestras obtenidas en la prueba preliminar 2	188
Apéndice 2. Resultados obtenidos del análisis proximal para el día 21 y concentración 7 % para la muestra obtenida en la prueba preliminar 3	191
Apéndice 3. Datos experimentales para el cálculo de la tasa de crecimiento	192
Apéndice 4. Resultados obtenidos del análisis proximal para las tres corridas definitivas	194
Apéndice 5. Evidencia del análisis estadístico	207

RESUMEN

En este trabajo, se evalúa la viabilidad técnica de utilizar el cultivo simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY), un subproducto generado a partir de la elaboración de kombucha, como fuente de proteína microbiana para consumo humano. El estudio se centra en buscar una fuente alternativa de proteína sostenible para abordar la problemática de inseguridad alimentaria y reducir el impacto ambiental de las fuentes tradicionales de proteína. Los objetivos de la investigación incluyeron establecer las condiciones de fermentación óptimas para obtener la biomasa microbiana, en donde se estudiaron cuatro tiempos de fermentación y dos concentraciones de azúcar. Para dar seguimiento al avance del proceso, se estudiaron tres parámetros fisicoquímicos (pH, sólidos solubles y temperatura), se midió la tasa de crecimiento de la biomasa y se analizaron las características bromatológicas de las muestras. Los resultados arrojaron que la tasa de crecimiento del SCOBY aumenta con el tiempo de fermentación, siendo mayor en el medio líquido con concentración de azúcar del 7 %. Se obtuvo que la composición de la biomasa varía en comparación a otros estudios, mostrando un contenido de proteína en base seca menor al 3 %. Sin embargo, los resultados de humedad, carbohidratos y fibra dietética se asemejan a lo expuesto por otros autores. Con esto, se concluye que se requieren más estudios para optimizar la producción de este nutriente y para concluir que la obtención de biomasa a partir del SCOBY es viable. Además, existe un potencial con fibras que necesita de mayores investigaciones.

I. INTRODUCCIÓN

En este primer apartado de la investigación, se presenta su área de estudio, centrada en la microbiología de las fermentaciones y la química de alimentos. Se establece la delimitación del problema, señalando el crecimiento poblacional y su relación con la inseguridad alimentaria, lo cual destaca la importancia de la búsqueda de fuentes de proteína alternativa. Asimismo, se justifica la investigación del cultivo simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY por sus siglas en inglés) destacando su importancia científica y tecnológica en el área de proteínas alternativas. Se incluyen antecedentes de estudios previos relacionados con proteínas unicelulares y, finalmente, se establecen los objetivos (general y específicos) del proyecto de investigación.

1.1 Área de estudio

La investigación está delimitada en dos áreas relacionadas con la ingeniería en tecnología de alimentos, las cuales son el área de microbiología de las fermentaciones, mediante la caracterización de un cultivo simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY) en condiciones controladas, y, el área de análisis químico de alimentos, mediante la aplicación de métodos proximales validados para cuantificar macronutrientes respectivamente. Además, está centrada en la búsqueda de fuentes alternativas sostenibles de proteína para consumo humano y se relaciona con el área de investigación de aprovechamiento de subproductos definida por la carrera.

1.2 Delimitación del problema

El crecimiento poblacional mundial proyectado para los años venideros representa una creciente demanda por los alimentos. Según la División de Población del Departamento de Asuntos Económicos y Sociales de las Naciones Unidas (DESA) (2022), la población mundial está en un aumento constante; se prevé un crecimiento

de 8 500 millones de habitantes para el año 2030 y aproximadamente unos 9 700 millones para el año 2050. Este crecimiento poblacional se relaciona directamente con la inseguridad alimentaria mundial, ya que, desde el año 2015, se ha observado un aumento alarmante (Organización de la Naciones Unidas [ONU], 2023).

En el año 2022, se evidenció que el 9,2 % de la población mundial se encontraba en estado de hambre crónica y aproximadamente 2 400 millones de personas presentaron inseguridad alimentaria en niveles moderados a graves para ese mismo año. Previsiones de expertos muestran que para 2030 la cifra de personas que se enfrentan a condiciones de hambre podría superar los 600 millones de personas (ONU, 2023), lo cual hace difícil el cumplimiento del objetivo 2 (hambre cero) del desarrollo sostenible.

Hay evidencia de que esta problemática mundial tiene grandes repercusiones en el desarrollo de la infancia; por ejemplo, en el año 2020, había un 22 % de niños menores de 5 años que sufrían de retrasos en el crecimiento (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 2022).

Ahora bien, se sabe que uno de los nutrientes más importantes dentro de las dietas son las proteínas. Estas son macromoléculas esenciales que se componen de aminoácidos; dentro de los organismos vivos, actúan como componentes estructurales y funcionales. Cumplen un papel fundamental en los procesos biológicos, debido a que son indispensables para mantener la integridad de los tejidos y facilitar la regeneración. También, están relacionadas con la creación, reparación y mantenimiento de tejidos corporales durante las etapas de crecimiento (Salazar et al., 2025). Estas macromoléculas son las responsables de aportar aminoácidos esenciales, nitrógeno y energía al organismo (Morales et al., 2017).

Dentro de las proteínas que tradicionalmente se han ingerido, resaltan aquellas de origen animal, ya que estas logran proporcionar todos los aminoácidos esenciales (Morales et al., 2017). Sin embargo, estas fuentes proteicas se han relacionado con impactos negativos sobre la salud y el planeta.

La producción de proteínas de origen animal conlleva impactos sobre el ambiente como la contaminación y explotación de recursos. Genera mayores emisiones por unidad de energía que los productos de origen vegetal, posicionándose como la principal fuente de metano. Aproximadamente, el 12 % de las emisiones de gases de efecto invernadero son producidas por esta industria; el mayor productor de estos gases es el ganado bovino (62 %), seguido del porcino (14 %), las aves de corral (9 %), búfalos (8 %) y ovejas y cabras (7 %) (Godfrey et al., 2018; FAO, 2023).

Este tipo de agricultura utiliza aproximadamente un tercio del agua dulce, lo que provoca estrés hídrico. Otro factor importante es que contribuye a la contaminación por nitrógeno y fósforo. A su vez, afecta la biodiversidad por la deforestación y transformación de campos en áreas de pastos y cultivos para alimento (Godfrey et al., 2018).

Además, las proteínas de fuentes animales se han asociado con riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, lo cual afecta a más de 17,9 millones de personas al año (Quesada y Gómez, 2019). Por lo tanto, una de las principales alternativas que se ha tomado en cuenta es la producción e ingesta de proteínas de fuente vegetal, ya que estas presentan un menor efecto ambiental y requieren una menor extensión de terreno, por tamaño de porción, gramos de proteína o energía aportada en comparación con la producción de proteínas animales. Por otro lado, el consumo de proteínas de fuente vegetal se ha asociado a una menor presión arterial, niveles de colesterol LDL y riesgos cardiovasculares; no obstante, la ingesta de

algunas proteínas de fuente vegetal es incompleta al tener una cantidad menor o nula de algunos aminoácidos esenciales (Quesada y Gómez, 2019).

Lo anterior sugiere que se planteen alternativas de producción y consumo de proteínas que permitan tener un impacto positivo sobre el ambiente y la salud de los consumidores. Dentro de estas, resalta la biomasa de microorganismos que presentan un potencial por su alto aporte de aminoácidos, ácidos grasos y vitaminas, pero el aporte de dichos nutrientes va a depender del microorganismo y las condiciones empleadas para producirlas (Vega, 2020).

La proteína unicelular obtenida a partir de la biomasa microbiana de bacterias, algas, levaduras y hongos filamentosos podría ser una alternativa prometedora; ya que, según Chacón (2004), esta es una opción biotecnológica de viabilidad ambiental y nutricional. Visto desde el eje productivo, estas proteínas presentan grandes tasas de productividad debido al crecimiento exponencial de los microorganismos y no requieren mucho suelo para su crecimiento, pues este se realiza en biorreactores. Por otra parte, desde el eje nutricional, estas proteínas unicelulares cuentan con una composición de aminoácidos adecuada (Torrejón, 2020).

Es relevante también mencionar que, visto desde la perspectiva de viabilidad ambiental, el aprovechamiento y la transformación de subproductos agroindustriales puede ser una estrategia efectiva para la gestión sostenible de residuos y para responder a la creciente demanda de alimentos y fuentes alternativas de proteína tanto para alimento animal como humano (Asiri y Chu, 2022). En este contexto, el SCOBY, una biomasa microbiana generada como subproducto directo del proceso de fermentación de la kombucha, representa una oportunidad valiosa. Este es tradicionalmente descartado; no obstante, contiene un alto porcentaje de celulosa, así

como proteínas y compuestos bioactivos que pueden revalorizarse (das Chagas et al., 2025).

Finalmente, el desarrollo de sistemas integrados de economía circular (waste to protein) ha sido identificado como clave para la sostenibilidad global, al maximizar la valorización de residuos agroindustriales para producir proteínas aptas para consumo humano. Además, constituye una fuerte iniciativa para atacar la crisis de hambre global (Piercy et al., 2022).

La obtención de este tipo de proteínas podría tener una desventaja por el alto contenido de ácidos nucleicos, ya que pueden presentar un riesgo sobre la salud por el aumento en los niveles de ácido úrico en el suero, afectando los riñones (Li et al., 2024). Sin embargo, la evaluación de este tipo de componentes requiere el desarrollo y estandarización de métodos de análisis específicos, por lo que no se incluye como parte de este estudio. A raíz de esto surge la pregunta de investigación: ¿Es viable técnicamente utilizar la biomasa del cultivo simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY) generado en la elaboración de kombucha como una fuente de proteína alternativa para consumo humano?

1.3 Justificación

En la misma línea de lo que se mencionó anteriormente, uno de los principales problemas para el desarrollo sostenible corresponde al hambre y la malnutrición a nivel mundial, lo cual genera distintas enfermedades en las personas, baja productividad y retraso en el crecimiento (ONU, 2023). La seguridad alimentaria juega un papel crucial en la actualidad, pues la población mundial se encuentra en aumento, con lo que surge la necesidad de tener disponibilidad de alimentos inocuos y seguros. Ante esta situación, la industria agroalimentaria tiene grandes retos para producir

alimentos de manera sostenible, que reduzcan el impacto ambiental, que no perjudiquen los recursos naturales y que, a su vez, logren satisfacer las necesidades de las generaciones actuales y futuras (Salazar y Muñoz, 2019).

Como se mencionó en la delimitación del problema, las proteínas juegan un papel fundamental en la nutrición de las personas. Las que se han producido en mayores proporciones son las de origen animal y vegetal; sin embargo, se ha evidenciado que la producción de estas ya no es suficiente para satisfacer la demanda de alimentos.

Una de las alternativas que se ha propuesto por algunos investigadores, es el uso de proteína unicelular obtenida de la biomasa de microorganismos. Esta, en comparación con las tradicionales, presenta tasas de crecimiento eficientes, en terrenos mucho más pequeños (Torrejón, 2020).

Sin embargo, desde el marco experimental se requieren más investigaciones que permitan determinar la viabilidad de obtener este tipo de proteínas, para así poder utilizarlas en la alimentación del ser humano. Por lo tanto, se propone realizar la presente investigación, con el fin de evaluar si la obtención de proteína a partir de la biomasa generada como subproducto en la elaboración de la kombucha es viable técnicamente.

Con la realización del presente proyecto, se espera obtener conocimiento importante en la caracterización proximal de la biomasa microbiana generada en la producción de kombucha (SCOBY) como una fuente de proteína alternativa. Lo anterior, representa un impacto positivo no solo social, sino ambiental y económico, cumpliendo con los tres ejes fundamentales del desarrollo sostenible.

A través de la ejecución del estudio, se pretende apoyar ejes como lo son la producción y el consumo sostenible, la innovación y el uso sostenible de bienes, así

como diferentes objetivos del desarrollo sostenible (ODS), tales como: hambre cero (2), acción por el clima (13), producción y consumo responsables (12), entre otros.

A su vez, la investigación propuesta impacta en diversas áreas estratégicas planteadas por la Vicerrectoría de Investigación y Transferencia de la Universidad Técnica Nacional, específicamente las líneas de investigación propuestas para la carrera de Ingeniería en Tecnología de Alimentos. Principalmente, en el área de aprovechamiento de subproductos de la industria (UTN, 2023), ya que, el SCOBY es un subproducto de la producción de kombucha. Esta biomasa actualmente no es aprovechada de ninguna forma y con el estudio propuesto, el establecer las condiciones de fermentación ideales y la caracterización bromatológica, podría representar un aporte importante como una fuente de proteína alternativa, con sus respectivas características funcionales.

Finalmente, se considera que la investigación propuesta es de gran importancia científica y tecnológica, además de que pretende ser la base para estudios venideros en la línea de proteínas alternativas producidas a partir de biomasa microbiana, sobre todo considerando que, en Costa Rica, no se han encontrado investigaciones publicadas que evalúen el contenido proteico del SCOBY como fuente para alimentación humana, lo que representa una oportunidad para generar conocimiento local y transferible a la industria.

1.4 Antecedentes

En la esta sección se recopiló una serie de investigaciones relacionadas con diferentes temas de interés. Primeramente, se destaca el artículo, desarrollado por Nasser et al. (2011), en el cual se mencionan aspectos vinculados con lo que son las proteínas unicelulares (SCP por sus siglas en inglés). Dentro de los aspectos

generales, los autores destacan la definición, producción, aspectos económicos, aceptabilidad, toxicidad y procesamiento de la proteína para ser utilizada como alimento.

En la misma línea de investigación, se destaca la de Forero et al. (2021), quienes realizaron su trabajo con el objetivo de proporcionar información relacionada con la producción, ventajas y desventajas, procesos fermentativos, microorganismos y sustratos utilizados para obtención de proteína unicelular. Como resultados generales de ambas investigaciones, se obtuvo que las proteínas unicelulares son células secas de los microorganismos y estas son utilizadas como suplemento proteico en la alimentación de humanos y animales por sus grandes beneficios.

En comparación con las proteínas tradicionales, la producción de SCP resulta bastante ventajosa, debido a que estas poseen alto contenido proteico, presentan altas tasas de crecimiento en tiempos relativamente cortos, pueden utilizar una amplia variedad de sustratos para desarrollarse (residuos orgánicos) y no dependen de las condiciones climáticas, haciendo posible el crecimiento en cualquier estación del año (Nasseri et al., 2011; Forero et al., 2021).

Se resalta el trabajo de Zandona et al. (2021), quienes destacaron el suero láctico como un sustrato importante para producir SCP, proporcionando ventajas como disminución en la contaminación por un mal manejo de los residuos lácteos y la posible producción de un producto con gran valor agregado. Asimismo, la obtención de esta proteína puede darse por medio de metodologías que utilicen directamente microorganismos que utilizan la lactosa contenida en el suero o bien, una vez que se hidroliza enzimática o químicamente la lactosa, aplicando microorganismos que no utilizan este carbohidrato.

Con respecto a esto, se destaca el trabajo realizado por Aguirre et al. (2009), el cual se centró en determinar la viabilidad técnica de obtener dos productos diferentes a partir del suero de leche, la proteína liofilizada y la biomasa probiótica, respectivamente. Metodológicamente, los autores plantearon diversos procesos para obtención y ultrafiltración del suero; así como también, el método utilizado para la fermentación de la lactosa, el cual se desarrolló en biorreactores, a temperatura y pH controlado.

Además, se evaluó la viabilidad de la biomasa obtenida a través del método de siembra y cuenta en placas. Dentro de los principales resultados obtenidos, se destaca que sí es viable obtener ambos productos (proteína y biomasa liofilizada) y el método para hacerlo es bastante simple, haciéndolo atractivo por sus bajos costos productivos. Asimismo, se logró obtener concentraciones adecuadas de biomasa probiótica. Finalmente, el proceso de fermentación no resultó complicado, ya que únicamente se requiere controlar la temperatura y el pH (Aguirre et al., 2009).

Otro sustrato que se utiliza ampliamente son los residuos de frutas y vegetales, tal y como se muestra en el artículo de Oshoma et al. (2017), en el que determinaron la conveniencia de utilizar cáscaras de banano para obtener proteína unicelular del microorganismo *Aspergillus niger*, donde la biomasa obtenida y el pH fueron analizados por medio de técnicas estándares durante el proceso de fermentación sumergida. Se estudió el crecimiento de dichos microorganismos en tres medios: cáscara suplementada, cáscara con glucosa y cáscara sin suplementar.

Los resultados obtenidos mostraron que el mayor porcentaje de proteína se obtuvo con las cáscaras suplementadas, por lo que los autores concluyeron que el contenido de biomasa obtenida puede mejorar a través de la adición de suplementos en el medio (Oshoma et al., 2017). Ahora bien, de forma similar, Conejo (2023)

destacó la obtención de proteína unicelular a partir de hongos filamentosos utilizando residuos de piña y banano como sustratos.

La autora menciona que dentro de sus objetivos se encuentra el estudio de la bioconversión de materiales residuales con cepas de tres hongos diferentes, para así analizar la obtención de SCP; de modo que se determinó el potencial de las células para utilizarse como suplemento alimenticio. La metodología del trabajo se basó en inocular por 14 días a 25-30 °C los sustratos de banano, pulpa y cáscara de piña, a un pH de 4-5. Después del proceso fermentativo, los hongos comenzaron a crecer y se sometieron a un secado en horno y una trituración en molinos. Se efectuaron pruebas para caracterizar las fuentes de carbono a través de cromatografías líquidas de alta resolución y la proteína fue cuantificada por el método Kjeldahl (Conejo, 2023).

A partir de los resultados, la autora demostró que la fuente de carbono y cobertura se relaciona directamente con la producción de proteína y, por ende, concluye que es importante implementar métodos que permitan aprovechar desechos y obtener proteínas de microorganismos (Conejo, 2023).

En otro estudio realizado por Palmerín et al. (2011), se evidenció la identificación de una levadura para la producción de proteína unicelular destinada al consumo humano. Se planteó el uso de etanol como fuente de carbono para producir biomasa como una alternativa viable. La levadura *Candida utilis* fue el organismo de interés debido a su capacidad para utilizar diversas fuentes de carbono, incluido el etanol. El estudio buscó determinar los parámetros cinéticos y cuantificar las proteínas de la biomasa producida. En el estudio, se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento en matraces agitados para determinar la concentración óptima de etanol y se ajustaron varios modelos cinéticos a los datos experimentales para determinar los

parámetros cinéticos claves, específicamente en caldo Sabouraud a 30 °C en matraces agitados a 200 rpm.

Se encontró que la concentración óptima de etanol para el crecimiento de *Candida utilis* fue de 16 g/L, con una velocidad máxima de crecimiento específico de 0,99 μ (h⁻¹). La concentración de proteína en la biomasa en seco de *Candida utilis* fue del 52.5 % (Palmerín et al., 2011).

Ahora bien, otro sustrato que podría utilizarse para potencialmente obtener SCP es la kombucha. Actualmente, esta se ha estudiado ampliamente por sus múltiples beneficios, como lo mencionan da Silva et al. (2022), que destacan esta bebida por su importante valor nutricional. En la investigación, mencionan aspectos relacionados con la formulación tradicional, la composición química, usos de sustratos alternativos para obtención de kombucha y los principales efectos sobre la salud. Principalmente, los autores obtuvieron que la composición química de la bebida está ligada a los ingredientes, proporciones y parámetros de fermentación a los que se somete. Asimismo, algunos estudios demostraron que la kombucha presenta una alta actividad antioxidante, así como actividad antimicrobiana, hipoglucemiante, antihipertensiva, entre otros (Silva et al., 2022).

En una línea de investigación similar, se destaca la evaluación de las propiedades de la kombucha en función del tipo de azúcar añadido y el tiempo de fermentación. El documento de Muhialdin et al. (2019) destaca claramente esto, ya que ellos se propusieron como objetivo analizar la composición fisicoquímica y actividad antioxidante del té fermentado. Principalmente, se seleccionaron tres fuentes de azúcar (refinada, de palma de coco y de melaza), las cuales se agregan a té negro a un 10 %, junto con el SCOBY en un 3 % y otro 10 % de kombucha previamente fermentada.

Esta mezcla se incubó por 14 días en la oscuridad a una temperatura de aproximadamente 24 °C; donde, al finalizar el proceso, se determinó el contenido de azúcares y ácidos por cromatografía de alta resolución. Los resultados del estudio mostraron una alta formación de biomasa en el medio en el que se utiliza azúcar refinada (Muhialdin et al., 2019). Esta investigación permite sustentar la definición de concentraciones de azúcar y temperatura para llevar a cabo las fermentaciones.

De forma similar, Morales (2022), en su investigación, propone el uso del mucílago del cacao como fuente de azúcar para mejorar las características de fermentación del SCOBY aplicado en la producción de kombucha. La autora fundamenta su investigación en el hecho de que el mucílago contiene azúcares, pectina y levaduras, que degradan los azúcares presentes en el mucílago, produciendo alcohol.

A través de diferentes pruebas estadísticas y fisicoquímicas, se determinó que el reemplazo del 20 % del azúcar con el mucílago de cacao representa la mejor formulación, en donde las características propias de la bebida se ven beneficiadas. Cabe destacar que el tiempo de fermentación empleado es de 7 días y el té negro es el que ofrece a nivel de aceptabilidad del producto final las mejores propiedades (Morales, 2022).

Seguidamente, se destaca la investigación planteada por Jayabalan et al. (2010), quienes estudiaron las características bioquímicas a través del análisis proximal del SCOBY producido durante la fermentación de Kombucha; donde, dependiendo del tiempo de fermentación, se obtuvo como resultado aumentos en algunos componentes.

El estudio se realizó a los 7, 14 y 21 días de fermentación. Los resultados obtenidos muestran que la proteína en materia seca aumentó de 121,5 g/kg en el día

7 a 231,1 g/kg en el día 21; la fibra cruda, de 63,3 g/kg a 147,9 g/kg; y los lípidos crudos, de 18,1 g/kg a 54,3 g/kg. Además, se logró determinar que todos los componentes presentes como minerales, aminoácidos tanto esenciales como no esenciales, aumentaron con el paso de los días de la fermentación (Jayabalan et al., 2010). Esta investigación respalda la selección de tiempos de fermentación que se tomó como base para el trabajo final de graduación.

De forma similar, en el estudio realizado por Vargas (2011), se estudiaron los efectos del uso de diferentes sustratos, en la variación de sólidos solubles y pH a lo largo del tiempo de fermentación. Se tomaron medidas desde 0 hasta 209 horas bajo condiciones ambientales específicas. Los resultados muestran que, a las 209 horas de fermentación, los valores de pH estaban entre 3,62 y 3,35, lo que se consideró óptimo para el estudio.

Además, se observó una disminución de los sólidos solubles, especialmente en tratamientos con miel de abeja, mientras que los tratamientos con sacarosa y té mostraron una menor disminución. Se registró un aumento de la acidez con el tiempo, especialmente en tratamientos con miel, y se evaluaron características sensoriales como sabor, olor, acidez y dulzor. Finalmente, los análisis estadísticos determinaron que los tratamientos con sacarosa y té fueron los más aceptables en términos sensoriales y fisicoquímicos (Vargas, 2011).

Finalmente, sintetizando todas las investigaciones seleccionadas, se puede concluir que existe gran variedad de estudios que muestran la obtención de proteínas unicelulares a partir de diversos sustratos. Además, se evidencian diferentes estudios que permiten determinar la composición tanto de la kombucha como del SCOBY en diferentes condiciones, proporcionando información importante para seleccionar parámetros fermentativos y concentraciones óptimas de azúcar.

Solo se logró encontrar un documento desarrollado en Costa Rica, en el que se demuestra la obtención de SCP a partir de residuos de piña y banano. Asimismo, no se encontraron trabajos relacionados directamente con la obtención de proteína unicelular a partir de la kombucha, por lo que resulta crucial la realización del presente estudio, de modo que se logre ampliar los conocimientos sobre el tema desde el marco nacional.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Evaluar la viabilidad técnica de la utilización de la biomasa generada como subproducto de la elaboración de kombucha como fuente de proteína microbiana para consumo humano, mediante análisis del efecto del tiempo de fermentación y concentración de azúcar del sustrato en su composición química y tasa de crecimiento.

1.5.2 Objetivos específicos

1.5.2.1 Establecer las condiciones de fermentación para la obtención de la biomasa microbiana (cultivo simbiótico de bacterias y levaduras) mediante pruebas preliminares y ensayos fisicoquímicos.

1.5.2.2 Investigar el efecto de distintos tiempos de fermentación sobre la composición bromatológica y tasa de crecimiento de la biomasa generada como subproducto de la elaboración de kombucha, por medio de ensayos de composición química proximal.

1.5.2.3 Analizar el efecto de distintas concentraciones de azúcar del sustrato sobre la composición bromatológica y tasa de crecimiento de la biomasa (SCOBY) generada como subproducto de la elaboración de kombucha, por medio de ensayos de composición química proximal.

II. MARCO TEÓRICO

En la siguiente sección, se incluyen conceptos y definiciones de diferentes temas y subtemas relacionados directamente con la investigación, por lo que se analizan diferentes investigaciones que permiten sustentar el presente trabajo investigativo.

2.1 Proteínas

2.1.1 Generalidades

Las proteínas están formadas por distintos aminoácidos, los cuales se forman de un grupo α -carboxilo con un grupo α -amino junto a un grupo R. Estas uniones de aminoácidos poseen la información para formar una molécula de proteína específica. Las características de cada aminoácido están determinadas por la diferencia del grupo R (López y Mohiuddin, 2024).

En las proteínas pueden encontrarse 22 aminoácidos, pero sólo 20 de estos se encuentran especificados por el código genético universal. Desde el ámbito nutricional, los aminoácidos se dividen en tres grupos, esenciales, no esenciales y semiesenciales. Los primeros no pueden ser sintetizados por los humanos u otras células; dentro de este grupo destacan: histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina. Todos deben ingerirse de fuentes alimenticias (Ahern et al., 2018; López y Mohiuddin, 2024).

Los aminoácidos no esenciales son aquellos que sí pueden ser sintetizados por las células de los organismos y, dentro de ellos, se encuentran once en total: alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, prolina, serina y tirosina. Sin embargo, algunos de estos pueden ser considerados semiesenciales en situaciones de estrés o enfermedad, en donde el organismo no puede sintetizarlos (Ahern et al., 2018; López y Mohiuddin, 2024).

Estructuralmente, las proteínas contienen carbono (50-55 %), oxígeno (20-23 %), nitrógeno (12-19 %), hidrógeno (6-7 %) y, en menor proporción, azufre, fósforo, hierro, zinc o cobre (López, 2014). Además, representan uno de los macronutrientes más importantes para el organismo de los seres vivos, ya que, a pesar de que no proporcionan la mayor cantidad de energía, son responsables de llevar a cabo diversas funciones y, se encuentran dentro de todos los tejidos (Corsetti et al., 2024).

Algunas de las funciones de las proteínas incluyen la reparación, el crecimiento celular, el mantenimiento y la regeneración de tejidos, la reparación de daños en el ADN, su participación como componentes celulares y de membranas. También favorecen la formación de nuevas estructuras, intervienen en la división celular, contribuyen a la homeostasis, actúan como factores de transcripción y elementos del citoesqueleto, regulan la señalización celular (Alberts, 2015, citado por Salazar et al., 2025).

Dicho esto, se observa que estos nutrientes son importantes para el buen funcionamiento del organismo de los seres vivos. Por esto, es crucial que dentro de la dieta de los humanos se ingieran en las cantidades diarias requeridas. Asimismo, es necesario una ingesta de proteínas de calidad que permitan al organismo realizar las funciones vitales. En términos generales, esta calidad proteica depende de la fuente de obtención de la que provenga el nutriente.

Específicamente, para que una proteína pueda ser considerada de alta calidad nutricional debe cumplir con dos requisitos: que tenga los niveles adecuados de aminoácidos para apoyar el crecimiento y desarrollo, y que tenga alta disponibilidad y digestibilidad. A través de los años, se han desarrollado diversos métodos para determinar la calidad nutricional de estos macronutrientes. Actualmente, la puntuación utilizada es la propuesta por la FAO, la cual consiste en comparar el contenido de

aminoácidos indispensables de la proteína en estudio con una proteína de referencia, en donde se obtiene un valor y, con esto, se puede determinar el aminoácido limitante. Muchas veces, la digestibilidad de las proteínas suele ser estudiada con base en el nitrógeno encontrado en el material fecal (Hertzler et al., 2020).

Por ello, a lo largo de los años se han estudiado diversos alimentos que contienen proteína con una alta calidad nutricional. A través de estos estudios, se ha observado que las proteínas no solo tienen funciones dentro de los organismos, sino que también, tienen funciones dentro de los alimentos, ya que estas les proporcionan características como la capacidad de formar y estabilizar emulsiones o espumas, y generan una diferenciación notoria entre los que las contienen y los que no las contienen. También, estos nutrientes resaltan por sus características hidrodinámicas que les permite tener propiedades sensoriales de gelificación, textura y moldeo (Malecki et al., 2021).

2.1.2 Principales fuentes

Las proteínas son nutrientes esenciales y estas forman parte de la estructura de gran variedad de alimentos. Básicamente, sus propiedades tanto nutricionales como tecnológicas van a depender de la fuente de obtención (Loveday, 2019). Por lo que, a continuación, se exponen las diversas fuentes de las que se pueden obtener.

2.1.2.1 Fuentes convencionales. Las fuentes tradicionales de proteína son de origen animal, las cuales han sido consumidas desde años atrás por su alto contenido nutricional, lo que se relaciona con el contenido de aminoácidos, digestibilidad y capacidad de transporte de otros nutrientes. Además, este tipo de proteínas se caracteriza por sus propiedades tecnológicas (gelificación, emulsificación y espuma), y generan así los atributos sensoriales que las diferencian (Day et al., 2022).

Los principales alimentos de origen animal que tienen alto contenido proteico son la leche y sus derivados, carne de res, huevo y algunos mariscos (Day et al., 2022).

En la leche, el contenido de proteína varía según el animal del que se obtiene. Por su parte, la leche de oveja lidera en cuanto a contenido de proteína con 5,5 %; seguidamente, se encuentra la leche de búfala con un porcentaje de proteína de 4,4 a 5,1; la de camella, 3,9; ganado vacuno, 3,4; cabra, 2,9; yegua, 2,5; y, por último, se encuentra la leche de burra con 2 % de proteína (Fox et al., 2015, citado por Landi et al., 2021).

Las proteínas de la leche pueden estar divididas en dos grupos: caseínas y proteínas del suero. En la mayoría de las especies, las caseínas que forman parte de su composición son α 1-caseína, α 2-caseína, β -caseína y κ -caseína. La leche de vaca se compone principalmente de β -caseína (30 %) y, dependiendo de la genética del animal estas pueden ser A1 o A2. Estas proteínas se presentan en micelas dentro de la leche, lo cual permite proporcionar las proteínas, calcio y fósforo a los terneros. Además, esta asociación entre minerales y proteínas es lo que le da la capacidad de producir diversos productos (yogures y quesos). Por ello, muchos avances

tecnológicos han permitido obtener diversos productos con base en esta propiedad funcional (Barbosa et al., 2019; Day et al., 2022).

Otra fuente importante es la carne muscular, que puede contener en promedio un 20 % de proteína (Monda et al., 2017, citado por di Corcia et al., 2022). La carne contiene todos los aminoácidos esenciales. Asimismo, este tipo de proteína contiene vitaminas como B2, B6, B12, ácido pantoténico y niacina, y minerales como fósforo, zinc, hierro y selenio (di Corcia et al., 2022). Adicionalmente, Ahmad et al. (2024), mencionan que el colágeno es una proteína disponible en la piel y huesos de los animales, y proporciona beneficios en la estructura y estabilidad de órganos y tejidos.

Por otro lado, se encuentran los mariscos que, según Song et al. (2025), son una buena fuente de aminoácidos. Pueden contener más de 50 % de proteína de su peso seco y hasta 50 g de aminoácidos esenciales por cada 100 g de proteína. Los músculos comestibles de estos animales pueden contener entre 16-21 % de proteína y, además, son una buena fuente de minerales y vitaminas. En comparación con otras proteínas de origen animal, estas son más fáciles de digerir, porque contienen menor cantidad de tejido conectivo (Karuppasamy et al., 2015; Day et al., 2022).

Finalmente, se encuentra el huevo, que se reconoce como un alimento de alto contenido proteico, donde el contenido puede rondar el 12 % del peso total. Además, este nutriente resalta por tener una alta calidad nutricional, excelente digestibilidad y contenido de todos los aminoácidos esenciales. El huevo se divide en tres partes: cáscara, clara y yema, respectivamente; donde la clara resalta como la parte con mayor contenido de proteína. Las principales proteínas son la ovoalbúmina, que constituye el 54 % del albumen (clara del huevo) y, en menor proporción, ovotransferrina, ovomucoide, ovomucina y lisozima. Por otra parte, está la yema, que contiene aproximadamente 23 % de proteína (Guha et al., 2018; Day et al., 2022).

Visto lo anterior, se puede decir que estas proteínas generalmente contienen el perfil de aminoácidos esenciales que requieren los organismos vivos y, además, cuentan con una alta digestibilidad. Por lo cual, estas se han consumido en grandes proporciones a través de los años. Sin embargo, muchos estudios muestran que estas fuentes proteicas se asocian a riesgos tanto de salud como medioambientales.

En cuanto a esto, se observa que existen algunas enfermedades que se han asociado con la ingesta de proteínas de origen animal, como lo son obesidad, enfermedad cardiovascular, diabetes y ciertos tipos de cáncer e inflamación. Por lo que, en años recientes, se ha observado que algunas personas son más conscientes del tipo de proteínas que ingieren, por lo cual han disminuido su consumo o las han cambiado por otras completamente (Elmadfa y Meyer, 2017).

Además, la producción de estas fuentes tradicionales requiere grandes cantidades de recursos como terreno, agua y energía, lo cual provoca que haya una sobreutilización de recursos. También, estas proteínas se han asociado con contaminación ambiental, debido al alto grado de gases de efecto invernadero que se producen (Ritchie et al., 2017). Por lo tanto, es necesaria la producción de fuentes proteicas que permitan tener un menor impacto tanto en la salud como en el ambiente.

2.1.2.2. Fuentes alternativas. Como se mencionó, la producción de proteínas de fuente animal se ha asociado a grandes riesgos socioambientales, lo cual imposibilita el desarrollo sostenible a largo plazo, por lo que es necesaria la búsqueda de opciones más sostenibles que tomen en consideración las tres dimensiones del desarrollo (ambiental, social y económico). Es por esto que investigadores proponen producir a gran escala proteínas de fuentes alternativas que permitan mitigar los problemas recurrentes asociados con las de origen tradicional.

Las proteínas alternativas se caracterizan por ser productos obtenidos a partir de fuentes distintas a aquellas de origen animal (Nario y Albaladejo, 2021). Dentro de este grupo, se incluyen diversas fuentes de las que se puede obtener proteínas, tales como fuente vegetal, insectos, hongos, carne cultivada y fuente microbiana. Las primeras son obtenidas a partir de plantas o vegetales y suelen contener proteína, grasa, vitaminas, minerales y agua. Algunas fuentes de obtención son diversas leguminosas, semillas, nueces, cereales, frutas y vegetales (Flores, 2022).

Dependiendo de la fuente, la cantidad de proteína varía. Por ejemplo, los cereales pueden contener entre 7 y 15 % de proteína, mientras que la soya resalta por su contenido de 35 - 40 %, además de que su perfil de aminoácidos esenciales es bastante balanceado, lo que ha permitido que estas se utilicen como alternativa a productos cárnicos y lácteos. En lo que respecta a las leguminosas, estas pueden contener hasta un 36 % de proteínas, pero la calidad de estas es menor que aquellas de origen animal. No obstante, a partir de estas pueden producirse harinas, concentrados y aislados de proteínas con contenidos entre 85-95 % (Day et al., 2022).

Asimismo, se han creado diversas imitaciones de productos como *nuggets*, hamburguesas, leche análoga, y otros; sin embargo, su producción tiene grandes desafíos por la textura, sabor y color que otorgan en comparación a los de origen

animal. También, estas presentan desventajas productivas, porque al igual que las de origen animal, requieren grandes recursos como suelo y agua; por lo que su producción presenta retos visibles que no se asocian con un futuro de sostenibilidad ambiental (Nario y Albaladejo, 2021; Flores, 2022).

Otra fuente importante son los hongos comestibles que contienen un alto valor nutricional, donde el peso en seco aproximadamente es de 10 - 30 % de proteína. El contenido de aminoácidos puede variar entre 34 - 47 % y son una excelente fuente de vitaminas, por lo que se han estudiado con amplitud para utilizarlos como alternativa a los de origen animal (Cerón et al., 2020).

Por otra parte, se encuentran las macro y microalgas que han sido consumidas ampliamente en el medio oriente. Las microalgas contienen porcentajes de proteínas entre 6 - 70 % del peso seco y representan una alternativa sostenible de fuente proteica. No obstante, el color, olor y costos de producción de estas impide que se utilicen en productos alimenticios (Day et al., 2022).

También, se ha evidenciado el consumo de insectos en países asiáticos, ya que, en comparación a fuentes convencionales de proteína, estos requieren de menor cantidad de recursos (agua, alimento, tierra) y la producción de gases de efecto invernadero es inferior (Nario y Albaladejo, 2021). Aproximadamente, 2000 millones de personas consumen esta fuente alimenticia, debido a sus grandes beneficios nutricionales, donde se ha reportado un contenido entre 19-24 % de proteína. En países de occidente, el consumo de estos es más limitado; sin embargo, tiene gran potencial para utilizarse como proteína procesada (Day et al., 2022).

Al igual que las proteínas de microalgas y hongos, los insectos representan una alternativa para mitigar la problemática ambiental; no obstante, estos tres presentan retos tanto productivos como de consumo (Yimam et al., 2024). Por ello,

se hace necesaria la búsqueda de técnicas que permitan ofrecer productos de calidad sensorial, de modo que las personas puedan consumirlos sin ir predispuestas por los sabores, olores y colores que estos presentan, ya que su impacto ambiental es bastante bajo en comparación con fuentes tradicionales.

Otra fuente alternativa es la carne cultivada, que se caracteriza por ser tejido muscular obtenido a través de biotecnología de cultivo de tejidos animales. Estas proteínas son cultivadas en un laboratorio a partir de células animales sin necesidad de sacrificarlos, donde su producción requiere tomar una biopsia de células, colocarlas en el banco de células, crecimiento, recolección y procesamiento del alimento (Benson y Greene, 2023).

La proliferación de las células se da dentro de biorreactores, por lo que no requiere de gran uso de recursos. Además, se puede utilizar tecnología 3D para obtener diversos productos como hamburguesas, filetes, mariscos, cortes de salmón y salchichas (Nario y Albaladejo, 2021; Flores, 2022). Su uso presenta un gran potencial como alternativa de producción; sin embargo, estas siguen en etapa de desarrollo. A pesar de estas ventajas, la carne de laboratorio se asocia con costos productivos bastante elevados, por lo que, al comercializarse, no podrían ser accesibles para todas las poblaciones, lo cual dejaría de lado el cumplimiento de la seguridad alimentaria y el objetivo 2 del desarrollo sostenible.

Finalmente, se encuentran las proteínas de origen microbiano que, según Nario y Albaladejo (2021), se obtienen a partir de procesos fermentativos; los cuales pueden dividirse en fermentaciones tradicionales y fermentación de biomasa. La primera se basa en transformar un alimento a través de acción de microorganismos anaerobios; por ejemplo, para obtener cerveza, yogurt, kimchi y queso. Mientras que la segunda, se basa en utilizar el crecimiento exponencial de microorganismos para producir

alimentos con alto porcentaje proteico (Nario y Albaladejo, 2021). Muchos de los productos obtenidos a partir de esta tecnología pueden ser consumidos como productos terminados o utilizados como aditivos. En el siguiente apartado de la investigación, se explica con mayor detalle en qué consiste este tipo de proteínas.

2.1.3. Proteínas de origen microbiano

2.1.3.1 Breve reseña. Las proteínas de origen microbiano, conocidas como proteínas unicelulares o single-cell protein (SCP), son células microbianas o proteínas aisladas de un cultivo puro de microorganismos, las cuales pueden ser utilizadas como un suplemento alimenticio en dietas de humanos y/o animales. En humanos, actúan como portadores de vitaminas y aroma, mientras que, en animales, pueden ser para engorde de aves, terneros, cerdos y pescados. Otras aplicaciones son en la industria del cuero y papel (Kumari, 2020; Raziq et al., 2020).

La producción de este tipo de proteína se remonta a aproximadamente hace más de 100 años; sin embargo, se comenzó a producir a gran escala en Alemania, a partir de la Primera Guerra Mundial. Esto se dio por la escasez de alimentos y, por ende, de proteínas convencionales, por lo que las sustituyeron produciendo levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en un medio de melaza aireado con suplementación de sales de amonio (Upadhyaya et al., 2016; Ugbogu y Ugbogu, 2016).

En la Segunda Guerra Mundial, se comenzó la producción de levaduras aerobias, específicamente la *Candida utilis*, utilizando como sustrato licor de sulfito procedente de papeles usados. En 1966, Carol L. Wilson determina estas proteínas como unicelulares (*single-cell proteins*); un año después, estas proteínas comenzaron a producirse industrialmente. En la actualidad, se evidencian diversos desarrollos

tecnológicos para lograr un cultivo masivo utilizando diversos medios de crecimiento (Upadhyaya et al., 2016; Ugbogu y Ugbogu, 2016).

Para la producción de estos microorganismos, se debe tener en consideración el proceso biotecnológico que se seguirá, por lo cual se selecciona en función de factores como: requerimientos de oxígeno y generaciones de calor, carácter de espuma, tasa de crecimiento, productividad y rendimiento de los sustratos utilizados, tolerancia a temperatura, pH y estabilidad genética, composición y estructura del producto final (Bajic et al., 2022).

Diversos autores destacan que, además de su alto contenido proteico (60 - 80 % del peso seco de la célula), también pueden contener lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, vitaminas y minerales. Presentan aminoácidos esenciales en grandes cantidades como lo son la metionina y lisina, que suelen ser limitados en los alimentos de origen vegetal y animal (Kumari, 2020; Raziq et al., 2020; Sharif et al., 2021).

Además, en algunos estudios se muestra que, dependiendo del sustrato y el tipo de microorganismo utilizado, puede llegarse a obtener un perfil de aminoácidos esenciales completo, con proteínas similares a la del pescado y soya. También, estas suelen presentar alto contenido de vitamina A y del complejo B (Sharif et al., 2021).

En cuanto al crecimiento de estas, se sabe que los microorganismos crecen exponencialmente, por lo que las tasas de crecimiento son relativamente altas y proporcionan gran cantidad de biomasa en tiempos cortos. Dentro de los más utilizados se encuentran las microalgas con las producciones más altas (30-80 % p/p), seguidas por las bacterias (30-80 % p/p), las levaduras (30-50 % p/p) y, finalmente, las protistas (10-20 % p/p) (Sharif et al., 2021; Bajic et al., 2022). Su obtención puede darse por medio de diversos métodos, los cuales se destacan a continuación.

2.1.3.2 Principales procesos para obtención de proteína microbiana. La proteína unicelular se obtiene principalmente por medio de la utilización de residuos, donde los microorganismos, a partir de estos, aumentan su biomasa, que se compone de SCP. Algunos materiales residuales que pueden ser utilizados son residuos agrícolas como aserrín, maíz, madera, alimentos, hidrocarburos y residuos generados en la producción de alcohol (Srividya et al., 2014; Sharif et al., 2021).

En general, el proceso productivo a partir de cualquier microorganismo y sustrato es la provisión de una fuente adecuada de carbono, así como la adición de carbono, fósforo, nitrógeno y otros nutrientes. En todos los procesos, debe haber higiene o esterilidad de la zona para evitar cualquier tipo de contaminación del medio. El primer paso para su obtención consiste en preparar un medio de cultivo adecuado, que puede ser sumergido, semisólido o sólido (Raziq et al., 2020; Abedfar et al., 2025).

Algunas veces, la fuente de carbono principal tendrá que someterse a hidrólisis física o química antes de mezclarse con los otros nutrientes como nitrógeno, fósforo, entre otros. La segunda etapa es la fermentación que puede ser del tipo sumergida, semisólida y sólida. En la primera de estas, el sustrato siempre permanece líquido y contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento. El producto se va recolectando del fermentador a través de diversas técnicas. Este proceso requiere de aireación por la generación de calor, el cual se elimina con un dispositivo de enfriamiento. La biomasa obtenida se separa utilizando diversos métodos como filtración o centrifugación (Raziq et al., 2020; Abedfar et al., 2025).

En la semisólida, el sustrato suele estar en estado sólido y el proceso de cultivo consta de varias operaciones como la agitación y mezcla, transporte de oxígeno y eliminación del calor. Se utiliza un fermentador de bucle en forma de U y la fuente de

carbono puede ser: metanol, etanol, hidrocarburos, monóxido de carbono, melazas, polisacáridos, entre otros. La fermentación sólida consiste en la utilización de un salvado de trigo o arroz después de la siembra con microorganismos. El sustrato se mantiene a temperatura controlada durante varios días (Raziq et al., 2020).

El tercer proceso por ejecutar es la separación y recolección en donde la biomasa puede someterse a diversos procesos adicionales como lavado, disrupción celular, extracción y purificación de proteínas. También puede haber etapas de preconcentración para el caso de fermentación sumergida con el objetivo de facilitar la deshidratación del producto, lo cual puede ser ejecutado mediante centrifugación, calentamiento, filtración, entre otros. Finalmente, la SCP es pulverizada para permitir un manejo adecuado posterior (Bajic et al., 2022).

2.1.3.3 Principales sustratos utilizados. La producción de las proteínas depende directamente del tipo de sustrato que se utilice y la composición del medio de cultivo. Las SCP de la biomasa pueden producirse utilizando diversos sustratos que deben de cumplir con ciertos requerimientos como no ser tóxicos, ser abundantes, regenerables, no exóticos, económicos, contener carbohidratos y nutrientes, y tener capacidad de soportar crecimientos rápidos (Thiviya et al., 2022).

Por lo general, se dividen en recursos de alta energía como gas natural, etanol, gasóleo, metano, n-alcanos (hidrocarburos) y ácido acético, recursos renovables de fuente vegetal como azúcar, almidón y celulosa, desechos como licor residual, melaza, suero de leche, desechos de frutas. A su vez, puede obtenerse a partir de dióxido de carbono o también de desechos agrícolas (Bajic et al., 2022).

Estos últimos son unos de los más importantes, porque presentan bajos costos, son abundantes, no tóxicos y renovables. La proteína obtenida presenta una alta calidad nutricional, además de que ciertas especies de microorganismos pueden

fácilmente crecer en este sustrato. Los residuos que pueden utilizarse son prácticamente todas aquellas fuentes de carbono como aguas residuales, gases industriales, melazas, residuos vinícolas, desechos lácteos, residuos y bagazos de frutas, excreción de animales y otros (Chacón, 2004; Raziq et al., 2020).

De la mano de esto, se menciona que cada residuo va a requerir un microorganismo y unas condiciones diferentes. Por ejemplo, las melazas son un subproducto obtenido después de la cristalización del azúcar de caña o de remolacha y contiene aproximadamente 45-55 % de azúcar; lo cual la convierte en un sustrato ideal para el crecimiento de microorganismos. Mientras que desechos lácteos, como el suero, pueden ser aprovechados para producir SCP a partir de *Candida utilis*, *Kluyveromyces marxianus* y *Kluyveromyces fragilis*, lo cual permite disminuir la problemática ambiental con la que se asocian (Chacón 2004; Raziq et al. 2020).

2.1.3.4 Ventajas y desventajas. La utilización de microorganismos para la obtención de proteína puede resultar beneficiosa, ya que esta podría ser utilizada como alimentación tanto para animales como para humanos. Por ejemplo, según Buttle et al. (2024), los valores de masa ganada y tasa de crecimiento, así como el incremento de aminoácidos en peces, aumentaron cuando se les suplementó con proteínas unicelulares. Además, estas tienen un gran potencial para ser utilizadas como fuente alternativa, pues, además de contener porcentajes altos de proteínas, contienen también minerales y vitaminas (Kumari, 2020).

Asimismo, la producción de este tipo de proteínas, en contraste con las de origen animal y vegetal, presentan ventajas socioeconómicas como lo son los mínimos requerimientos de tierra y agua, en concordancia con la economía circular. También, la habilidad de este tipo de microorganismos para asimilar diversas fuentes de carbono como sustrato, incluyendo desechos agroindustriales (Sekoai et al., 2024).

A diferencia de las proteínas obtenidas de animales y plantas, la proteína unicelular no depende de las condiciones climáticas ni del terreno (Hülßen et al., 2018; Tian et al., 2023). Presenta un elevado contenido de proteína, una producción muy rápida y una gran eficiencia (Kieliszek et al., 2017; Tian et al., 2023).

La eficiencia en la conversión de alimento a carne es muy baja, debido a que se requiere una gran cantidad de alimento para obtener este producto. Callejas et al. (2017) mencionan que para producir 1,41 kg de carne se requiere 24,48 kg de alimento. Mientras que las levaduras presentan mayor eficiencia. Lapeña et al. (2020) comentan que algunas levaduras por 1 g de azúcar pueden producir hasta 0,9 g de células y 0,5 g de proteína. No obstante, a pesar de los múltiples beneficios y ventajas que tiene la producción de proteína unicelular, se evidencia que existen aspectos negativos que se relacionan con las SCP.

Primeramente, investigadores evidencian que las proteínas podrían contener sustancias tóxicas previamente absorbidas por los sustratos o bien producidas por los mismos microorganismos. Por ejemplo, los ácidos nucleicos producidos podrían ser riesgosos, pues una ingesta excesiva de estos provoca un aumento de los niveles séricos, lo cual puede contribuir a la afección hiperuricemia, que a su vez está asociada a daño renal con el tiempo. Su contenido, sin embargo, puede reducirse mediante algunos tratamientos adicionales, tales como purificación, ruptura celular y extracción de proteínas (Li, et al., 2024).

A su vez, la ingesta de estas proteínas podría provocar algún tipo de indigestión o reacción alérgica por la presencia de las paredes celulares, las cuales los humanos no logran digerir del todo o lo hacen, pero muy lentamente (Srividya et al., 2014). Por eso, se requerirían estudios y pruebas que garanticen que su ingesta es segura.

2.2 Kombucha

2.2.1 Breve reseña de la kombucha

La kombucha es una bebida que resulta de la fermentación de té, agua y azúcar, gracias a un cultivo simbiótico de bacterias y levaduras llamado SCOBY (Loor, 2022). El término kombucha explica su origen, debido a que la palabra “kombu” se deriva del japonés y significa alga, mientras que “cha” hace referencia a té (Almeida y Sevilla, 2023).

Esta bebida fue descubierta 220 años antes de Cristo, en un pueblo llamado Manchuria en el noreste de China; fue utilizada por la dinastía Tsin por sus propiedades desintoxicantes y su alto aporte de energía. En el año 414, un doctor llevó la kombucha a Japón con el fin de curar problemas digestivos en el emperador Inkyo (Loor, 2022).

A finales del siglo XIX, la kombucha era poco conocida fuera del continente asiático. Sin embargo, a inicios del siglo XX, comenzó a popularizarse en Rusia bajo el nombre de “té kvass”. Posteriormente, la bebida se extendió por Europa y otras partes del mundo, adquiriendo nombres como “té de hongos manchurianos”, “hongos del té”, “hongo del té indio”, “té Kargasok”, “cerveza de té”, entre otros. El consumo de esta bebida fue común en zonas rurales, donde se producían de forma artesanal (Almeida et al., 2025).

Con el paso del tiempo, la kombucha se popularizó en Europa del Este y Alemania, por sus beneficios para la salud y sus propiedades sensoriales agradables. Finalmente, a finales del siglo XX, la kombucha se introdujo en Estados Unidos por sus beneficios para la salud (Almeida et al., 2025). Actualmente, se consume esta bebida en muchos países alrededor del mundo.

El consumo de esta bebida se expandió y se popularizó por tantos países, debido a los múltiples beneficios que promete, especialmente por sus propiedades medicinales, como efectos anticancerígenos, antimicrobianos, antidiabéticos, antioxidantes. Además, ha tenido un impacto positivo en afecciones del tracto digestivo y la mejora inmunológica (Almeida y Sevilla, 2023). Actualmente, existe un amplio mercado de kombucha, con una amplia variedad de sabores y presentaciones.

Su producción se genera desde el nivel artesanal, hasta escala a nivel comercial. Kombucha Brewers International (KBI) corresponde a una organización sin fines de lucro, de empresas que producen kombucha a nivel comercial. Esta organización global está compuesta en su mayoría por empresas productoras de kombucha ubicadas en América del Norte. En Estados Unidos, se encuentran 134 empresas y en Canadá, 28. Por otra parte, en el continente europeo se encuentran empresas involucradas del Reino Unido y España (Kapp y Sumner, 2019; Antolak et al., 2021).

Diversas investigaciones apuntan al efecto del consumo de kombucha similar al efecto que tiene en la salud el consumo de yogurt, destacando su aporte de vitaminas de C y B, ácidos como el acético, láctico, glucónico y glucurónico. Lo anterior posiciona la bebida como un alimento funcional (Morales, 2014).

Debido a sus propiedades funcionales, se presentan más de 200 tipos de esta bebida. Se estima que en el año 2019 su valor del mercado mundial rondaba los 1 670 millones de dólares, mientras que para 2020 aumentó un 32 %, por lo cual se considera que el mercado va a seguir creciendo con el pasar de los años (Antolak et al., 2021).

2.2.2 Proceso

El proceso para la elaboración de kombucha inicia al hacer la infusión de té. Se prepara con agua hirviendo, a la cual se le agregan de 0,5 a 0,7 % de hojas de té. Se deja la infusión a una temperatura de 70 a 95 °C y seguidamente se retiran las hojas mediante una filtración. Al té resultante se le agrega de 5 a 20 % de sucralosa. La infusión se debe enfriar a 20 °C para introducir el cultivo simbiótico (SCOBY). Por último, procede la fermentación, la cual se logra en presencia de oxígeno, en condiciones aeróbicas. La temperatura puede variar según el tipo de SCOBY, entre los 18 a 30 °C, en un tiempo de 6 a 14 días (Antolak et al., 2021).

Algunos factores son críticos a la hora de elaborar kombucha. Por ejemplo, la temperatura está directamente relacionada con el proceso fermentativo. En la literatura, se recomiendan diversos valores, en donde la mayoría se encuentran dentro de un rango de 20 - 30 °C. Este parámetro influye sobre otras variables, como lo son el pH, acidez, contenido de alcohol y sólidos solubles. Adicionalmente, la calidad del agua presenta un impacto importante en la obtención de compuestos bioactivos y las actividades antioxidantes (Antolak et al., 2021; Nyhan et al., 2022).

Para lograr obtener el té de kombucha, se debe proporcionar el ambiente adecuado para el crecimiento de los microorganismos. Autores como Saadah et al. (2025) mencionan que, además de la temperatura, la luz solar directa puede afectar el proceso fermentativo. Por ello, se recomienda que el lugar ideal para llevar a cabo la fermentación sea uno en el que la luz sea baja o nula (Lemus, 2023).

El sustrato del SCOBY de la kombucha debe estar conformado por una fuente de nitrógeno, que en este caso corresponde al extracto de té, y una fuente de carbono. La más utilizada es la sacarosa; sin embargo, se pueden utilizar otras fuentes de

carbono como glucosa, fructosa, etanol y manitol (Yim et al., 2017, citados por Ojo y Smidt, 2023).

Por consiguiente, el tipo de té que se utilice va a estar directamente relacionado con el sabor de la kombucha. Zhang et al. (2021a) mencionan que se pueden obtener diferentes perfiles de sabores en la kombucha según el sustrato que se utilice. Generalmente, se utiliza té negro o té verde; no obstante, se puede usar crisantemo, té blanco, madre selva o menta, logrando aromas florales, frutales, refrescantes y mentolados.

2.2.3 Composición de la kombucha

En la kombucha, se encuentra gran cantidad de compuestos, algunos provenientes del té como lo son polisacáridos, vitaminas, compuestos fenólicos, minerales y aminoácidos, y otros provenientes de la fermentación, como es el caso de polifenoles, vitaminas, enzimas, ácidos orgánicos y proteínas (Antolak et al., 2021). La kombucha tiene la particularidad de que se crea un ambiente antimicrobiano que evita la contaminación de bacterias patógenas, gracias a los compuestos orgánicos, como ácido acético, láctico, málico, glicólico, tartárico y cítrico (Coelho et al., 2020; Loo., 2022).

En la bebida, prevalecen compuestos fenólicos, aminoácidos, carbohidratos, ácidos orgánicos, vitaminas y bacteriocinas. Entre los compuestos fenólicos más relevantes se encuentran las catequinas, flavonoides y ácidos fenólicos. También se generan nuevos compuestos en la fermentación, como teaflavinas y las tearubiginas. Los carbohidratos y aminoácidos intervienen en la fermentación y se relacionan directamente con las propiedades benéficas de la kombucha a la salud. Las vitaminas, especialmente la vitamina C, aumentan con la fermentación y pueden tener

propiedades antioxidantes en las personas. Las bacteriocinas, que se producen principalmente por bacterias del ácido láctico, tienen efectos antimicrobianos y pueden ser beneficiosas para la salud. Por último, los ácidos orgánicos, como el ácido acético, láctico, glucónico y glucurónico, presentes en la kombucha, pueden aumentar durante la fermentación (Antolak et al., 2021).

2.2.4 Generación de la biomasa

El término SCOBY deriva del acrónimo formado por las siglas en inglés “*symbiotic culture of bacteria and yeast*”. Este cultivo simbiótico es el responsable de realizar la fermentación en la kombucha (Loor, 2022). Las bacterias y levaduras se alimentan del azúcar añadido. Por esta condición y diferentes parámetros de fermentación que se establecen se puede llevar a cabo este producto. El agrupamiento de bacterias y levaduras también es llamado de diferentes maneras, entre ellas té de hongos, hongo de té, tea kvass, cha-mug o kocha kinoki. Todos estos nombres son utilizados en diferentes idiomas para referirse a este cultivo simbiótico (Kitwetcharoen et al., 2023; Czarnecki et al., 2024).

El SCOBY inicia siendo una biopelícula gelatinosa transparente, la cual va creciendo y aumentando su grosor en forma de capas, de manera que, conforme avanza la fermentación, toma la forma del recipiente en el que se encuentra, con un color entre beige y café (Almeida y Sevilla, 2023).

En el SCOBY, se encuentran levaduras osmofílicas, que son las responsables de fermentar el azúcar para producir etanol. También se hallan bacterias que oxidan el etanol y producen ácido acético (Loor, 2022). Se puede encontrar una serie de microorganismos diversos, tal como menciona Mukadam et al. (2016). Entre los microorganismos dominantes presentes en el SCOBY, destacan *Saccharomyces*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, siendo

estos los más comunes y dominantes. Sin embargo, se puede presentar otro tipo de microorganismos dependiendo de las condiciones en las cuales se encuentre el cultivo.

De manera más específica, se menciona que en el cultivo simbiótico se puede encontrar una gran diversidad de bacterias y especies de levaduras, que pueden variar entre fermentaciones. Entre las bacterias del ácido acético presentes se incluyen *Komagataibacter (K.) saccharivorans*, *K. hansenii*, *K. kombuchae*, *K. europaeus*, *K. rhaeticus*, *K. xylinus*, *K. intermedius*, *Gluconobacter (G.) potus*, *G. oxydans*, *Gluconacetobacter (G.) sacchari* y *G. sp A4*, *Acetobacter (A.) pasteurianus*, *A. aceti*, *A. musti* y *A. nitrogenifigens sp. nov.* En cuanto a las bacterias del ácido láctico, se encuentran *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lacticaseibacillus casei*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus (P.) pentosaceus*, *P. acidilactici*, *Oenococcus oeni* y *Liquorilactobacillus nagelii* (Wang et al., 2023a).

Por otro lado, las cepas de levaduras presentes abarcan *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces (Z.) bailii*, *Z. rouxii*, *Brettanomyces (B.) bruxellensis*, *B. intermedius*, *B. lambicus*, *Candida (C.) kefir*, *C. albican*, *C. zemplinina*, *Dekkera (D.) anomala*, *D. bruxelensis*, *Pichia (P.) fermentans*, *P. kudriavzevii*, *P. occidentalis* y *Hanseniaspora valbyensis*. La composición química de la kombucha varía según la interacción entre las bacterias y las levaduras (Wang et al., 2023a).

2.2.5 Características de la biomasa (composición química)

En la composición química del SCOBY, destacan proteína, fibra, grasa; minerales como sodio, potasio, fósforo, calcio, cloro, magnesio, hierro, zinc, azufre, entre otros. También sobresalen importantes aminoácidos, entre los esenciales: isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina. Por otra

parte, se encuentran 10 aminoácidos no esenciales: alanina, ácido aspártico, ácido glutámico, arginina, cisteína, glicina, histidina, prolina, serina, tirosina (Jayabalan et al., 2010).

La composición del SCOBY puede variar según el tiempo de fermentación y el grosor del cultivo. Según Coello y Vizniac (2021), un SCOBY con 10 días de fermentación puede presentar una cantidad importante de celulosa, aproximadamente 4,09 % de alfa celulosa, 8,96 % de holocelulosa, 4,89 % de hemicelulosa y un 9,55 % de lignina insoluble. Otros autores destacan contenidos muy diversos en cuanto a su composición química. En la tabla 1, se resumen algunos de los datos reportados por diversos autores.

Tabla 1

Composición química en base seca de la biomasa generada por el SCOBY reportada por diversos autores

Parámetro (g/100g)	das Chagas et al. (2024)	Murugesan et al. (2005)	Jayabalan et al. (2010)		
	0 días	0 días	7 días	14 días	21 días
Proteína	0,84 ± 0,04	17,9 ± 0,04	12,15 ± 1,15	18,41 ± 1,63	23,1 ± 0,08
Lípidos	0,29 ± 0,05	4,4 ± 0,02	1,8 ± 0,56	4,71 ± 0,49	5,4 ± 0,61
Cenizas	0,58 ± 0,09	2,64 ± 0,04	0,85 ± 0,51	2,92 ± 0,66	3,97 ± 1,21
Fibra cruda	10,49 ± 0,29	12,0 ± 0,03	6,33 ± 0,85	12,45 ± 1,22	14,7 ± 0,65
Carbohidratos	86,51 ± 0,55	6,3 ± 0,02	6,0 ± 0,65	6,65 ± 0,85	6,8 ± 0,74

Fuente: elaboración propia con base en das Chagas et al. (2024); Murugesan et al. (2005); Jayabalan et al. (2010).

2.3 Fermentación

2.3.1 Definición

La fermentación es una técnica que se ha empleado desde tiempos ancestrales por el hombre para la conservación de alimentos. Fue investigada por primera vez en el año 1857 por el químico francés Louis Pasteur. La teoría de este químico se basaba en afirmar que la fermentación era producida por la acción de microorganismos y, a su vez, demostró que la teoría de la generación espontánea aceptada en esos años era falsa; este proceso lo describió como “*el vie sans air*”, es decir, la vida sin el aire (Andreu y Saavedra, 2022).

La nombró de esta manera, debido a que dedujo que se podía obtener un compuesto orgánico a partir del proceso de transformación de moléculas complejas a simples en un medio anaerobio. Por lo tanto, Pasteur comprobó que la fermentación es un proceso que realizan las células animales, incluyendo las humanas, cuando existen condiciones ambientales adecuadas que permitan la interrelación con los microorganismos. Además, la fermentación se puede realizar de forma artificial por el hombre para producir y conservar alimentos como el pan, vino y queso (Escobar, 2019). Por ello, Sharma et al. (2020) definió que la fermentación es un proceso que se utiliza para descomponer moléculas orgánicas de gran tamaño, por medio de la acción de microorganismos, en moléculas más simples.

Desde el punto de vista bioquímico, la fermentación se define como un proceso anaeróbico, donde sustancias orgánicas como el sustrato sufren cambios químicos (reducciones y oxidaciones), produciendo energía y una acumulación de diversos productos, unos más reducidos y otros más oxidados que el sustrato, con un balance total de energía positiva. Esta energía es usada por los microorganismos para el metabolismo. En cambio, desde el enfoque microbiológico, la fermentación se define

como el proceso en el que en procesos aeróbicos o anaeróbicos se da la descomposición de sustancias orgánicas e inorgánicas para producir diferentes formas de materiales y biogases (Oreluwa y Stephen, 2021).

Además, la fermentación se puede dividir en función del tipo de producto final por obtener y la ausencia o presencia de oxígeno en el proceso. Con relación a los productos finales obtenidos de la fermentación, desde el punto de vista comercial se clasifica en dos: las células microbianas como la biomasa y los metabolitos microbianos como el etanol, ácidos orgánicos, enzimas, entre otros. Asimismo, se puede clasificar según la participación del oxígeno en el proceso; si hay presencia de oxígeno, se conoce como fermentación aerobia; o, en ausencia de oxígeno, como fermentación anaerobia (Yadav et al., 2014; Castañeda y Llorente, 2023).

La fermentación aeróbica o aerobia es aquella que ocurre en presencia de oxígeno, donde este elemento es fundamental para el crecimiento y desarrollo del microorganismo y la obtención del compuesto deseado. Por otra parte, la fermentación anaeróbica o anaerobia es un proceso por el cual las células extraen energía de los carbohidratos cuando no hay presencia de oxígeno en el entorno; los productos finales de este proceso son sustancias orgánicas como el ácido acético, etanol, acetona, ácido láctico, entre otros (Sourvinos, 2022).

Además, existe un tipo de microorganismos que son capaces de cambiar su metabolismo según el medio en el que se encuentren (con oxígeno y sin oxígeno) y de llevar a cabo lo que se conoce como fermentación facultativa, la cual no depende de un tipo de ambiente aeróbico o anaeróbico estricto (Dahal, 2023).

Finalmente, la fermentación ha evolucionado a través de los siglos junto con la humanidad y sus prácticas o costumbres, no solo desarrollando nuevos productos,

sino también garantizando la conservación de alimentos perecederos como la leche, cereales, carne, entre otros (Andreu y Saavedra, 2022).

2.3.2 Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es un proceso que permite la degradación de los azúcares simples (glucosa, sacarosa, fructuosa) convirtiéndolos en alcohol y dióxido de carbono. Esta transformación se da en ausencia de oxígeno y se realiza con ayuda de microorganismos como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual presenta una alta capacidad fermentativa. Además, existen hongos y bacterias que se pueden utilizar para producir alcohol como la *Zymomonas mobilis*; sin embargo, es mínima su explotación a nivel industrial (Jayaraman et al., 2017; Mani, 2018; Wang et al., 2023b).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo utilizado por el ser humano a través del tiempo para elaborar diferentes productos; en su mayoría, es empleada para elaborar bebidas alcohólicas (cervezas o vino) o pan. Esta levadura heterótrofa puede ser aislada de la tierra, plantas y tracto gastrointestinal o genital humano (Miranda y Molina, 2015).

Básicamente, esta transformación convierte la molécula de glucosa en dos moléculas de etanol y dos moléculas de dióxido de carbono. La reacción para obtener alcohol se da en prácticamente tres pasos; primeramente, la enzima invertasa rompe el enlace glicosídico en el disacárido sacarosa entre la molécula de fructosa y glucosa. Luego, se obtienen dos moléculas de piruvato a partir de la molécula de glucosa, por medio de glucólisis y, finalmente, el piruvato se convierte en etanol y dióxido de carbono (Mani, 2018).

De forma general, para este tipo de fermentación se utilizan sustratos con alto contenido de carbohidratos, como lo son los cereales, la caña de azúcar, las frutas como las uvas, y algunos tubérculos (Jayaraman et al., 2017). Por último, dentro de

los aspectos que se deben de tomar en cuenta para controlar la fermentación alcohólica está el efecto del oxígeno, la temperatura, los nutrientes, la concentración de glucosa, el pH y el efecto del etanol hacia las enzimas (Miranda y Molina, 2015).

2.3.3 Fermentación acética

La fermentación acética es un proceso que se genera principalmente por bacterias acéticas (AAB), que se encargan de oxidar el etanol en acetaldehído por medio de la catálisis de la enzima alcohol deshidrogenasa. Después, las AAB oxidan este compuesto y lo convierten en ácido acético, a través de la catálisis de la enzima aldehído deshidrogenasa. En condiciones aerobias, se utiliza el oxígeno del medio como aceptor final electrones, mientras que, en condiciones de estrés (anaerobias), el metabolismo de las bacterias se ve afectado, lo cual perjudica su crecimiento (Córdova et al., 2022; Han et al., 2024).

Las especies de bacterias que se utilizan con mayor frecuencia son las de los géneros *Acetobacter* (*Acetobacter aceti*, *Acetobacter cerevisiae*, *Acetobacter lambici*, etc.), *Gluconobacter* (*Gluconobacter cerevisiae*, *Gluconobacter oxydans*, etc.) y *Komagataeibacter* (*Komagataeibacter europaeus*, *Komagataeibacter hansenii*, etc.). Principalmente, las *Acetobacter pasteurianus*, *Komagataeibacter europaeus* y *Gluconobacter oxydans* son las que se emplean para producir productos alimenticios (Han et al., 2024).

Dentro de los factores que intervienen en la fermentación acética se encuentran la temperatura, el tipo y densidad de bacterias presentes, la concentración de etanol, de oxígeno disuelto y ácido acético. Por ello, las óptimas condiciones del medio para el crecimiento y desarrollo de las bacterias acéticas son una temperatura entre 25-30 °C, un pH entre 5 y 6,5 y bastante oxigenación del medio (Román et al., 2023).

Algunas bacterias del ácido acético se encuentran en frutas con un alto contenido de azúcar y se suelen utilizar para obtener vinagre, cacao, ácido ascórbico, kombucha y ácido tartárico. No obstante, también pueden participar en el deterioro de la sidra, cerveza y vino durante la fermentación (Sarbu y Csutak, 2019; Erkmen, 2022).

2.3.4 Parámetros de fermentación

Dentro de las variables o parámetros que se deben de medir o controlar durante la fermentación están el oxígeno, temperatura, pH, tiempo de fermentación, nutrientes, concentración de sustrato y/o selección de microorganismos. En un principio, la temperatura puede generar un efecto en la velocidad de las fermentaciones, ya que influye directamente en el desarrollo de los microorganismos. Es decir, a medida que se incrementa la temperatura, la velocidad del crecimiento se ve afectada (Bello, 2021).

Vinculado a lo anterior, se encuentra el tiempo de fermentación, que representa un factor clave en dicho proceso y en la producción de biomasa. Este parámetro puede variar según la cepa de levadura utilizada y la tasa de inoculación, la concentración de azúcar inicial y la temperatura del medio. Por ejemplo, las levaduras en periodos cortos no absorben los nutrientes; por lo tanto, esto limita su crecimiento y la producción de etanol no sería la esperada. Por el contrario, tiempos largos pueden generar efectos negativos, ya sea por la competencia entre microorganismos debido a la escasez de sustratos o por la inhibición del crecimiento celular por una concentración elevada de etanol (Burini, 2022; Castro y Cuestas, 2022).

Por otro lado, el pH en la fermentación es un parámetro que debe de ser controlado, debido a que, influye significativamente en la función de la membrana

celular, así como en el crecimiento, morfología y estructura celular. Asimismo, afecta el estado iónico de los sustratos, la absorción de los nutrientes, la solubilidad de las sales, la actividad enzimática y la biosíntesis de diferentes productos (Bello, 2021). Además, es importante destacar que el pH desempeña un papel crucial en la supervivencia de los microorganismos, pues cada uno posee un rango determinado de pH en el cual puede mantenerse y crecer (Benavides, 2019).

La aireación y la agitación son variables que deben ser controladas, puesto que el oxígeno influye de forma directa en el desarrollo celular. La intensidad de aireación y agitación a la que se expone un hongo representa un aspecto clave en la producción de biomasa y compuestos metabólicos, debido a que facilita la transferencia de nutrientes, productos y oxígeno. En las fermentaciones aerobias, es esencial mantener niveles adecuados de oxígeno disuelto, evitando restricciones en los procesos respiratorios. Sin embargo, las fermentaciones anaeróbicas se producen en ausencia de oxígeno (Barrera y Reyes, 2015; Bello, 2021).

Por otra parte, los microorganismos empleados en la fermentación requieren de nutrientes para realizar la síntesis de biomasa; los nutrientes esenciales en el proceso biológico son el nitrógeno y el fósforo. En las fermentaciones anaeróbicas, los requerimientos de macronutrientes son menores a los necesarios en las fermentaciones aerobias, ya que la producción de lodos es más baja (Pérez, 2020).

Asimismo, la concentración del sustrato (azúcar) puede influir en los procesos; por ejemplo, en la fermentación alcohólica se debe tener una concentración entre 12 °Brix a 22 °Brix para que sea satisfactoria, pues una concentración más baja provoca un menor grado de alcohol. Por otra parte, una concentración alta puede generar que la fermentación no se lleve a cabo, debido a que la presión osmótica ejercida en las levaduras es grande y no permite que interactúen sobre los azúcares (Méndez, 2020).

Finalmente, la selección del microorganismo fermentador juega un papel muy importante para garantizar que la fermentación se logre exitosamente. Para elegir estos microorganismos, se deben de tomar en cuenta algunos criterios generales; entre ellos, la tasa de crecimiento tiene que ser alta, la cepa debe de ser genéticamente estable y libre de contaminantes, llevar procesos fermentativos completos en tiempos cortos y ser fácil de conservarla por períodos largos (Méndez, 2020).

2.3.5 Cultivos microbianos

Los cultivos microbianos son una mezcla de uno o más microorganismos, como las levaduras, hongos o bacterias, que tienen la capacidad de transformar una matriz, ya sea láctea, vegetal u otra, en otros elementos, por medio del proceso de fermentación. Los microorganismos de los cultivos presentan características morfológicas y requerimientos nutricionales específicos en función de la especie que se desea abordar para su supervivencia o crecimiento. Entre estas se deben de tomar en cuenta los elementos básicos como las fuentes de hidrógeno, nitrógeno, azúcar, las temperaturas, entre otras (Andreu y Saavedra, 2022).

Los cultivos iniciadores o también llamados *starters* son aquellos que se preparan con cepas seleccionadas y se adicionan de manera intencional a una matriz alimentaria para comenzar el proceso de fermentación. Los cultivos iniciadores se dividen en dos grupos: los cultivos iniciadores de composición conocida y los cultivos iniciadores de composición desconocida o parcialmente conocida. Ahora bien, los cultivos iniciadores de composición conocida están conformados por un cultivo único (única cepa) o por un cultivo múltiple (mezcla definida de cultivos puros) (Ferrari et al., 2020).

Por otra parte, los cultivos iniciadores de composición desconocida o parcialmente conocida están compuestos por una mezcla indefinida de diferentes microorganismos, entre ellos las bacterias o levaduras. Ejemplos de estos cultivos son los gránulos del kéfir o el SCOBY de la kombucha. Entre las principales funciones de los cultivos iniciadores en el producto final están el asegurar la calidad microbiológica del alimento, favorecer el desarrollo de color, estabilizar el producto, evitar la proliferación de microorganismos patógenos y de deterioro, mejorar la consistencia del alimento, contribuir con la formación de sabores y aromas y, finalmente, generar productos estandarizados con características organolépticas parecidas entre lotes (Ferrari et al., 2020).

A diferencia de los cultivos anteriormente mencionados, se encuentra la fermentación salvaje, espontánea o nativa, que se basa en fermentar el alimento con los microorganismos presentes en este o en su entorno. Un ejemplo de esta fermentación es la que sucede para elaborar el chucrut y el kimchi (Voidarou et al., 2020). Por ejemplo, la fermentación alcohólica tradicional de un mosto se realizaba de manera espontánea con levaduras salvajes o nativas del medio; sin embargo, existía un riesgo mayor de obtener vinos poco reproducibles, alteraciones químicas o microbiológicas (defectos aromáticos, paralizaciones de fermentación, picados cítricos, entre otros) y, por último, tiempos extensos de fermentación (Santos, 2016).

2.3.6 Cultivos simbióticos

Las comunidades simbióticas se caracterizan por ser una interacción biológica entre dos o más microorganismos que se benefician; en otras palabras, es una relación persistente y estrecha entre microorganismos de especies diferentes. Asimismo, esta relación se caracteriza como compleja, porque se necesitan mutuamente para poder vivir libremente (Araya y Umaña, 2022).

El kéfir y la kombucha son un ejemplo de alimentos que necesitan los cultivos simbióticos para obtener el producto final. Los gránulos del kéfir (también llamados búlgaros) están compuestos por una combinación de levaduras y bacterias probióticas en una matriz de azúcares, lípidos y proteínas, en donde se obtiene una bebida fermentada (Araya y Umaña, 2022). Por otra parte, la kombucha es una bebida fermentada probiótica, que se obtiene al inocular una biopelícula que incluye un grupo simbiótico de levaduras y bacterias conocido como SCOBY con una infusión de té verde o negro. Esta infusión debe ser azucarada para que estos microorganismos metabolicen los sustratos azucarados (Guzmán, 2021).

2.5 Métodos de análisis

2.5.1 *Análisis proximal*

El análisis proximal de alimentos es un tipo de análisis químico que se basa en la determinación del valor nutricional de alimentos y otras matrices. Se incluye el análisis de componentes como humedad, cenizas, proteína, grasa, fibras y carbohidratos. Este método se conoce también como análisis de Weende y permite evaluar la calidad y seguridad de productos alimenticios, a través de la identificación de contaminantes potenciales (National Library of Medicine, 2016; Ullah et al., 2023).

Ahora bien, el análisis de estos constituyentes se lleva a cabo en un orden específico, donde se efectúan métodos químicos para la determinación de la mayoría de los componentes. Sin embargo, el contenido de carbohidratos se obtiene por medio de la determinación de los demás constituyentes. Además, para poder llevar a cabo este análisis, se debe realizar una reducción significativa del alimento, de modo que se logre tener un tamaño de partícula adecuado (Echebiri et al., 2022).

Para la toma y preparación de las muestras se deben considerar aspectos importantes como que esta debe ser estadísticamente representativa de la población en estudio, de modo que todas las partículas y componentes del alimento tengan la misma probabilidad de ser elegidas. Asociado a esto, se incluye la homogeneidad de las muestras, donde se debe asegurar que la apariencia física se muestre como una sola fase o componente. Finalmente, se deben conservar en refrigeración o congelación para que no exista ningún tipo de contaminación (Ballinas et al., 2023).

2.5.1.1 Humedad. La humedad es el primer componente que se determina en este análisis y, por medio de este, se estudia el contenido o porcentaje de agua presente en la muestra. Este componente puede manifestarse de dos formas: agua ligada o agua libre. El agua ligada se encuentra unida a algún otro componente, por ejemplo, proteínas, carbohidratos o partículas coloidales. La determinación de este componente resulta importante, porque esto influye sobre la fluidez, compresibilidad y cohesividad de los alimentos (Bohórquez et al., 2020; Ullah et al. 2023).

Los métodos de determinación de humedad para una muestra sólida pueden dividirse en dos: directos e indirectos. Los primeros se basan en el análisis de la cantidad de agua a través de la remoción de la humedad de la muestra sólida. Algunos ejemplos incluyen métodos gravimétricos (secado en horno), por titulación de Karl-Fischer, por destilación, o bien otros secados como por radiación en microondas o infrarroja. En los métodos gravimétricos, se puede utilizar horno o estufas con temperatura controlada, vacío o circulación de aire caliente y la temperatura del procedimiento puede variar. Por ejemplo, en el secado al vacío se utiliza un rango entre 95-100 °C, mientras que, en estufa, puede estar entre 135-137 °C (Sánchez, 2021; Ballinas et al., 2023).

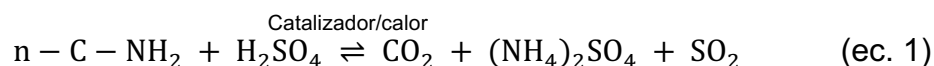
Los métodos indirectos son los que se efectúan con medidores que miden el contenido de humedad con el cambio en las propiedades higrométricas que pueden ser ópticas, eléctricas u otras. Algunos métodos que destacan son los eléctricos, espectroscópicos y aquellos que se basan en la humedad relativa del ambiente. Finalmente, la humedad puede determinarse por medio del uso de instrumentos; por ejemplo, el método Chataway, que relaciona el índice de refracción con el contenido de humedad de una muestra. Además, existen equipos de determinación automática; sin embargo, la complejidad de algunas matrices alimentarias imposibilita la ejecución adecuada de este proceso (Fon y Zumbado, 2019; Sánchez, 2021).

2.5.1.2 Proteína. Las proteínas son macromoléculas de alto peso molecular conformadas por la unión lineal de los aminoácidos. La determinación de estos compuestos puede realizarse por medio de diferentes métodos. Las formas más habituales de determinación son a través de cuantificación del nitrógeno, el cual es el elemento que más sobresale en su composición. Algunos de los métodos que resaltan son el Kjeldahl, Lowry, Bradford, Dumas, métodos de medición directa y métodos de índice de refracción (Vega y Reyes, 2020; Hayes, 2020).

Actualmente, el método estándar para determinar el nitrógeno total en una matriz alimentaria es el método Kjeldahl, el cual fue introducido en 1883 por el químico danés Johan Gustav Christoffer Thorsager Kjeldahl. Principalmente, el análisis se aplicaba en la industria cervecera para determinar los cambios en las proteínas durante los procesos de germinación y fermentación. En la actualidad, se utiliza en diversas muestras como lo son alimentos, bebidas, forrajes, fertilizantes, piensos, aguas residuales, suelos, entre otras. Este método se encuentra oficialmente descrito en normas emitidas por diversas organizaciones, como la AOAC (Asociación de Químicos Analíticos Oficiales por sus siglas en inglés), US-EPA (Agencia de

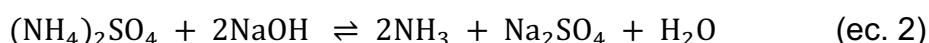
Protección Ambiental de Estados Unidos por sus siglas en inglés) , ISO (Organización Internacional de Normalización por sus siglas en inglés), entre otras (García y Fernández, 2012; Sáenz et al., 2019).

Básicamente, la teoría expone que la totalidad del nitrógeno de una muestra se encuentra en forma proteica; sin embargo, dependiendo de la naturaleza de la muestra, el nitrógeno puede provenir de otros compuestos nitrogenados (García y Fernández, 2012). Por lo tanto, la proteína determinada por este medio se denomina proteína bruta o total y, a grandes rasgos, su determinación se ejecuta en tres etapas. La primera de estas es la digestión, donde se trata la muestra con ácido fuerte como el sulfúrico, en presencia de un catalizador y, por medio de ebullición, el nitrógeno es convertido en ion amonio (ecuación 1).

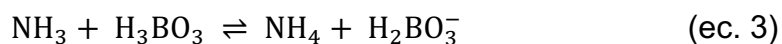


Al estar sometida continuamente al calor, se liberan dióxido de azufre, agua y dióxido de carbono y las sustancias nitrogenadas son transformadas en sulfato de amonio (Altuntas y Hapoglu, 2019).

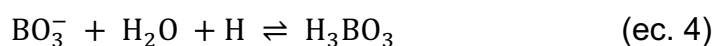
Por consiguiente, se realiza la etapa dos del método, conocida como destilación, la cual se basa en alcalinizar la muestra digerida; donde, el nitrógeno es desprendido en forma de amoníaco (ecuación 2).



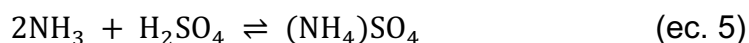
El amoníaco destilado es recogido con ácido bórico en exceso (ecuación 3).



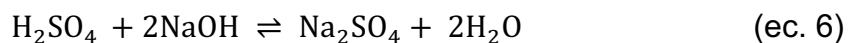
La última etapa del método, la valoración, se lleva a cabo a través de la volumetría ácido-base del ion borato formado (ecuación 4). El ácido utilizado suele ser ácido clorhídrico o sulfúrico y un indicador de disolución alcohólica; donde, los equivalentes consumidos de ácido representan los equivalentes de amoníaco destilados.



Sin embargo, esta etapa puede llevarse a cabo mediante titulación inversa en donde el amoníaco destilado se recoge con exceso de ácido sulfúrico (ecuación 5) (Martín et al., 2017).



Después, el ácido en exceso que no reacciona es valorado con el amoníaco y una solución estandarizada de hidróxido de sodio.



Por último, el porcentaje de nitrógeno se determina mediante el cálculo del número de equivalentes de nitrógeno recogidos. El porcentaje de proteína bruta se obtiene a través de una multiplicación por un factor de conversión (K) que debe reflejar el porcentaje de nitrógeno en la muestra, donde existen algunos alimentos con su

factor de conversión ya establecido (Licon, 2022). En el caso de proteína microbiana, Zhang et al. (2021b) utilizan un factor de 6.25 para estimar el contenido.

2.5.1.3 Grasa. Las grasas y aceites son macronutrientes y suelen estar compuestas en su mayoría de triglicéridos. Álvarez (2018) menciona que los triglicéridos se constituyen por tres ácidos grasos unidos mediante un enlace éster a una molécula de glicerol. Estos ácidos grasos son ácidos carboxílicos con cadenas hidrocarbonadas y generalmente presentan entre doce a veinticuatro átomos de carbono. Estas cadenas pueden presentarse de manera saturada o insaturada.

Según Saini (2021), la determinación de lípidos puede realizarse mediante extracción con disolventes orgánicos no polares, polares o mediante una mezcla de ambos. Zarrinmehr et al. (2022), mencionan que el cloroformo y el hexano son disolventes no polares, mientras que acetona y metanol son polares. Otros solventes comúnmente utilizados son el tolueno, n-hexano, éter dietílico de benceno; etanol y acetato de etilo (Mubarak et al., 2015, citado por Zarrinmehr et al., 2022).

Se debe elegir el solvente adecuado según la matriz. Los lípidos neutros se deben tratar con disolventes orgánicos no polares y los lípidos polares con disolventes polares. En el caso de los hongos, plantas y otros microorganismos con paredes celulares rígidas se debe realizar un pretratamiento mecánico, fisicoquímico o enzimático, que desintegre las paredes celulares y el solvente pueda penetrarse para la extracción (Lee et al., 2017; Wang et al., 2021; Zainuddin et al., 2021; citados por Saini, 2021).

Otra forma de determinación de grasas es mediante métodos butirométricos, los cuales separan la grasa mediante adición de ácido sulfúrico que permite que se degraden las proteínas. La grasa se separa mediante una centrifugación, se cuantifica

visualmente la capa de grasa, utilizando la escala calibrada de un butirómetro (Fon y Zumbado, 2019).

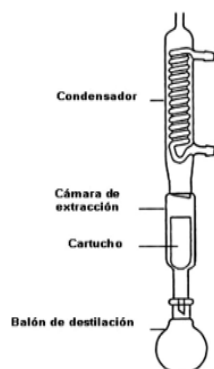
Algunos de los aspectos que se deben contemplar antes de iniciar son que todas las muestras sólidas deben homogeneizarse y dividirse a través de tratamientos físicos, mecánicos, químicos o biológicos. Además, aquellas muestras que presenten un porcentaje de humedad mayor a 15-20 % tendrán que ser previamente secadas y, si presenta alto contenido de almidones y proteínas, es necesario realizar una digestión ácida, pues en algunos alimentos la grasa se encuentra atrapada dentro de estas estructuras (Fon y Zumbado, 2019; Saini et al., 2021).

Dentro de la categoría de métodos de extracción con disolventes se encuentra el método Soxhlet, mediante el cual una vez la muestra se mezcla con el solvente, se calienta hasta alcanzar el punto de ebullición del solvente. Este pasa a ser vapor bajo una presión atmosférica definida y este proceso se repite hasta proceder a extraer los compuestos de la muestra (Gómez, 2013, citado por Pocco, 2019).

Este método requiere de un equipo específico, el cual se compone de un balón que va a contener el solvente, que va a estar en la fuente de calor para generar vapor; un tubo de extracción Soxhlet, en el cual se debe depositar la muestra en un cartucho elaborado con material de celulosa; y un condensador, que permite que se enfríe el vapor y se devuelva al balón en estado líquido (Pocco, 2019).

Figura 1

Equipo de extracción Soxhlet



Fuente: Pocco (2019).

2.5.1.4 Fibra cruda. Se conoce como fibra cruda o fibra bruta a los residuos vegetales no digeribles que permanecen en los alimentos después de haber sido sometidos a la extracción con solvente, ácido y álcalis diluido. Los principales componentes de la fibra cruda son la celulosa, hemicelulosa y lignina, lo cual constituye fundamentalmente la fracción no digerible de la fibra (Dai y Chau, 2017).

Existe el método de fibra cruda o método de Weende, regulado oficialmente por el método AOAC 978.10 (AOAC International, 2005 citado por AFIA, 2007) y en la norma ISO 5498:1981, el cual fue diseñado con el propósito de separar los carbohidratos vegetales en fracciones digeribles e indigeribles, utilizando un medio alcali y ácido. En este método, el medio alcali permite eliminar las proteínas y solubilizar parte de la lignina y compuestos fenólicos, mientras que el medio ácido disuelve las hemicelulosas (Fahey et al., 2019).

Básicamente, este método se realiza con ayuda de un equipo especial conocido como “Dosi - Fiber”, e inicia con una muestra del alimento seca y desgrasada (w0). Posteriormente, se debe de realizar una hidrólisis ácida en caliente con ácido sulfúrico y, luego, una hidrólisis básica en caliente con hidróxido de sodio. Una vez

las muestras se encuentran filtradas y lavadas, deben ser secadas en una estufa a 150 °C por 1 hora, se enfrían en el desecador y se pesan para obtener la masa inicial (w_1). Finalmente, estas muestras se colocan en el horno de mufla a 500 °C durante 3 horas para incinerarse, se enfrían y se pesan (w_2) (Fon y Zumbado, 2019). Se calcula el porcentaje de fibra bruta con base en la siguiente fórmula.

$$\% \text{ Fibra bruta} = \frac{W_2 - W_1}{W_0} \times 100 \quad (\text{ec. 7})$$

No obstante, una limitación que presenta este método es que el tratamiento aplicado puede provocar la pérdida de ciertos carbohidratos, por ejemplo, degradaciones hidrolíticas de la celulosa y lignina.

2.5.1.5 Cenizas. Las cenizas se caracterizan por ser la parte inorgánica del alimento que queda después de incinerar la muestra y remover el agua y compuestos orgánicos. Se caracteriza por ser la parte no gaseosa y no volátil como los minerales. El proceso más utilizado es la incineración en seco, en la que se suele utilizar un horno de mufla para quemar la muestra a temperaturas que rondan los 600 °C. Algunas veces, puede haber inconsistencia en los resultados, porque quedan materiales volátiles en la muestra (Md Noh et al., 2020; Ullah et al., 2023).

El tiempo que la muestra deba ser incinerada depende de la naturaleza de la matriz. Maliki et al. (2023) efectúan el proceso hasta obtener un polvo grisáceo. En otros casos, se utilizan otros métodos por la presencia de mercurio y hierro, por ejemplo, la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR), que permite efectuar diversos procesos simultáneamente.

2.5.1.6 Carbohidratos. Los carbohidratos son moléculas de compuestos orgánicos (carbono, oxígeno e hidrógeno) que desempeñan una función esencial para el cuerpo humano al ser una fuente de energía, a través de la descomposición de los carbohidratos a glucosa. Según su estructura, se clasifican en diversas categorías. El primer grupo es conocido como carbohidratos simples (monosacáridos y disacáridos), los cuales son aquellos azúcares compuestos de hasta dos monosacáridos unidos. Seguidamente, el otro grupo se identifica como carbohidratos complejos (polisacáridos y oligosacáridos). Estos son polímeros con largas cadenas de monosacáridos (más de tres) y su absorción es más lenta y gradual (Holesh et al., 2023).

Los azúcares reductores son aquellos que se caracterizan por tener un grupo carbonilo intacto. Esto le permite funciones cetona o aldehído libres, con mucha susceptibilidad de ser oxidada. Métodos de cuantificación específicos como Benedict, Fehling y Hagedorn-Hensen se basan en el principio de transformación de los azúcares reductores a enedíoles por calentamiento (Cristancho y Monroy, 2014; Vegas et al., 2024).

En el caso de la prueba de Benedict, los enedíoles reducen los iones cúpricos a iones cuprosos, presentándose como óxido cuproso. Esto presenta un cambio de color en la solución, lo que permite identificar la presencia de azúcares reductores en la muestra y, según la intensidad y tonalidad de la disolución, obtener un estimado de concentración de azúcares (Dahal, 2024).

Los métodos para la cuantificación de carbohidratos específicos como lo son: azúcares reductores, totales, almidón, entre otros, sí existen. No obstante, como parte del análisis proximal, los carbohidratos totales se determinan por diferencia, a partir del porcentaje restante de la cuantificación de los principales macro componentes del

alimento antes mencionados, tal como se muestra en la ecuación 8 (Fon y Zumbado, 2019).

$$\% \text{ Carbohidratos} = 100 - (\text{Humedad} + \text{proteína} + \text{lípidos} + \text{cenizas} + \text{fibra}) \text{ (ec. 8)}$$

2.5.2. Fibra dietética

La fibra dietética es un componente muy importante en la alimentación humana y su concepto ha evolucionado con el pasar de los años. Inicialmente, se mencionaba que la fibra dietética correspondía a los polisacáridos insolubles y no digeribles que se encuentran en la pared celular de las plantas como celulosa, lignina y hemicelulosa. Años después, se le suman a ese concepto los polisacáridos solubles en agua y no digeribles como mucílagos, gomas y pectinas (González et al., 2021).

Diversas investigaciones han llevado a cambios en el concepto de fibra dietética mencionado anteriormente. Actualmente, la fibra dietética se reconoce como un conjunto de polímeros y oligómeros de carbohidratos que no se digieren en el intestino delgado, pasando al intestino grueso donde son parcial o totalmente fermentados por el microbiota intestinal. Sin embargo, esta no es la única definición, ya que no existe un concepto universal (González et al., 2021).

Dentro de los constituyentes de la fibra dietética, se encuentran los polisacáridos, que son cadenas de carbohidratos formadas por al menos veinte unidades de monosacáridos. Estos polisacáridos incluyen la hemicelulosa, celulosa, betaglucanos, pectinas, gomas y mucílagos. Aunque el almidón es un polisacárido, no se clasifica dentro de este grupo debido a su digestión y absorción en el intestino delgado.

Otros componentes de la fibra dietética son los oligosacáridos resistentes de entre tres a nueve grados de polimerización de monosacáridos, como fructooligosacáridos, inulina, xilooligosacáridos, rafinosa, maltodextrinas, galactooligosacáridos. También, se reconocen otros componentes de menor tamaño, que cuando están unidos a la pared celular entran dentro del término de fibra dietética, como las ligninas, polifenoles, ceras, saponinas, fitatos, cutinas y fitoesteroles (Calizaya et al., 2023).

Los métodos para determinar la fibra dietética en alimentos se dividen en tres: enzimático-gravimétricos, no enzimático-gravimétricos y enzimático-químicos. En el primero, se efectúan tratamientos enzimáticos para eliminar proteínas y almidones, se precipitan componentes de la fibra con el uso de etanol acuoso, se filtra, pesa y se realiza una corrección de proteínas y cenizas. Los componentes que se determinan en este método son polisacáridos, lignina y ciertos almidones resistentes, pero no los oligosacáridos. Por otra parte, los otros dos métodos incluyen la determinación del contenido de azúcares neutros por medio de cromatografía de gas-líquido (GLC) o cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Caicedo, 2021).

También, se puede determinar el contenido de monosacáridos y ácido urónico por colorimetría y un valor único de azúcares totales por espectrofotometría. El residuo que posterior a la hidrólisis de polisacáridos se recoge por filtración y se cuantifica por medio del ensayo Ilasina de Klason. La fibra dietética total se representa como la suma de los polisacáridos sin almidón y la lignina. Otros métodos se han desarrollado para determinar polisacáridos y polifenoles asociados (Caicedo, 2021).

2.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico es relevante para poder interpretar los resultados y evaluar su confiabilidad. A continuación, se mencionan las metodologías pertinentes para este tipo de investigación.

2.6.1 Análisis de varianza de dos vías

El análisis de varianza (ANDEVA) es un procedimiento estadístico que se utiliza para comparar las medias de dos o más grupos. Este análisis es altamente utilizado en diseños experimentales en donde existe una variable dependiente que es normalmente una medida numérica paramétrica continua de resultados y múltiples grupos experimentales dentro de una o más variables independientes. A estas variables independientes se les conoce como factores y los grupos dentro de estos factores se definen como niveles (Andrade, 2024).

Dentro de este, se incluye el análisis de dos vías que se aplican en casos en los que hay dos factores. Su base matemática es la regresión lineal y modelos generales lineales que cuantifican la relación entre la variable dependiente y la (s) independiente (s). El ANDEVA depende del diseño experimental utilizado, por lo tanto, no existe un análisis único (Jorgensen, 2023).

2.6.1.1 Prueba post-hoc de Tukey. Las pruebas post-hoc suelen utilizarse después de obtener el resultado de diferencia significativa en las pruebas ANDEVA; con lo cual, se puede determinar cuáles son los conjuntos de datos exactos que difieren entre sí. Este método lo desarrolló John Tukey bajo el nombre de diferencia honestamente significativa (HSD por sus siglas en inglés). Es una técnica de comparación por pares que tiene como objetivo principal calcular la diferencia entre dos medias, utilizando una distribución estadística (Nanda et al., 2021; Agbangba et al., 2024).

Esto proporciona la distribución de muestreo exacta de la diferencia mayor dentro de un conjunto de medias provenientes de la misma población. Estas comparaciones permiten obtener cuáles y por cuanto difieren los pares de medias en estudio. Debe utilizarse la prueba HSD cuando la interacción entre tres o más variables es estadísticamente significativa y en conjunto con el ANDEVA permite crear intervalos de confianza para todas aquellas diferencias por pares entre las medias de cada nivel de un factor. Para determinar el valor de esta prueba, se debe tomar el valor absoluto de la diferencia entre pares de medias y dividirlo entre el error estándar de la media (SE), el cual tuvo que ser determinado anteriormente en la prueba ANDEVA (Nanda et al., 2021; Agbangba et al., 2024).

III. MARCO METODOLÓGICO

En el siguiente apartado, se desarrolla la metodología que se utilizará para llevar a cabo la presente investigación, esto con el fin de cumplir los objetivos establecidos anteriormente.

3.1 Tipo de enfoque

El desarrollo de esta investigación se da por medio de un modelo cuantitativo. Este se caracteriza por ser objetivo, sistemático y metódico, permite medir y explicar los fenómenos sociales a partir de análisis de variables observables y medibles. Este enfoque inicia con la formulación de un problema de investigación y de hipótesis o preguntas sustentadas teóricamente, para luego comprobarlas con la aplicación de métodos estadísticos, con el fin de analizar los resultados y definir las relaciones de causa-efecto entre las variables (Babativa, 2017).

Esta metodología permite establecer conclusiones basadas en evidencia, generando predicciones confiables sobre la realidad estudiada (Babativa, 2017). Por ello, dicho enfoque se incluye a lo largo de todo el presente trabajo, ya que se realiza una recolección de datos de diversos ensayos y análisis de laboratorio, para poder cumplir con los objetivos propuestos.

3.1.1 Tipo de investigación

Con respecto al tipo de investigación, se caracteriza el presente trabajo como exploratorio, debido a que se desean examinar diversos aspectos que cuentan con pocas investigaciones previas. Por lo tanto, se requiere explorar el tema de estudio para tener un acercamiento de las características generales y la frecuencia con la que ocurre (Ramos, 2020).

Además, se clasifica como una investigación experimental, ya que, según Ramos (2021), en este tipo de investigaciones se manipula una variable

independiente de forma intencionada para analizar el efecto sobre las variables dependientes. Lo anterior refleja lo que sucedió en el presente trabajo, puesto que existen diversas variables que se modificaron con el fin de cumplir los objetivos establecidos.

Finalmente, se destaca el tipo de investigación deductiva, la cual se basa en el razonamiento, en donde la deducción permite transformar los principios generales obtenidos en hechos particulares; es decir, cuando se comprueba y verifica la validación de un principio, se prosigue con su aplicación en un contexto particular (Bernal Torres, 2006 citado por Prieto, 2017). Por lo tanto, el presente trabajo se fundamenta en este tipo de investigación, puesto que se realiza la deducción de las conclusiones con base en los resultados obtenidos.

3.2 Sujetos y fuente de información

El objeto de estudio es la biomasa generada por el crecimiento del cultivo simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY) durante la elaboración de la kombucha.

La información científica de soporte para el diseño de la investigación y el análisis de los resultados se obtendrá de fuentes primarias (tesis, libros de textos) y fuentes secundarias (artículos científicos). Los datos se obtendrán a partir de ensayos, pruebas y análisis fisicoquímico del objeto de estudio.

3.3 Pregunta generadora

¿Es viable técnicamente utilizar la biomasa del cultivo simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY) generado en la elaboración de kombucha como una fuente de proteína alternativa para consumo humano?

A continuación, se describe, en la tabla 2, la operacionalización de las variables del trabajo realizado.

3.4 Variables

Tabla 2

Operacionalización de variables

Objetivo específico	Variable / Dimensión	Definición conceptual	Definición operacional	Definición instrumental	Indicador
Establecer las condiciones de fermentación para la obtención de la biomasa microbiana (cultivo simbiótico de bacterias y levaduras) mediante pruebas preliminares y ensayos fisicoquímicos.	Tiempo de fermentación.	Periodo donde los microorganismos convierten el azúcar en ácido acético.	Establecimiento de cuatro tiempos de fermentación.	Diseño de pruebas preliminares para determinar tiempo y concentración de azúcar del diseño experimental.	Selección de cuatro tiempos de fermentación.
	Concentración de sustrato	Cantidad de azúcar (g/ml) presente en el medio de fermentación.	Establecimiento de dos concentraciones de azúcar.	Bitácora para documentar resultados.	Selección de dos concentraciones de azúcar.
	Tasa de crecimiento.	Aumento a través del tiempo de la masa del cultivo.	Aumento de la masa de cada cultivo a cada tiempo.	Diseño experimental y formularios para el registro de datos de masa del cultivo.	Tasa de crecimiento para cada tiempo de fermentación.
	Comportamiento de los parámetros fisicoquímicos indicadores del avance de la fermentación: pH, sólidos solubles, temperatura.	Valor en el tiempo de parámetros indicadores del avance de la fermentación.	Medición de los parámetros en cada tiempo de fermentación.	Métodos de medición de cada parámetro: pH: pHmetro digital marca APERA Instruments modelo PH20 pH Tester. Sólidos solubles: ° Brix, refractómetro marca Alla France, modelo 95000-011. Temperatura: termómetro digital marca Taylor, modelo 9842.	Valor obtenido para cada parámetro.

Tabla 2 (continuación). *Operacionalización de variables*

Objetivo específico	Variable / dimensión	Definición conceptual	Definición operacional	Definición instrumental	Indicador
<p>Analizar el efecto del tiempo de fermentación sobre la composición bromatológica y tasa de crecimiento de la biomasa generada como subproducto de la elaboración de kombucha, por medio de ensayos de laboratorio.</p>	<p>Tiempos de fermentación.</p> <p>Tasa de crecimiento.</p> <p>Composición bromatológica: humedad, proteína, grasa, fibra dietética, cenizas, carbohidratos totales.</p> <p>Comportamiento de parámetros fisicoquímicos indicadores del avance de la fermentación: pH, sólidos solubles, temperatura.</p>	<p>Periodo donde los microorganismos convierten el azúcar en ácido acético.</p> <p>Aumento a través del tiempo de la masa del cultivo.</p> <p>Contenido de los componentes del alimento.</p> <p>Valor en el tiempo de parámetros indicadores del avance de la fermentación.</p>	<p>Ensayo experimental para la medición del aumento de masa de cada cultivo a cada tiempo.</p> <p>Análisis químico de laboratorio de muestras procedentes de tres lotes de fermentación independientes.</p> <p>Medición de los parámetros definidos en cada tiempo de fermentación.</p>	<p>Diseño experimental y formularios para el registro de datos.</p> <p>Bitácora para documentar resultados</p> <p>Métodos de análisis: Humedad: Método AOAC 923.03. Proteína: Método AOAC 991.20. Grasa: Método AOAC 920.39. Fibra dietética: Método AOAC 985.20 y 991.43. Cenizas: Método AOAC 923.03. Carbohidratos totales: por diferencia.</p> <p>Métodos de medición de cada parámetro: pH: pHmetro digital marca APERA Instruments modelo PH20 pH Tester. Sólidos solubles: ° Brix, refractómetro marca Alla France, modelo 95000-011. Temperatura: termómetro digital marca Taylor, modelo 9842.</p>	<p>Tasa de crecimiento para cada tiempo de fermentación.</p> <p>Porcentaje de cada componente para cada tiempo de fermentación.</p> <p>Valor obtenido para cada parámetro.</p>

Tabla 2 (continuación). *Operacionalización de variables*

Objetivo específico	Variable / dimensión	Definición conceptual	Definición operacional	Definición instrumental	Indicador
<p>Analizar el efecto de dos concentraciones de azúcar del sustrato sobre la composición bromatológica y tasa de crecimiento de la biomasa generada como subproducto de la elaboración de kombucha, por medio de ensayos de laboratorio.</p>	<p>Concentración de azúcar.</p> <p>Tasa de crecimiento.</p> <p>Composición bromatológica: humedad, proteína, grasa, fibra dietética, cenizas, carbohidratos totales.</p> <p>Comportamiento de los parámetros fisicoquímicos indicadores del avance de la fermentación: pH, sólidos solubles, temperatura.</p>	<p>Cantidad de azúcar (g/ml) presente en el medio de fermentación.</p> <p>Aumento de masa del cultivo para cada concentración.</p> <p>Contenido de los componentes del alimento.</p> <p>Valor en el tiempo de parámetros indicadores del avance de la fermentación.</p>	<p>Ensayo experimental para la medición del aumento de la masa de cada cultivo para cada concentración de azúcar.</p> <p>Análisis químico de laboratorio de muestras procedentes de tres lotes de fermentación independientes.</p> <p>Medición de los parámetros definidos en cada tiempo de fermentación.</p>	<p>Diseño experimental y formularios para el registro de datos.</p> <p>Bitácora para documentar resultados</p> <p>Métodos de análisis: Humedad: Método AOAC 923.03. Proteína: Método AOAC 991.20. Grasa: Método AOAC 920.39. Fibra dietética: Método AOAC 985.20 y 991.43. Cenizas: Método AOAC 923.03. Carbohidratos totales: por diferencia.</p> <p>Métodos de medición de cada parámetro: pH: pHmetro digital marca APERA Instruments modelo PH20 pH Tester. Sólidos solubles: ° Brix, refractómetro marca Alla France, modelo 95000-011. Temperatura: termómetro digital marca Taylor, modelo 9842.</p>	<p>Concentración de azúcar para cada tiempo de fermentación.</p> <p>Porcentaje de cada componente para cada tiempo de fermentación.</p> <p>Valor obtenido para cada parámetro.</p>

3.5 Población y muestra

La población en estudio se obtuvo de tres diferentes lotes de fermentación controlada, cada uno de los cuales se llevó a cabo durante 28 días, con tomas de muestra realizadas los días 7, 14, 21 y 28. Se utilizó el 100 % de la biomasa generada en cada tiempo de fermentación.

3.6 Descripción de la metodología

Las fermentaciones se llevaron a cabo en el laboratorio 108 de la Universidad Técnica Nacional, Sede Atenas. El estudio se desarrolló durante el periodo de septiembre 2024 a abril 2025. Se realizaron tres pruebas preliminares con el objetivo de determinar las condiciones óptimas de fermentación y conservación de las muestras, las cuales sirvieron como base para el diseño de las pruebas definitivas. Durante estas pruebas se evaluaron diferentes concentraciones de sacarosa y tiempos de fermentación por triplicado.

Se analizaron parámetros fisicoquímicos del medio de cultivo líquido, incluyendo mediciones de pH, humedad, temperatura, sólidos solubles (°Brix) y tasa de crecimiento de la biomasa. Se aplicaron diferentes técnicas de preparación de muestra (como liofilización y secado), y de conservación (como la refrigeración y congelación), para estudiar el efecto sobre la estabilidad de la proteína del SCOBY.

3.7 Pruebas preliminares

Se realizaron tres pruebas preliminares con el objetivo de establecer las condiciones ideales para la preparación de la infusión, la inoculación y el mantenimiento de las muestras durante el proceso de fermentación. Durante las pruebas, se evaluaron dos concentraciones distintas de sacarosa y cuatro tiempos de

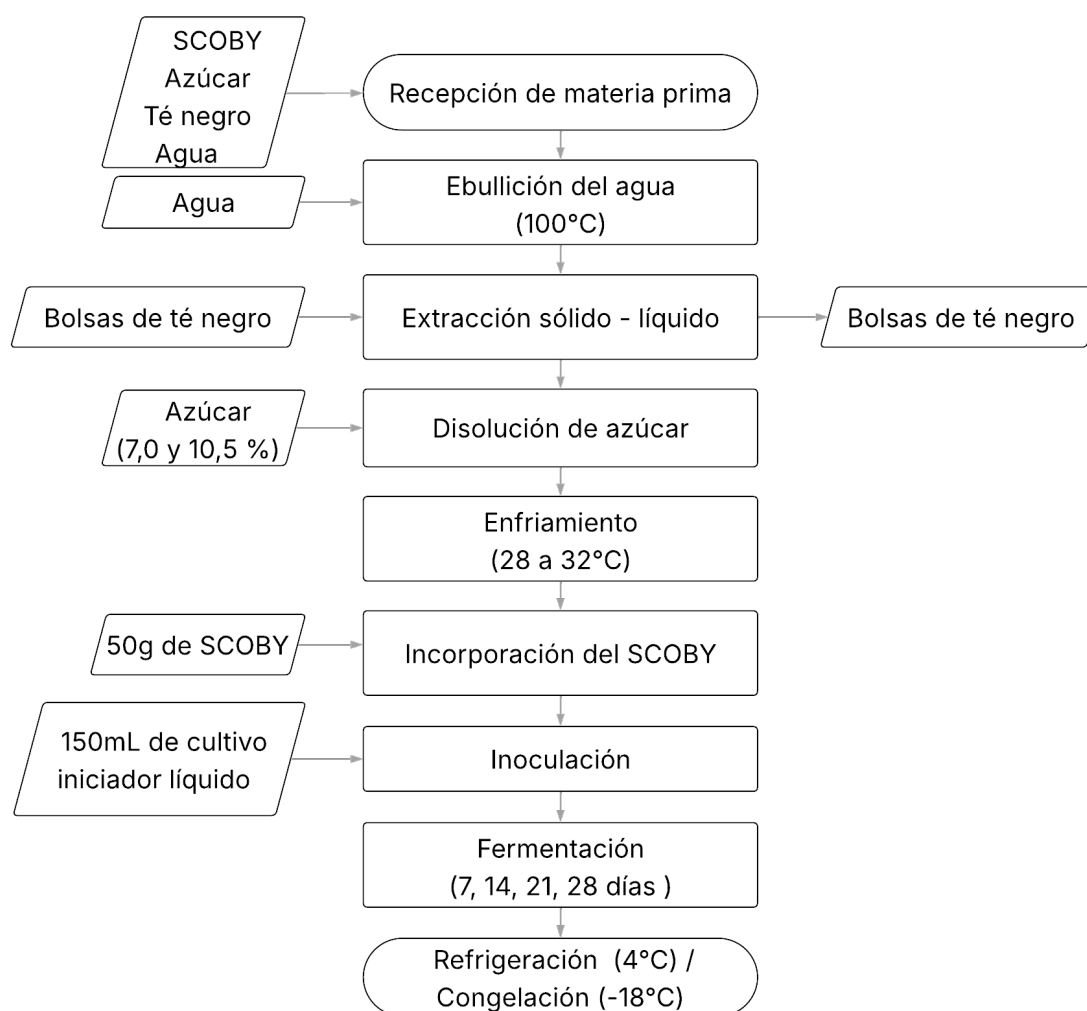
fermentación distintos (7, 14, 21 y 28 días). Para cada tiempo de fermentación se utilizaron frascos independientes y cada fermentación se llevó a cabo de forma separada, por lo que cada condición fue replicada tres veces. Adicionalmente, se consideraron diferentes estrategias de conservación del SCOBY con el fin de evaluar la estabilidad para los análisis posteriores.

A continuación, se presenta la metodología seguida para preparar las infusiones.

3.7.1 Preparación de infusiones

Figura 2

Diagrama de flujo de pruebas preliminares



Nota: Elaboración propia, 2025.

3.7.2 Descripción de etapas

El calentamiento del agua fue el primer paso en la preparación de la infusión de té; se utilizaron hervidores eléctricos de uso comercial y se controló la temperatura hasta alcanzar el punto de ebullición (100 °C). Este paso asegura la extracción eficiente de los compuestos del té y facilita disolver adecuadamente el azúcar. Es importante mencionar que se utilizaron 24 frascos de vidrio previamente lavados con una capacidad de cinco litros. Se añadió a cada frasco un litro de agua caliente.

Al alcanzar la ebullición, se colocaron seis bolsas de té negro a cada frasco de vidrio, por lo que se utilizaron en total 144 bolsas de té negro por cada lote de fermentación. Se dejaron reposar por 15 minutos para permitir la extracción sólido - líquida, para así lograr transferir los compuestos solubles del té al agua.

Finalizada la extracción y con el medio líquido aún caliente, se añadió el azúcar a cada frasco. Se utilizaron dos concentraciones de sustrato diferentes; la concentración A con 7,0 % m/v de azúcar en 12 frascos y los restantes 12 frascos con la concentración B, con 10,5 % m/v de azúcar. Una vez disuelto el azúcar, se añadieron 2 litros de agua a temperatura ambiente a cada frasco para disminuir su temperatura y ajustar la concentración final del azúcar. La infusión se agitó y se dejó en reposo, hasta alcanzar una temperatura entre 28 °C y 32 °C.

Cuando la infusión alcanzó la temperatura deseada, se añadieron 50 g de SCOBY y 150 mL de cultivo iniciador líquido, proveniente de la infusión que contiene los SCOBY madre. Posteriormente, los frascos se dejaron fermentar durante 7, 14, 21 y 28 días, en grupos de tres frascos independientemente por cada tiempo de fermentación y concentración de azúcar.

Como medida de control durante la fermentación, los frascos se cubrieron con una malla fina, lo que permitió la exposición al oxígeno necesaria para una

fermentación aerobia, mientras se prevenía la contaminación por insectos u otras partículas externas. Además, los frascos se mantuvieron protegidos de la luz directa durante todo el periodo de fermentación con el objetivo de preservar la estabilidad del medio.

Una vez finalizado el periodo de fermentación correspondiente, se procedió a realizar las mediciones de los parámetros fisicoquímicos del medio, es decir, pH, sólidos solubles, temperatura y tasa de crecimiento de la biomasa. Además, se tomó una muestra de 3 g para determinar la humedad del SCOBY.

Seguidamente, los SCOBY fueron almacenados por separado en bolsas laminadas e identificadas correspondientemente. Se utilizaron como medios de conservación la refrigeración a temperaturas de 4 °C y congelación a -18 °C. Estas dos técnicas fueron evaluadas con el fin de determinar cuál de ellas permitía mantener mejor las propiedades del SCOBY, sin afectar estructura, composición o funcionalidad.

Adicionalmente, se seleccionaron tres muestras de SCOBY obtenidas bajo distintas condiciones de fermentación y conservación, las cuales fueron analizadas en un laboratorio externo especializado (CITA - Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos) para la ejecución de los análisis proximales, con el objetivo de obtener una caracterización nutricional de la biomasa.

Las primeras dos muestras enviadas corresponden a la segunda prueba preliminar, específicamente del día 14 y 21 de fermentación, y fueron tomadas para ambas concentraciones de azúcar (7,0 % y 10,5 %). Estas muestras fueron conservadas en refrigeración y se les realizaron los siguientes análisis: ceniza, grasa cruda, humedad, proteína, fibra soluble y fibra insoluble.

La tercera muestra fue conservada en congelación y el laboratorio externo le realizó un pretratamiento conocido como liofilización. La muestra fue tomada del día 21 de fermentación con una concentración de 7,0 % de azúcar y se le realizaron los siguientes análisis: carbohidratos, ceniza, grasa cruda, humedad en fresco (en liofilizado), proteína, fibra soluble y fibra insoluble. Estos análisis preliminares permitieron orientar la selección de las condiciones y parámetros por evaluar en las pruebas definitivas, proporcionando una base para la caracterización composicional del SCOBY.

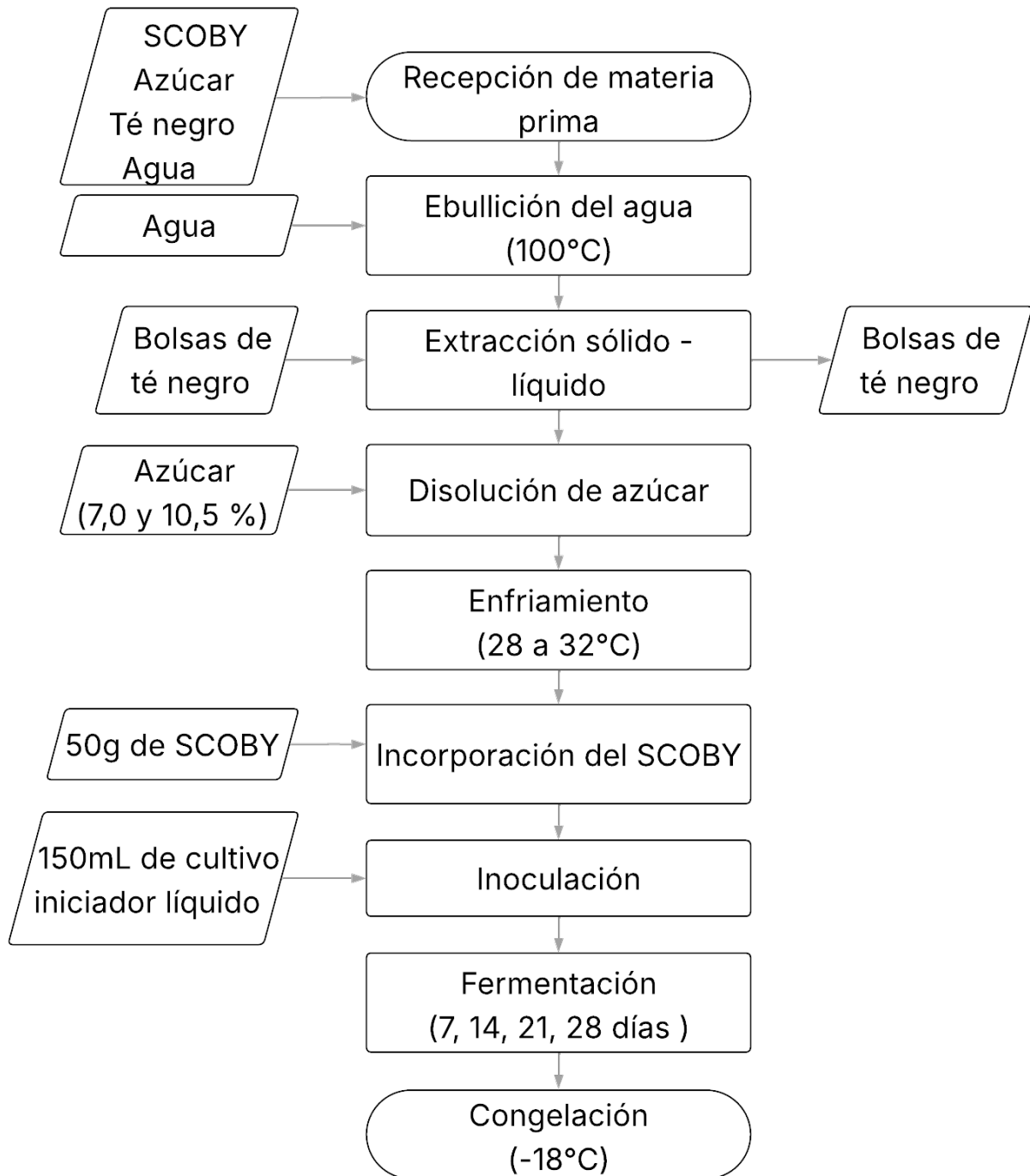
3.8 Pruebas definitivas

Con base en los resultados obtenidos durante las pruebas preliminares, se definió el procedimiento final para la ejecución de las pruebas definitivas. A lo largo de la fase preliminar, se lograron establecer los métodos adecuados en cuanto a la preparación de la muestra, condiciones de fermentación y manejo de muestras post fermentación. Básicamente, esta prueba se lleva a cabo bajo un diseño controlado y replicable, con el fin de generar datos confiables que permitieran una posterior evaluación estadística.

Para la prueba definitiva se optó exclusivamente por mantener las muestras en congelación a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, para conservar adecuadamente las propiedades y estructura del SCOBY. En la figura 3, se presenta el diagrama de flujo correspondiente.

Figura 3

Diagrama de flujo de pruebas definitivas



Nota: Elaboración propia, 2025.

3.9 Análisis fisicoquímicos

Los análisis fisicoquímicos se realizaron en el laboratorio 108 de la Universidad Técnica Nacional, sede Atenas. Estos se efectuaron por triplicado de forma independiente en los días 7, 14, 21 y 28 de fermentación, para cada concentración de azúcar utilizada. A continuación, se explica detalladamente el procedimiento realizado para cada parámetro.

3.9.1 pH

El pH se midió con un pHmetro digital marca APERA Instruments modelo PH20 pH Tester. Se calibró el pHmetro con *buffers* de 4 y 7 en los días 7, 14, 21 y 28 de fermentación. Una vez que el SCOBY fue extraído, se tomó una muestra de 20 mL del líquido contenido en los frascos y se colocó en un *beaker* de vidrio. Se limpió el electrodo del pHmetro con una pisseta de agua destilada. El electrodo se introdujo en la muestra de kombucha, asegurándose de que no tocara las paredes ni el fondo del *beaker*. Se esperó de 30-40 segundos hasta que la lectura de pH se estabilizara. Lo anterior se realizó por triplicado y se anotaron los valores en las hojas digitales destinadas para esto.

3.9.2 Sólidos solubles

Los sólidos solubles se midieron con el uso de un refractómetro marca Alla France, modelo 95000-011. Se calibró el refractómetro con agua destilada en los días 7, 14, 21 y 28 de fermentación. Se limpió con agua destilada la placa de luz del refractómetro y se secó cuidadosamente con toallas. Se tomó un gotero para extraer una muestra del líquido de la kombucha y se colocaron dos gotas sobre la placa de luz. Se enfocó el ocular y se leyó el valor dado. Lo anterior se realizó por triplicado,

los valores fueron expresados en °Brix y se anotaron en las hojas digitales destinadas para esto.

3.9.3 Temperatura

La temperatura se midió utilizando un termómetro digital marca Taylor, modelo 9842. Se tomó una muestra de 20 mL del líquido de la kombucha y se introdujo el termómetro previamente limpio y seco. Se esperó entre 40-60 segundos hasta que la lectura se estabilizó. Lo anterior se realizó por triplicado, los valores fueron expresados en grados centígrados y se anotaron en las hojas digitales destinadas para esto.

3.9.4 Tasa de crecimiento

La tasa de crecimiento se midió con base en el aumento de masa en los diferentes días de fermentación (7, 14, 21 y 28). En primera instancia, se sacaron los SCOBY de cada frasco y se dejaron escurrir por 15 min. en un escurridor. Se colocaron sobre una toalla de papel por 5 min. para terminar de extraer el líquido contenido entre las capas del SCOBY. Pasado el tiempo, se midió la masa del SCOBY con el uso de una balanza OCONY, modelo OCONY - SS. Los valores se anotaron en una hoja digital destinada para esto. Se calculó la tasa de crecimiento con base en la siguiente fórmula.

$$\text{Tasa de crecimiento} = \frac{\text{Aumento de masa (g)}}{\text{Masa inicial (g)}} \times 100 \quad (\text{ec. 9})$$

En donde, el aumento de masa representa la diferencia entre la masa inicial y la masa final. Finalmente, se guardaron y almacenaron los SCOBY según las especificaciones antes mencionadas.

3.10 Análisis proximal

Los análisis de composición química se realizaron por prestación de servicios. Las muestras fueron enviadas congeladas al Laboratorio San Martín para su posterior análisis; una vez entregadas, las muestras se mantuvieron congeladas a -20 °C hasta el momento de su análisis. Antes de efectuar los procedimientos de análisis, las muestras se descongelaron y se homogeneizaron en su totalidad. A continuación, se detallan los métodos utilizados para el análisis proximal de las muestras.

3.10.1 Humedad y cenizas

El método utilizado se basó en el procedimiento AOAC 923.03 con pequeñas modificaciones. Se realizó a través de un procedimiento gravimétrico, en donde se adicionó una masa de 10 g de muestra sobre una cápsula de porcelana a masa constante y se colocó en una estufa a 105 °C hasta alcanzar masa constante. Se calculó el porcentaje de humedad. Luego, la cápsula se colocó en una mufla y se llevó gradualmente hasta 550 °C. Se calcinó por una hora y se repitió el proceso hasta que se alcanzó una masa constante. Después, se calculó el porcentaje de cenizas.

3.10.2 Proteína

El método utilizado se basó en el AOAC 991.20 y se realizó la determinación por medio del método Kjeldahl. Se colocó una masa de 10 g de muestra en un tubo de digestión, se colocaron las pastillas de catalizadores y se adicionaron 12 mL de ácido sulfúrico. La muestra se digirió completamente en el bloque de digestión y, una

vez finalizada la digestión, se procedió a realizar la destilación. Para esto, se basificó con NaOH el digerido y el destilado se recolectó en disolución de ácido bórico al 4 %. Esta disolución se valoró con ácido clorhídrico estandarizado hasta que se alcanzó el punto final. Para la conversión del porcentaje de nitrógeno a proteína se utilizó un factor de 6,25.

3.10.3 Grasa cruda

El método se realizó por medio de Soxhlet basándose en AOAC 920.39. Previamente, la muestra fue secada en una estufa por 48 horas y, después, se colocó una masa de muestra seca de aproximadamente 4 g y se colocó en el sistema Soxhlet. La grasa se extrajo con una mezcla de éter-hexano. Luego, el solvente se removió con rotavapor y la grasa se obtuvo en el balón, el cual se llevó a masa constante.

3.10.4 Carbohidratos totales

Los carbohidratos totales se calcularon a partir de los resultados obtenidos de humedad, cenizas, proteína y grasa cruda, en donde se utilizó la ecuación 8.

3.10.5 Fibra dietética soluble e insoluble

Los métodos utilizados se basaron en el AOAC 985,29 y 991,43 por medio de un procedimiento enzimático-gravimétrico. Para el tratamiento enzimático, se colocó 1 g de muestra en un *beaker*, al que se le adicionaron 50 mL de *buffer* de fosfatos. Se agregó 0,1 mL de alfa amilasa y se calentó en baño de agua a 95 °C por 15 minutos. Se dejó enfriar y se ajustó el pH de la muestra a 7,5. Luego, se adicionó 0,1 mL de proteasa y se calentó a 60 °C por 30 minutos. Se dejó enfriar y se ajustó el pH a 4,3.

Se adicionó 0,1 mL de amiloglucosidasa y se calentó a 60 °C por 30 minutos. Finalmente, se dejó enfriar a temperatura ambiente.

3.10.5.1 Fibra insoluble. Se colocó una capa de celite sobre el crisol y se filtró la disolución obtenida en el punto 3.10.5. Se recolectó y guardó el filtrado para la determinación de fibra dietética soluble. El filtro se lavó con porciones de etanol 78 %, etanol 95 % y acetona, y se llevó a masa constante a 105 °C.

3.10.5.2 Fibra soluble. Al filtrado del punto 3.10.5.1 se le adicionaron cuatro volúmenes de etanol 95 % y se dejó precipitar por una hora. Se colocó una capa de celite sobre el crisol y se filtró la disolución obtenida en el punto anterior. Se lavó con porciones de etanol 78 %, etanol 95 % y acetona, y se llevó a masa constante a 105 °C.

3.11 Técnicas e instrumentos para recolección de información

La recolección de información se llevó a cabo mediante la elaboración de diferentes formatos para registrar los datos obtenidos en cada una de las etapas de la investigación, los cuales fueron digitalizados semanalmente utilizando la herramienta de Excel. Asimismo, se mantuvo una bitácora semanal con observaciones de aspectos relevantes de cada periodo de fermentación, utilizando la herramienta Word.

Según las observaciones encontradas, se documentó fotográficamente el crecimiento de la biomasa y cualquier otro aspecto que se considerara pertinente y que podría apoyar el análisis de resultados posteriormente. Además, es importante mencionar que todos los documentos se gestionaron en un Drive compartido.

3.12 Técnicas de análisis de la información

Los datos obtenidos de las pruebas fisicoquímicas y proximal se colocaron en hojas de Excel, en donde se mantuvo registro de todos los valores. La información se representa en forma de gráficos y tablas para simplificar su interpretación. Una vez que se obtuvieron todos los resultados, se realizó el análisis estadístico de varianza de dos vías (ANDEVA) para los valores de pH, sólidos solubles, temperatura, tasa de crecimiento y para todos los parámetros del análisis proximal.

Al obtener el efecto principal del tiempo de fermentación para cada parámetro fisicoquímico, se determinó si existe una diferencia significativa y, por consiguiente, se prosiguió con la ejecución de las pruebas Tukey HSD (post-hoc) para determinar en cuáles pares de tiempo es que se obtuvieron las diferencias. Para el efecto de la concentración del sustrato sobre la tasa de crecimiento y los sólidos solubles, se calcularon únicamente las medias para determinar en cuál porcentaje de azúcar se obtiene la mayor diferencia.

Los resultados de proteína se sometieron a una comparación entre las medias después del ANDEVA. Además, se ejecutó un cálculo de relación entre el contenido de proteína y la tasa de crecimiento mediante un gráfico de dispersión y un análisis de correlación. Todos estos análisis fueron realizados utilizando el software R y la interfaz RStudio.

IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 Resultados y análisis objetivo N.º 1

Para poder establecer las condiciones de la fermentación, así como el protocolo de obtención y mantenimiento de las muestras antes de su análisis, se realizaron tres pruebas preliminares.

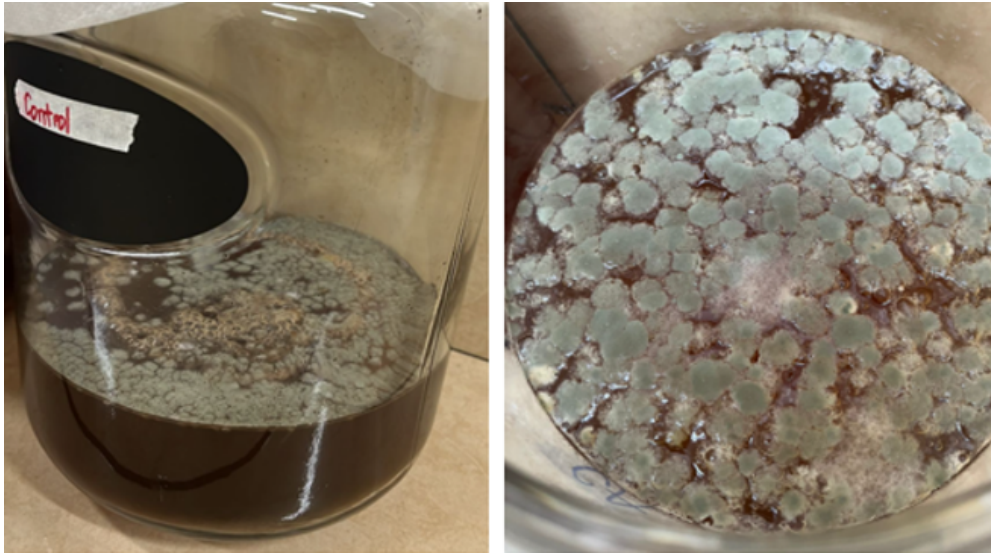
4.1.1 Prueba preliminar N.º 1

Para esta prueba, se trabajó con una concentración de sustrato de 7,0 % de azúcar, en 3,0 L de medio de cultivo líquido. Los resultados de la primera prueba realizada entre septiembre y octubre 2024 no fueron aptos para el proyecto, dado que las muestras se tuvieron que desechar por crecimiento evidente de hongos filamentosos y otros microorganismos, debido a la exposición a un ambiente contaminado (ver figura 4). Además de la contaminación visible, los medios de cultivo líquido se tornaron viscosos y con olor anormal, no característico del olor ácido de la kombucha.

Con respecto a lo anterior, Ojo y de Smidt (2023) mencionan que la kombucha presenta un alto riesgo de contaminación con microorganismos no deseados al inicio de la fermentación, por lo que la composición microbiológica inicial desempeña un papel fundamental. La presencia de contaminantes en las primeras etapas de la fermentación puede interferir con la interacción natural entre los microorganismos deseados, y, como mencionan Jarrell et al. (2022), condiciones de fermentación inadecuadas pueden generar el peligro de contaminar el medio con mohos que se encuentren en el aire y microorganismos presentes en el ambiente.

Figura 4

Evidencia visual de la contaminación microbiana durante la fermentación preliminar 1 (muestras desechadas): A = vista del frasco control contaminado; B = detalle de la contaminación superficial con hongos filamentosos



A

B

Nota: Elaboración propia, 2024.

La principal dificultad fue la falta de un lugar apto para poder llevar a cabo las fermentaciones, ya que, al estar cerca de los corrales de ganado y los cuartos de disección, además de no contar con infraestructura que permita mantener un ambiente controlado dentro del cuarto, el sitio brindado para trabajar no cumplió las condiciones mínimas necesarias para llevar a cabo fermentaciones aerobias controladas de forma inocua. Pese a que se realizaron varias jornadas de limpieza y desinfección del área, los resultados obtenidos fueron los mismos. Por lo tanto, se procedió a buscar otro espacio en la sede que permitiera desarrollar el proyecto.

4.1.2 Prueba preliminar N.º 2

Gracias a que se asignó un espacio controlado y con acceso más restringido dentro del laboratorio 108 de la Universidad Técnica Nacional, sede Atenas, se pudo completar un nuevo ciclo de fermentación controlada de 28 días entre los meses de octubre y noviembre de 2024. Los parámetros fisicoquímicos que se midieron para monitorear el avance de la fermentación fueron el pH, la temperatura y el contenido de sólidos solubles del medio de cultivo líquido. Además, se calculó la tasa de crecimiento del cultivo simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY), medida como el porcentaje de aumento de masa en el tiempo.

Esta segunda prueba permitió establecer cuatro tiempos de fermentación (7, 14, 21 y 28 días), dos concentraciones de sustrato (concentración A = 7,0 % m/v de azúcar; concentración B = 10,5 % m/v de azúcar), así como la cantidad de frascos biofermentadores necesarios para correr las pruebas definitivas. Las muestras de biomasa microbiana obtenidas para cada tiempo se mantuvieron en refrigeración.

Se enviaron al laboratorio muestras de la biomasa generada a los 14 y 21 días, para ambas concentraciones de azúcar, con el fin de realizar ensayos de composición química que permitieran conocer preliminarmente el contenido de proteína (el informe de resultados obtenidos se encuentra en el apéndice 1). Se puede observar que para el día 14, la biomasa generada en el sustrato de mayor concentración (B=10,5 % de azúcar) reporta un mayor contenido de proteína que la concentración 7 % ($0,202 \pm 0,020$ g/100g en comparación con $0,177 \pm 0,017$ g/100g). Sin embargo, para el día 21, los resultados fueron inversos ($0,222 \pm 0,021$ g/100g) para la concentración 7 % y ($0,169 \pm 0,016$ g/100g) para la concentración 10,5 %.

Para poder comparar estos resultados con los reportados en la literatura, los valores de contenido de proteína se pasaron a base seca. Como se muestra en la

tabla 1, estudios previos reportan contenidos de proteína cruda diversos, los cuales varían dependiendo de diferentes factores. Jayabalan et al. (2010) destacan un rango de 18-21 g/100g entre los días 14 y 21. Comparando con este estudio, los datos obtenidos en la prueba preliminar reflejan contenidos más bajos (2,57 g/100 para el día 14 y 3,22 g/100g base seca para el día 21). Sin embargo, Ahmed y Dirar (2005) destacan contenidos de 4,8 g/100g en 30 días de fermentación, lo cual se asemeja más a los datos obtenidos.

A pesar de esta semejanza, se decidió profundizar en la revisión bibliográfica con el fin de comprender mejor las razones del bajo contenido de proteína obtenido en las muestras de la segunda corrida. Se logró identificar que el mantenimiento refrigerado de las muestras podría estar provocando la degradación de proteína, lo cual se puede deber a que a bajas temperaturas la actividad microbiana y enzimática se ralentizan, pero no se detienen completamente.

Con respecto a lo anterior, Warner et al. (2005), citados por Zou et al. (2020), mencionan que, al almacenar productos en refrigeración, se pueden presentar cambios estructurales en las proteínas y en su oxidación. Además, Zou et al. (2020) afirmaron que, tras realizar su estudio, en el cual almacenaron carne de cerdo tres días en refrigeración a una temperatura de 4 °C, se determinó una degradación significativa de la proteína presente en la carne.

Las bacterias y levaduras que forman la comunidad simbiótica del SCOBY varían en función de su origen; sin embargo, los géneros mayormente identificados corresponden a bacterias del ácido acético (*Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Komagataibacter*), bacterias ácido-lácticas (*Lactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lacticaseibacillus*) y levaduras (*Brettanomyces*, *Cándida*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*) (Daniel et al., 2008; Içen et al., 2023).

El crecimiento de estos microorganismos no se detiene en refrigeración y, aunque las bajas temperaturas reducen su metabolismo, se continúan produciendo cambios que pueden afectar la composición de las muestras. Por ejemplo, según diversos estudios, el SCOBY se caracteriza por contener diversas enzimas como las proteasas, las cuales se encargan de degradar proteínas, por lo que el mantener las muestras a temperaturas entre 0 - 5 °C podría ocasionar que estas se degraden (Antolak et al., 2021).

También, el alto contenido de humedad de las muestras (superior al 90,7 %) podría estar afectando la sensibilidad del método de análisis (Artavia, comunicación personal, 27 de enero de 2025). Algunos autores aseguran que un contenido de humedad alto puede provocar una dilución en la concentración inicial de proteínas (Högg y Rauh, 2023).

Por tanto, para reducir al máximo la actividad metabólica, se consideró que era necesario mantener las muestras congeladas hasta su análisis ($T \leq 20$ °C). Además, aplicar una operación unitaria como la liofilización como parte del tratamiento previo de las muestras, podría contribuir a mantener su integridad (Pérez, comunicación personal, 21 de febrero de 2025).

Para la tercera prueba preliminar se consideró entonces el uso de liofilización en posteriores análisis, debido a que es un método de deshidratación suave que se ha utilizado para preservar los cultivos bacterianos y microbianos (Ramakrishnan, 2022). Además, extrae de manera segura la humedad de productos sensibles como ocurre con la mayoría de los productos de origen biológico, facilitando el almacenamiento a largo plazo (Karunnanithy et al., 2024).

4.1.3 Prueba preliminar N.º 3

Esta tercera corrida se realizó en el mes de marzo del 2025 y permitió confirmar las condiciones de fermentación con el objetivo de obtener suficiente biomasa para liofilizar las muestras y realizar los análisis. Se mandó a analizar una muestra del día 21, con una concentración de azúcar del 7,0 % (el informe de resultados se encuentra en el apéndice 2), y el contenido de proteína en base seca de la muestra liofilizada fue de 1,522 g/100 g, lo cual no evidencia una mejora en el contenido de proteína.

Este resultado se puede explicar porque, aunque la liofilización puede ser un método ideal para preservar proteínas en estado seco, en ocasiones puede afectar su integridad, debido a que el proceso de secado puede ejercer presión y provocar alteraciones conformacionales irreversibles en su estructura, lo que resulta en la inactivación de las funciones de la proteína. Asimismo, los factores estresantes pueden afectar la agregación de proteínas, la fragmentación y pérdida de actividad (Karunnamithy et al., 2024). Por lo anterior, se decidió continuar trabajando con la muestra fresca mantenida en congelación.

Se estableció entonces el protocolo final para las fermentaciones aerobias controladas de las pruebas definitivas, manteniendo las condiciones establecidas en la prueba preliminar 2: cuatro tiempos de fermentación (7, 14, 21 y 28 días) y dos concentraciones de azúcar (concentración de azúcar A = 7,0 % m/v, y concentración de azúcar B = 10,5 % m/v), así como para el mantenimiento de la muestra congelada hasta su análisis.

4.2 Resultados y análisis de los objetivos N.º 2 y N.º 3

En esta sección, se describen y analizan los resultados obtenidos para los objetivos N.º 2 y N.º 3. Se decidió reportarlos en una misma sección dado que ambos

factores, tiempo de fermentación y concentración de azúcar en el sustrato, se estudiaron simultáneamente para cada corrida de fermentación. Más adelante, cuando se hace el análisis estadístico, se establecen, para cada parámetro, las relaciones asociadas a ambos factores.

Se realizaron tres corridas definitivas de fermentación controlada, independientes entre sí, entre los meses de marzo y mayo del 2025.

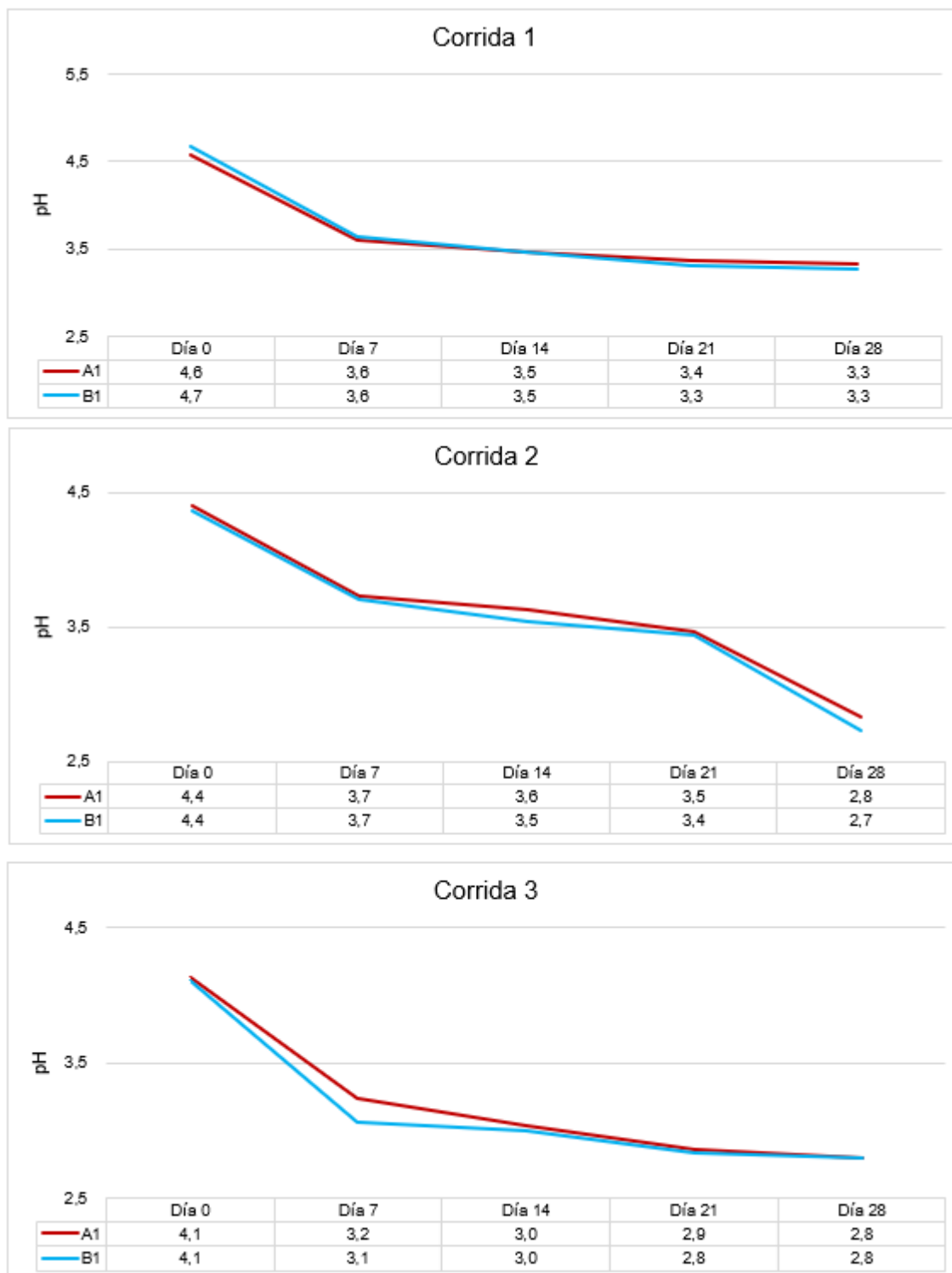
4.2.1 Seguimiento del avance de la fermentación

Para estudiar el avance de la fermentación, en cada corrida se monitorearon los parámetros fisicoquímicos de pH, contenido de sólidos solubles y temperatura. Estas mediciones se realizaron en el medio de cultivo líquido. A continuación, se describe el comportamiento de cada uno de los parámetros.

4.2.1.1 Comportamiento del pH en el medio de cultivo líquido. El monitoreo del pH en el medio de cultivo líquido evidenció que este disminuye conforme avanza el tiempo de fermentación. En la figura 5, se puede observar el comportamiento promedio del pH para las tres corridas realizadas.

Figura 5

Comportamiento promedio del pH del medio de cultivo líquido en función del tiempo de fermentación para las dos concentraciones de azúcar



Nota: A = 7,0 % azúcar; B = 10,5 % azúcar.

Con respecto al pH, el comportamiento observado es consecuente con lo que sucede durante la fermentación aerobia, en donde el azúcar se transforma en alcohol y, posteriormente, este se transforma en ácido acético. En términos específicos, el azúcar (sacarosa) adicionado en el medio se hidroliza en glucosa y fructosa, por la enzima invertasa producida por ciertas levaduras presentes en el SCOBY. Estos azúcares simples son utilizados como fuente de carbono por los microorganismos.

Después, algunas levaduras utilizan mayoritariamente la fructosa para producir etanol y dióxido de carbono por medio de una glucólisis (Greenwalt et al., 2000; Kallel et al., 2012; Jayabalan et al., 2014). El etanol es oxidado en acetaldehído por bacterias del ácido acético (AAB) contenidas en el SCOBY. Después, este compuesto es transformado en ácido acético. Al mismo tiempo, las *Acetobacterias* utilizan parte de la glucosa para producir otros ácidos orgánicos, como el glucónico, lo cual provoca que la acidez del medio aumente y, a su vez, que el pH disminuya. Esto se ve ejemplificado en la figura 5, en donde el pH promedio de ambas concentraciones disminuye durante el proceso fermentativo.

En el día cero, el pH promedio de los medios de cultivo es similar para ambas concentraciones de azúcar. Al pasar los primeros 7 días de fermentación, el pH disminuye prácticamente igual para ambas concentraciones de azúcar ($3,5 \pm 0,3$ para 7,0 % azúcar; $3,5 \pm 0,4$ para 10,5 % de azúcar). Lo anterior se asemeja a lo investigado por Vohra et al. (2019), quienes destacan en su artículo que, utilizando un medio de cultivo compuesto de té negro y azúcar blanca, el pH disminuye de 5,86 en el día 0 a 3,56 en el día 7.

De forma similar, Amarasinghe et al. (2018) mencionan que en la primera semana de fermentación el pH disminuye de 5,6 a 3,6, obteniendo resultados semejantes a los expuestos en esta investigación. Con este valor, se puede decir que

la kombucha no se encontraba contaminada, ya que Nummer (2013) asegura que si el pH en 7 días no disminuye hasta 4,6 o menos se considera que la muestra está contaminada.

Tomando de referencia el trabajo de Vohra et al. (2019), se puede decir que en el día 14 las muestras no sufren mayor cambio, ya que estos autores exponen una disminución de pH de 3,56 (día 7) a 3,36 (día 14). En la presente investigación, se alcanza un pH de $3,4 \pm 0,3$ en la concentración de 7,0 % y de $3,3 \pm 0,3$ en la concentración de 10,5 %. En otro estudio, Amarasinghe et al. (2018) aseguran que las muestras en las semanas 2 y 3 no presentan disminuciones significativas. Además, se muestra en el estudio de Zhao et al. (2018) que en el día 14 el pH tiene un valor de 3,74, ligeramente mayor al obtenido para ambas concentraciones de azúcar.

Algo similar sucede entre las semanas 3 y 4, en donde se obtiene una disminución para la concentración menor de $3,2 \pm 0,3$ a $3,0 \pm 0,3$ y de $3,2 \pm 0,3$ a $2,9 \pm 0,3$ para la mayor concentración de azúcar. Comparando con lo mencionado por otros autores, se tiene que Vohra et al. (2019) obtienen un valor de 3,27 después de 28 días de fermentación.

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías (los resultados se muestran en el apéndice 5) para identificar la relación entre el pH, el tiempo de fermentación y la concentración de azúcar. Los resultados aparecen en la tabla 3.

Tabla 3

Valores promedio de pH del medio de cultivo líquido para distintos tiempos de fermentación y para las concentraciones de azúcar

Concentración azúcar, % m/v	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
7,0	4,4 ± 0,2 a	3,5 ± 0,3 b	3,4 ± 0,3 b	3,2 ± 0,3 b	3,0 ± 0,3 c
10,5	4,4 ± 0,3 a	3,5 0,3± b	3,3 ± 0,3 b	3,2 ± 0,3 b	2,9 ± 0,3 c

Nota: Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($p > 0,05$) entre los valores. Letras diferentes indican que si hay diferencia significativa ($p \leq 0,05$).

El análisis estadístico reveló que no existe diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$) entre los valores de pH en función de las dos concentraciones de azúcar (7 % y 10,5 %). Por lo tanto, se evidencia que la cantidad de sustrato inicial utilizado no afecta significativamente el comportamiento del pH. Con respecto al tiempo de fermentación, se observa una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) en los valores de pH a través del tiempo. Es decir, el pH varía significativamente conforme avanza la fermentación, para ambas concentraciones de azúcar.

Dados los resultados, se realizó la prueba post-hoc de Tukey HSD para identificar diferencias más específicas entre las medias de pH de los distintos tiempos de fermentación; se determinó una disminución significativa entre el día 0 y los demás tiempos (7, 14, 21, 28), presentando una disminución drástica a partir del día 7.

Sin embargo, al comparar los valores entre el día 7 y 14 se evidencia que no existe una diferencia estadísticamente significativa, con lo cual se confirma lo mencionado por diferentes autores, quienes aseguran que en dichas semanas no se presenta una disminución significativa. De forma similar, se obtiene que en los días 14 y 21 no se presenta diferencia significativa entre los valores, lo cual puede deberse

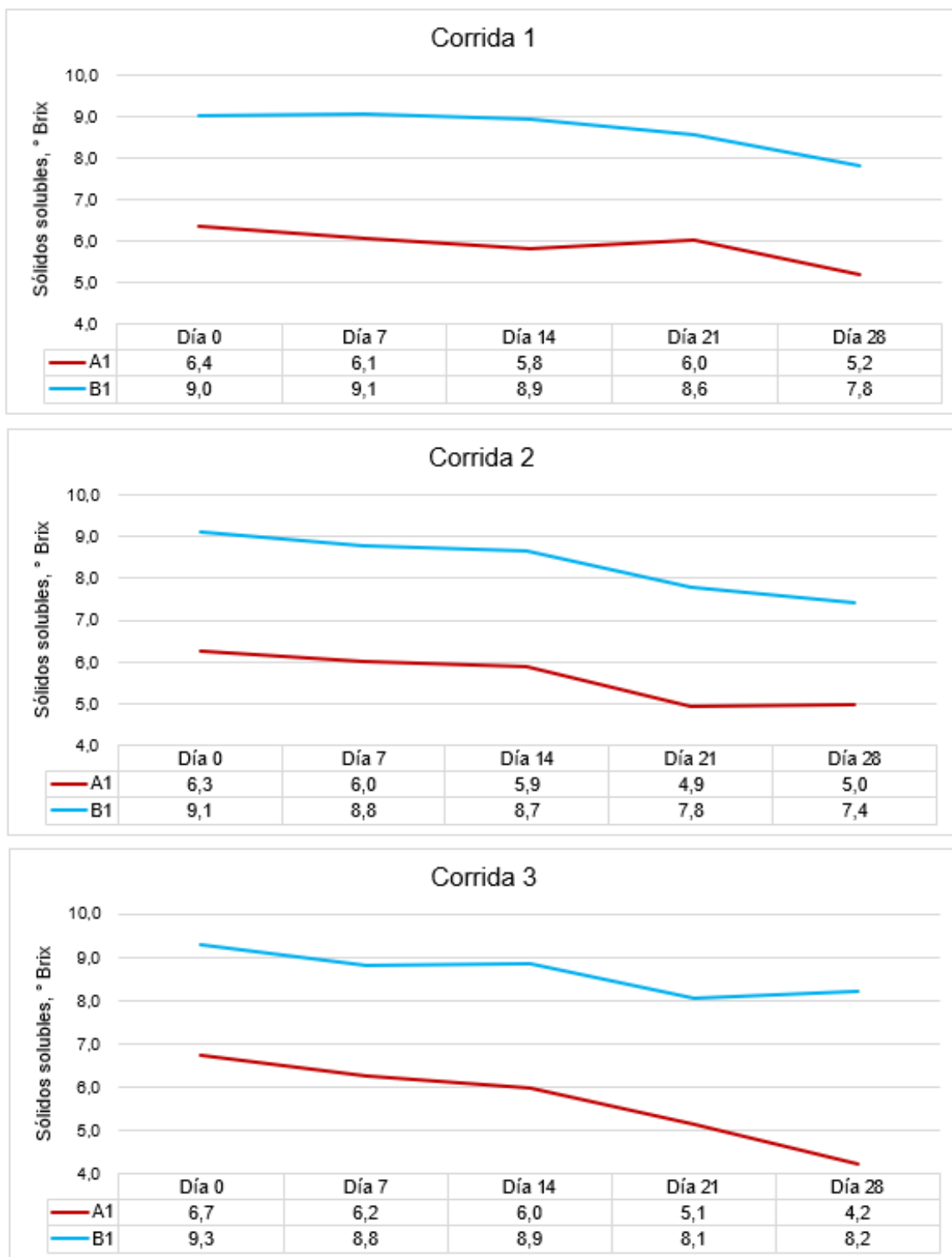
a que el pH a partir de la primera semana disminuye a un ritmo más lento. Finalmente, el valor de pH alcanzado en el día 28 sí es estadísticamente significativo comparado con los otros días, por lo que se puede decir que la fermentación continúa.

4.2.1.2 Comportamiento de los sólidos solubles en el medio de cultivo líquido. En el caso de los sólidos solubles, en general, como se muestra en la figura 6, en ambas concentraciones de azúcar, el contenido de sólidos solubles disminuyó conforme transcurrieron los días de fermentación. Es decir, se observó una disminución progresiva y casi constante de los sólidos solubles a medida que avanza el tiempo de fermentación.

El comportamiento de los sólidos solubles es esperado porque las bacterias y levaduras contenidas en el SCOBY consumen los azúcares del medio para producir diversos metabolitos. Según Jayabalan et al. (2014), la sacarosa es la fuente de carbono primaria utilizada por los microorganismos. Como se mencionó anteriormente, ciertas levaduras hidrolizan la sacarosa y por medio de glicólisis producen etanol. Por otro lado, las bacterias AAB utilizan la glucosa para producir ácido glucónico y el etanol para producir ácido acético. Sin embargo, la disminución es finita debido a que una cantidad considerable de sacarosa queda sin fermentar.

Figura 6

Comportamiento de los sólidos solubles en función del tiempo de fermentación, para ambas concentraciones de azúcar en el sustrato



Nota: A = 7,0 % azúcar; B = 10,5 % azúcar.

Como mencionan Jayabalan et al. (2014), en los primeros 7 días de fermentación, se estima que un 34 % de la sacarosa contenida en el medio se encuentra sin fermentar y en el día 21, aproximadamente, el 19 % del azúcar. Tomando esto en consideración se evidencia que, el contenido de sacarosa disminuye conforme transcurre el tiempo de fermentación, sin embargo, en el medio líquido queda disuelta un porcentaje considerable de azúcar.

El comportamiento observado se asemeja a lo obtenido por otros investigadores, en donde el contenido de sólidos solubles decrece con el pasar del tiempo. Por ejemplo, en el trabajo de Yii et al. (2024), se evidencian unos grados Brix de $8,8 \pm 0,2$ en el día 7 y estos disminuyen a $8,2 \pm 0,2$ en el día 21. Comparándolos con los resultados del presente trabajo se evidencia una clara diferencia porque los sólidos solubles iniciales son bastante diferentes, por el hecho de que el porcentaje de azúcar adicionado difiere entre ambos estudios. A pesar de esta diferencia, se puede observar un comportamiento similar en el caso de la concentración de 7 %, en donde en el día 7 se obtiene un valor de $6,1 \pm 0,1$ ° Brix y en el día 21 de $5,4 \pm 0,6$ ° Brix.

Si se observan de forma independiente los datos de las tres corridas, en algunos casos hubo un aumento puntual en el cambio de los sólidos solubles. Sin embargo, este aumento se justifica por el hecho de que algunas de las bacterias lácticas y acéticas producen exopolisacáridos solubles en agua; los cuales, a pesar de ser diferentes de los azúcares iniciales, pueden contribuir al aumento en el contenido de los mismos (Hassler et al., 2024). Además, Ramírez et al. (2022) aseguran que con el pasar del tiempo la producción de polisacáridos aumenta, llegando a su máximo en el día 21. Por lo tanto, este aumento en los grados Brix se pudo deber a que en la muestra se produjeron polisacáridos solubles en agua.

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías (resultados en el apéndice 4) para identificar la relación entre el contenido de sólidos solubles, el tiempo de fermentación y la concentración de azúcar (tablas 4 y 5). El análisis estadístico reveló que hay diferencia significativa ($p \leq 0,05$) en el contenido de sólidos solubles para cada tiempo de fermentación, mostrando ambas concentraciones de azúcar el mismo comportamiento.

Tabla 4

Contenido promedio de sólidos solubles en el medio de cultivo líquido para los distintos tiempos de fermentación y para una concentración inicial de 7,0 % de azúcar en el sustrato

Tiempo de fermentación	Sólidos solubles, ° Brix
Día 0	6,5 ± 0,3 a
Día 7	6,1 ± 0,1 a
Día 14	5,9 ± 0,1 a
Día 21	5,4 ± 0,6 b
Día 28	4,8 ± 0,5 c

Nota: Letras diferentes indican que si hay diferencia significativa ($p \leq 0,05$) entre los valores de sólidos solubles reportados.

Tabla 5

Contenido promedio de sólidos solubles en el medio de cultivo líquido para los distintos tiempos de fermentación y para una concentración inicial de 10,5 % de azúcar en el sustrato

Tiempo de fermentación	Sólidos solubles, ° Brix
Día 0	9,1 ± 0,2 a
Día 7	8,9 ± 0,2 a
Día 14	8,8 ± 0,1 a
Día 21	8,1 ± 0,4 b
Día 28	7,8 ± 1,8 c

Nota: Letras diferentes indican que si hay diferencia significativa ($p \leq 0,05$) entre los valores de sólidos solubles reportados.

Como era de esperar, por el mayor contenido de azúcar añadido al medio de cultivo, las diferencias de contenido de sólidos solubles son significativas al comparar los resultados para ambas concentraciones de azúcar, es decir, el contenido de sólidos solubles es significativamente mayor en la concentración de sustrato de 10,5 %; sin embargo, con respecto al comportamiento mostrado en el descenso de este parámetro fisicoquímico, el efecto del tiempo de fermentación en los sólidos solubles no depende de la concentración inicial de azúcar en el sustrato.

4.2.1.3 Comportamiento de la temperatura del medio de cultivo líquido.

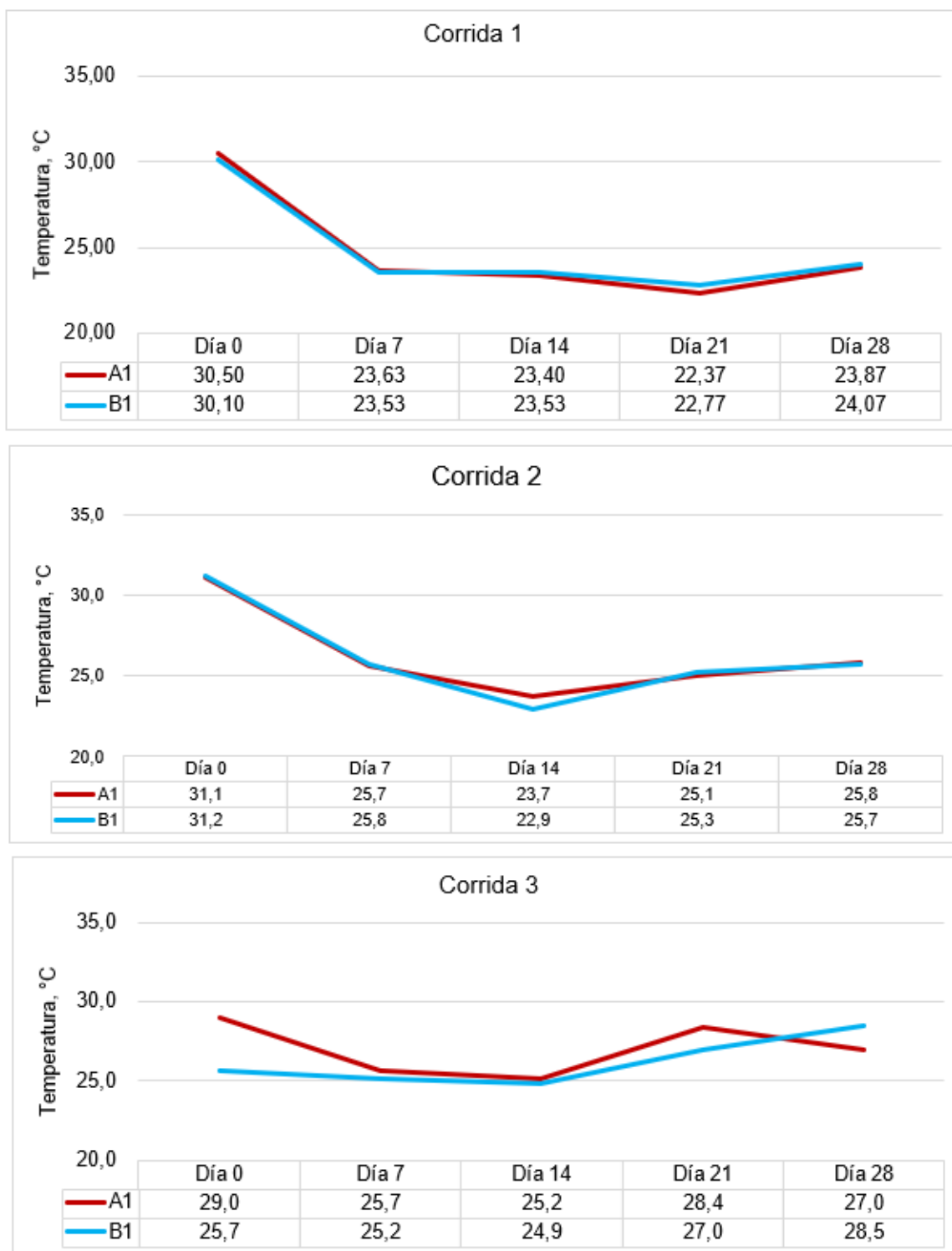
Debido a que los microorganismos tienen rangos de temperatura óptima para su crecimiento, la temperatura del medio de cultivo es otro de los parámetros que se estudió durante los diversos días de fermentación. Los resultados obtenidos se encuentran en la figura 7 y muestran un descenso entre el día de inicio y el día 7 de la fermentación, hasta alcanzar un equilibrio en el tiempo.

Los valores de temperatura estuvieron dentro del rango de 20 a 32 ° C reportado por distintos autores para la elaboración de la kombucha (Jayabalan et al., 2014; Wang et al. 2022; Nyhan et al., 2022; Cultures for Health, 2023). Las temperaturas del control inicial (día 0), no se ven afectadas por la actividad fermentativa, ya que, se relacionan con la preparación del medio, por lo que el comportamiento observado permite afirmar que, con el transcurrir del tiempo, la temperatura del medio de cultivo se equilibró con la temperatura ambiente del lugar en donde se realizó el estudio.

Esto se debe a que la temperatura es una variable independiente del proceso de fermentación, ya que los procesos metabólicos de conversión de azúcar en ácido acético realizados por el SCOBY no producen reacciones exotérmicas que afecten la temperatura del medio de cultivo.

Figura 7

Comportamiento de la temperatura del medio de cultivo líquido a lo largo del tiempo de fermentación para ambas concentraciones de azúcar



Nota: A = 7,0 % azúcar; B = 10,5 % azúcar.

Según lo evidenció el ANDEVA (apéndice 5), el comportamiento de la temperatura no se ve influenciado por la concentración inicial de azúcar en el sustrato, pero el tiempo de fermentación sí influye en el comportamiento de este parámetro.

Luego de realizar la prueba de Tukey HSD, se concluyó que la media de temperatura del día 0 es significativamente diferente con respecto a las medias del resto de días monitoreados, lo cual se debe a que es el día en que se prepara la infusión para iniciar la fermentación. Sin embargo, a partir del día 7, los datos no muestran diferencias estadísticamente significativas, lo que sugiere que efectivamente la temperatura se mantiene estable y en equilibrio con el ambiente.

En el día 28, se observa una diferencia significativa en el comportamiento de la temperatura con respecto al día 14 y anteriores. Como se mencionó anteriormente, la temperatura del cultivo se equilibra con la temperatura ambiente y para este incremento del día 28, se tiene una causa asignable, la cual es que a partir del día 16 se encendió por menos tiempo durante el periodo evaluado, el aire acondicionado del laboratorio en donde se realizaron las fermentaciones. Las tablas 6 y 7 muestran los resultados obtenidos.

Tabla 6

Comportamiento de la temperatura promedio en función del tiempo de fermentación, para la concentración de 7,0 % de azúcar en el sustrato

Tiempo de fermentación	Temperatura, °C
Día 0	30,2 ± 1,1 a
Día 7	25,0 ± 1,2 b
Día 14	24,1 ± 1,0 b
Día 21	25,1 ± 3,0 b,c
Día 28	25,6 ± 1,5 c

Nota: Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($p > 0,05$) entre los valores. Letras diferentes indican que si hay diferencia significativa ($p \leq 0,05$).

Tabla 7

Comportamiento de la temperatura promedio en función del tiempo de fermentación, para la concentración de 10,5 % de azúcar en el sustrato

Tiempo de fermentación	Temperatura, °C	
Día 0	29,0 ± 2,9	a
Día 7	24,8 ± 1,2	b
Día 14	23,8 ± 1,0	b
Día 21	25,0 ± 2,1	b,c
Día 28	26,1 ± 2,2	c

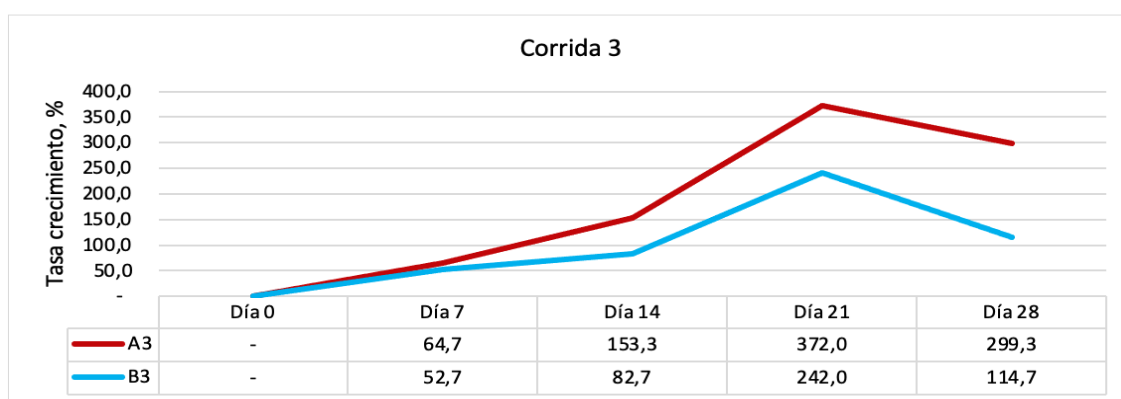
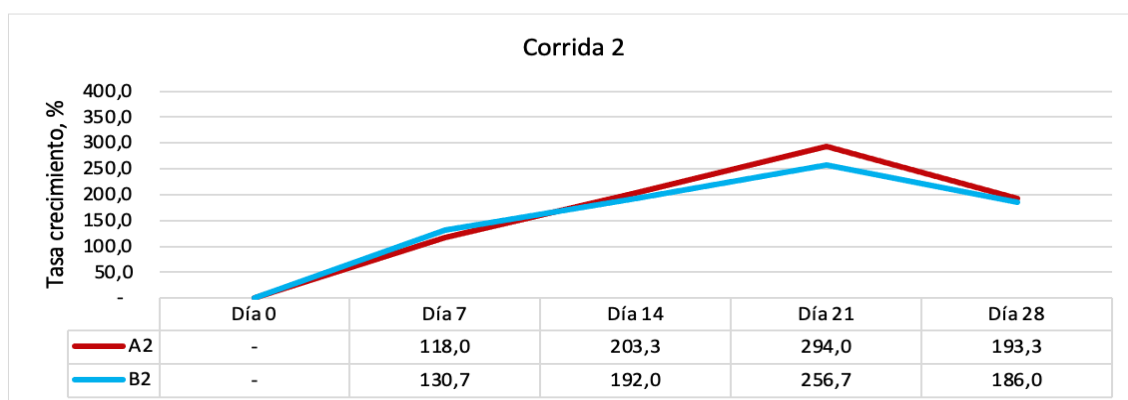
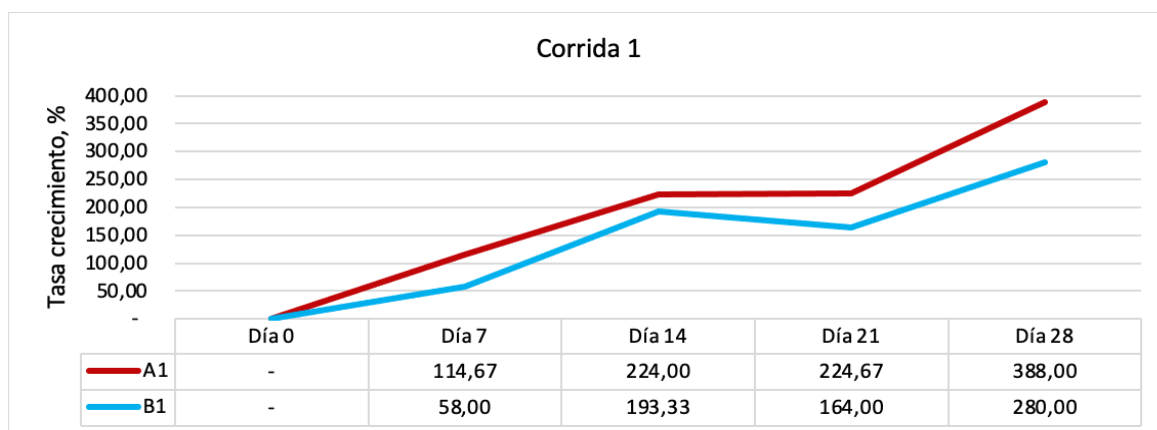
Nota: Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($p > 0,05$) entre los valores. Letras diferentes indican que si hay diferencia significativa ($p \leq 0,05$).

4.2.1.4 Comportamiento del crecimiento del SCOBY a lo largo del tiempo de fermentación. Uno de los objetivos más importantes del presente trabajo es conocer la tasa de crecimiento del SCOBY (aumento de masa en el tiempo dividido entre la masa inicial del cultivo), con el fin de evaluar en qué tiempo de fermentación y a que concentración de azúcar se presenta el mayor aumento de masa, para poder relacionarlo con la composición química del cultivo.

Durante el proceso de fermentación, las bacterias del género *Acetobacter*, específicamente, *Acetobacter xylinum* son las encargadas de la producción del *biofilm* de celulosa, el cual se considera un metabolito secundario de este proceso. Esta bacteria forma una matriz gelatinosa que hace que el SCOBY aumente de masa y grosor (Loor, 2022). En la figura 8, se muestra la evolución de la tasa de crecimiento del SCOBY, medición relativa que considera la masa obtenida en cada tiempo, dividida entre la masa inicial de cultivo.

Figura 8

Comportamiento de la tasa de crecimiento del SCOBY en función del tiempo de fermentación, para ambas concentraciones de azúcar en el sustrato



Nota: A = 7,0 % azúcar; B = 10,5 % azúcar.

Analizando la figura 8, se observa que, a grandes rasgos, la tasa de crecimiento aumenta conforme transcurren los días de fermentación. En el caso del día 7, se observa un promedio de crecimiento para la concentración de 7 % de azúcar del $99,1 \pm 29,88$ %, mientras que, para la concentración de 10,5 % se observa un crecimiento menor ($80,4 \pm 43,58$ %). Comparando los resultados con la literatura, se observa un comportamiento similar en el estudio de Jarrell et al. (2022) para el caso de la concentración 7 %, en donde, se determina una tasa de crecimiento de 90 % en concentración de azúcar del 6,2 %.

En los días 14 y 21 de fermentación, se obtiene un comportamiento similar, en el que el crecimiento para la concentración de 7 % ($193,6 \pm 36,33$ % y $296,9 \pm 73,7$ %) resulta mayor que el de la concentración de 10,5 % ($156,0 \pm 63,51$ % y $220,9 \pm 49,8$ %). Esto se puede deber a diversos factores, entre los cuales resalta el contenido de azúcar. Chong et al. (2024) mencionan que el comportamiento de crecimiento del SCOBY depende de la disponibilidad de nutrientes que pueden metabolizar los microorganismos, así como del pH inicial del medio.

El azúcar es esencial para el proceso de fermentación, el cual está completamente ligado con el crecimiento del SCOBY. En el estudio de Avcioglu et al. (2021), se afirma que concentraciones de glucosa del 6 % son óptimas para la producción de celulosa y se observa que un incremento en la concentración de glucosa en el medio acarrea un decrecimiento en la producción de este compuesto.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo descrito por Avcioglu et al. (2021), ya que la tasa de crecimiento del SCOBY fue mayor en el sustrato con una concentración del 7 % de azúcar. Sin embargo, esto contradice la teoría expuesta por Bhat et al. (2012), quien afirma que la concentración óptima de azúcar para el crecimiento de SCOBY se da alrededor del 12 % pero, concuerdan en que

concentraciones de azúcar mayores (14 - 16 %) reducen el crecimiento de la masa debido al estrés osmótico.

Otro de los factores que puede afectar es el porcentaje de té negro que, según Avcioglu et al. (2021) afecta directamente el crecimiento. Según estos autores, el porcentaje de té negro utilizado podría ser uno de los factores que afectó el crecimiento. En su estudio encontraron que la concentración de té negro óptima para el crecimiento de la biomasa es del 1 %. Es importante mencionar que, en el presente estudio, el porcentaje de té utilizado es de 0,44 % y aunque se encuentra dentro del rango establecido por los autores, no es la concentración óptima recomendada, lo que podría afectar la tasa de crecimiento del SCOBY.

Otro aspecto importante por considerar corresponde a la cantidad de SCOBY inicial utilizada para la inoculación. Setyaningsih et al. (2025) evaluaron el uso de flor de Jamaica y diferentes cantidades de SCOBY inicial para la fermentación de kombucha. Después de dos semanas, se encontró que, agregando 25 g de SCOBY, se obtiene la mayor tasa de crecimiento (160 %).

Este valor se asemeja al obtenido en 14 días de fermentación para la concentración de 10,5 %, en donde se determina una tasa de crecimiento del $156,0 \pm 63,5$ %. Sin embargo, difiere en el caso de la concentración 7,0 % de azúcar, en la que al añadir 50 g iniciales de SCOBY se obtiene una tasa de crecimiento de $193,6 \pm 36,3$ %. Por lo tanto, se puede decir que tanto el contenido de sustrato como el SCOBY inicial agregado pueden afectar la tasa de crecimiento.

Teniendo esto en consideración, se efectúa el análisis estadístico y, según se muestra en las tablas 8 y 9, el ANDEVA evidenció que hay diferencia significativa ($p \leq 0,05$) en el crecimiento de la biomasa en función del tiempo de fermentación. El análisis evidenció, además, que existe una diferencia significativa ($p \leq 0,05$) en la tasa

de crecimiento microbiano para las dos concentraciones de azúcar, siendo que la concentración de sustrato del 7 % resulta en una tasa de crecimiento microbiano significativamente mayor en comparación con la concentración de 10,5 %. También evidenció que el efecto del tiempo de fermentación en el crecimiento microbiano no depende significativamente de la concentración de sustrato (figura 9).

Tabla 8

Comportamiento de la tasa de crecimiento en función del tiempo de fermentación, para la concentración de 7,0 % de azúcar en el sustrato

Tiempo de fermentación	Tasa de crecimiento, %
Día 7	99,1 ± 29,9 a
Día 14	193,6 ± 36,3 b
Día 21	296,9 ± 73,7 c
Día 28	257,6 ± 56,5 c

Nota: Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($p > 0,05$) entre los valores. Letras diferentes indican que sí hay diferencia significativa ($p \leq 0,05$).

Tabla 9

Comportamiento de la tasa de crecimiento en función del tiempo de fermentación, para la concentración de 10,5 % de azúcar en el sustrato

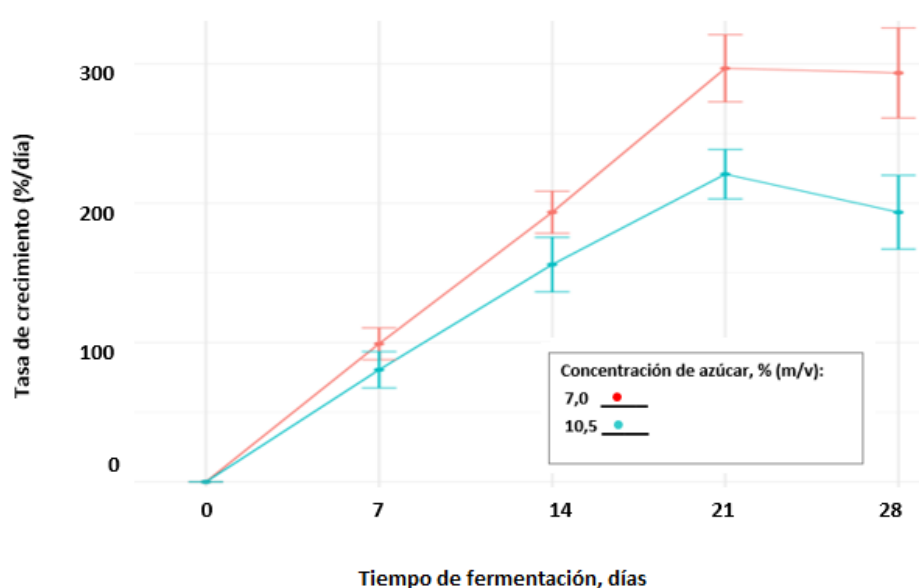
Tiempo de fermentación	Tasa de crecimiento, %
Día 7	80,4 ± 45,6 a
Día 14	156,0 ± 63,5 b
Día 21	220,9 ± 49,8 c
Día 28	193,6 ± 82,9 c

Nota: Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($p > 0,05$) entre los valores. Letras diferentes indican que sí hay diferencia significativa ($p \leq 0,05$).

En la figura 9, se muestra el gráfico de interacción del comportamiento de la tasa de crecimiento en función de los distintos factores estudiados y se aprecia que cada concentración de azúcar se comporta de manera independiente, siendo la concentración de un 7,0 % (m/v) la que muestra un mayor crecimiento.

Figura 9

Interacción entre el tiempo de fermentación y concentración de azúcar en función de la tasa de crecimiento



Al aplicar el análisis de comparación de medias de Tukey HSD para el tiempo de fermentación, se observó que al día 14 se obtiene una tasa de crecimiento significativamente menor que en el día 21, diferencia que no es significativa ($p > 0,05$) entre los días 21 y 28. El comportamiento observado puede deberse a que el crecimiento llega a estabilizarse en el tiempo, alcanzando el pico de crecimiento exponencial que le permite el suministro de nutrientes del medio de cultivo líquido. Según un estudio realizado por Nguyen et al. (2025), el crecimiento en el día 7 (27,3 g/L) presenta un aumento significativo ($p \leq 0,05$) hasta llegar al día 14 (95,3 g/L), y,

posteriormente, en el día 21 se mantiene estable (95,2 g/L). En el presente trabajo esto difiere, ya que el análisis de Tukey evidenció que en el día 14 se obtiene una tasa de crecimiento significativamente menor que en el día 21.

En el estudio de Majumder et al. (2021), se analizó el ritmo de crecimiento del SCOBY en diferentes condiciones y se evidenció una fase inicial de latencia de aproximadamente 3 días, seguida de una fase de crecimiento exponencial que llega hasta el día 6. Finalmente, los microorganismos entran a una fase estacionaria entre los días 6 y 8, hasta llegar a la fase de muerte a partir del día 10. Tomando esto como base, se puede decir que en la presente investigación la duración de las fases de crecimiento difiere, pues el SCOBY continuó desarrollándose hasta el día 21 y, a partir de ahí, podría empezar a manifestarse la fase estacionaria en la que los nutrientes se están agotando. En consecuencia, en el día 28 no se presenta gran diferencia en el crecimiento.

4.2.2 Composición química del SCOBY. Uno de los antecedentes que motivó la realización de la presente investigación fue el reporte previo de contenidos de proteína significativos en cultivos simbióticos de bacterias y levaduras utilizados en la producción de diferentes tipos de kombucha. En las tablas 10 y 11, se muestran los resultados promedio obtenidos para la composición química proximal del SCOBY en estudio.

Tabla 10

Composición química promedio del SCOBY (g/100 g) en función del tiempo de fermentación, para la concentración de 7,0 % de azúcar en el sustrato

Parámetro (g/100g)	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
Humedad	93,03 ± 0,22	93,60 ± 0,24	94,15 ± 0,81	94,48 ± 0,47
Cenizas	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00
Grasa total	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,03	0,02 ± 0,01
Proteína	0,16 ± 0,02	0,15 ± 0,04	0,15 ± 0,03	0,15 ± 0,01
Carbohidratos totales	6,74 ± 0,21	6,17 ± 0,22	5,62 ± 0,84	5,31 ± 0,48
Fibra dietética soluble	1,67 ± 0,08	1,93 ± 0,04	2,22 ± 0,14	2,42 ± 0,13
Fibra dietética insoluble	32,64 ± 0,48	25,19 ± 0,69	32,42 ± 0,23	42,79 ± 0,82

Notas: (1) Elaboración propia con base en el informe de resultados (apéndice 5).

(2) Los valores reportados corresponden al promedio, n = 3.

Tabla 11

Composición química promedio del SCOBY (g/100 g) en función del tiempo de fermentación, para la concentración de 10,5 % de azúcar en el sustrato

Parámetro (g/100g)	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
Humedad	91,28 ± 1,83	90,75 ± 0,61	91,68 ± 1,04	91,71 ± 0,32
Cenizas	0,02 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01
Grasa total	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Proteína	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,17 ± 0,03	0,16 ± 0,01
Carbohidratos totales	8,51 ± 1,82	9,02 ± 0,63	8,10 ± 1,06	8,08 ± 0,30
Fibra dietética soluble	2,04 ± 0,07	1,66 ± 0,05	2,04 ± 0,02	2,01 ± 0,01
Fibra dietética insoluble	21,78 ± 0,10	19,75 ± 0,15	20,00 ± 0,29	22,12 ± 0,22

Notas: (1) Elaboración propia con base en el informe de resultados (apéndice 5).

(2) Los valores reportados corresponden al promedio, n = 3.

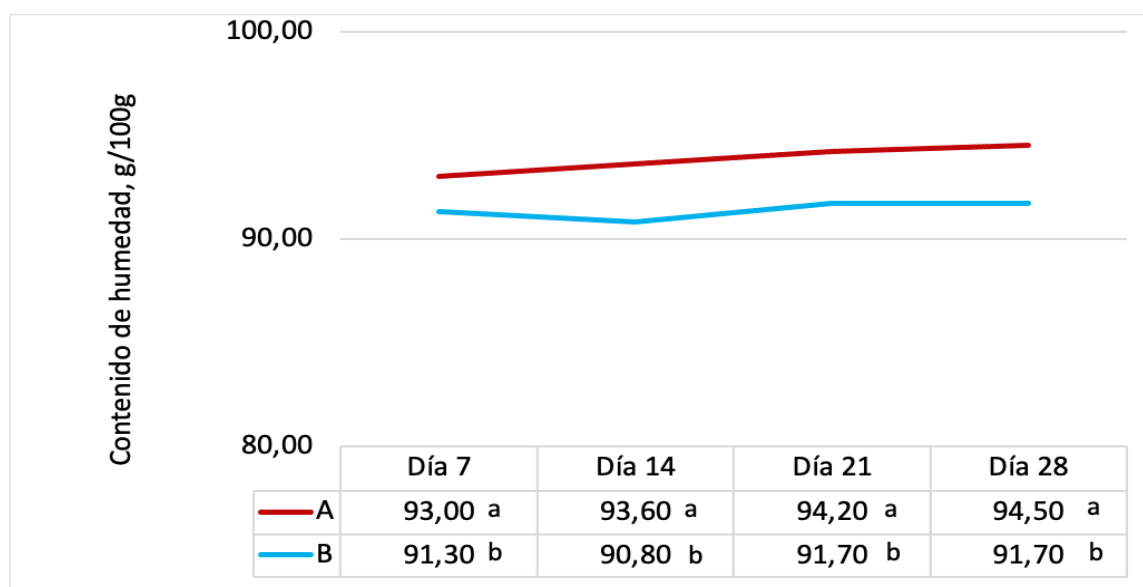
Como se puede apreciar, el componente mayoritario del SCOBY es la humedad, seguido de los carbohidratos totales. El contenido de grasa y de cenizas es prácticamente despreciable, ya que se encuentra en el orden del segundo decimal. Con respecto a la proteína, se encuentra en un rango relativamente bajo.

A continuación, se discuten los resultados de cada parámetro por separado.

4.2.2.1 Contenido de humedad. Como se aprecia en la figura 10, los resultados obtenidos muestran que, para ambas concentraciones de azúcar en el sustrato, la humedad del SCOBY aumenta conforme avanza el tiempo de fermentación.

Figura 10

Comportamiento del contenido de humedad en función del tiempo de fermentación, para las dos concentraciones de azúcar en el sustrato



Notas: (1) A = 7,0 % azúcar; B = 10,5 % azúcar. (2) Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($p > 0,05$) entre los valores. Letras diferentes indican que sí hay diferencia significativa ($p \leq 0,05$).

Como resultado del ANDEVA de dos vías, se obtuvo que la humedad no se ve afectada significativamente por el tiempo de fermentación ($p > 0,05$), pero sí por la concentración de azúcar en el sustrato. La media de humedad para la concentración de 7,0 % es de $93,8 \pm 0,71$, significativamente mayor ($p \leq 0,05$) que la media $91,4 \pm 1,03$ reportada para la concentración de 10,5 %. Estos resultados se acercan a los reportados por das Chagas et al. (2024), quienes reportaron un contenido de humedad de $94,02 \pm 0,08$ g/100 g, en SCOBY obtenido por fermentación de té negro con azúcar al 10 %, debido a la presencia de microorganismos ricos en agua (levaduras y bacterias).

Asimismo, Wang et al. (2023a) reportaron que la celulosa bacteriana producida por el SCOBY tiene alta capacidad de retención de agua, lo que se traduce a un contenido de humedad de $94,68 \pm 0,05$ % tras 14 días de fermentación, lo cual es mayor que los datos obtenidos para el mismo día en ambas concentraciones de azúcar.

El dato descrito por el autor anterior se relaciona con los resultados obtenidos en los días 21 y 28 para la concentración del 7 %, debido a que, a medida que avanza la fermentación, se incrementa la formación y el desarrollo de la celulosa bacteriana; sus propiedades fisicoquímicas, como la alta capacidad de absorción de agua, la permeabilidad, la alta resistencia a la tracción, la estructura cristalina y la biocompatibilidad favorecen la retención de humedad (El - Gendi et al., 2022).

El contenido de humedad puede afectar significativamente las propiedades físicas y funcionales del SCOBY, como la fluidez, la cohesión y la compresibilidad. Un exceso de humedad podría comprometer la estabilidad, favoreciendo el deterioro o la pudrición del material (Tirado et al., 2015).

Dado el alto contenido de humedad del SCOBY y, para facilitar la discusión y comparación con estudios previos, se decidió reportar el contenido de los demás nutrientes en base seca.

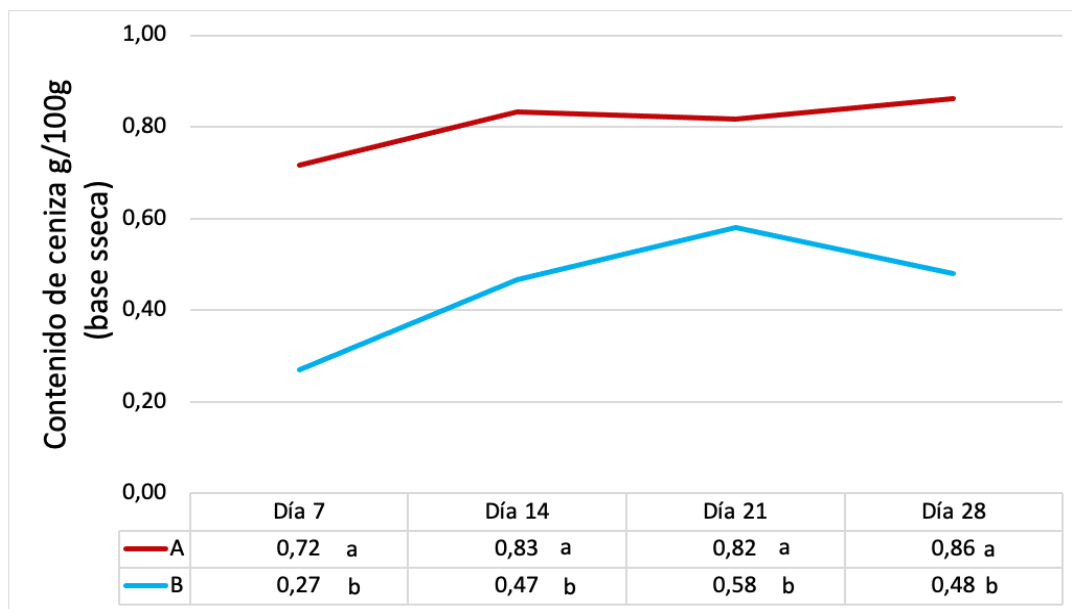
4.2.2.2 Contenido de ceniza. Con respecto al contenido de cenizas, como se aprecia en la figura 11, en general, para ambas concentraciones de azúcar, los resultados muestran una tendencia creciente conforme avanza el tiempo de fermentación. El resultado observado en el día 7 para la concentración de 7 % resulta mayor que el reportado por das Chagas et al. (2024) a 0 días de fermentación. Esto concuerda con el estudio de Jayabalan et al. (2010), quienes afirman que, conforme transcurre la fermentación, aumenta la composición química del cultivo.

Para la concentración 10,5 % se obtiene un porcentaje menor en comparación con ambos estudios y al transcurrir los días se observa una fluctuación entre los valores, ejemplificando un comportamiento no lineal. Mientras que, en la concentración 7 %, sí hay aumento progresivo del contenido hasta llegar al final con un $0,86 \pm 0,28$ g/100g. Estos valores son menores que el valor de Ahmed y Dirar (2005), quienes obtienen 1,5 g/100g en 30 días de fermentación, lo cual podría deberse al menor tiempo de fermentación.

Sin embargo, Murugesan et al. (2005) determinan un contenido de $2,64 \pm 0,04$ g/100g en 0 días de fermentación y es mayor que los valores obtenidos en este estudio. Por ello, se confirma que existen otros factores que pueden afectar la composición; la composición química del cultivo simbiótico de bacterias y levaduras puede verse afectada por factores como el sustrato utilizado, el origen de los microorganismos y el periodo entre la toma de las muestras y el análisis efectuado (Jayabalan et al., 2010; das Chagas et al., 2024).

Figura 11

Comportamiento del contenido de cenizas (base seca) en función del tiempo de fermentación, para las dos concentraciones de azúcar en el sustrato



Notas: (1) A = 7,0 % azúcar; B = 10,5 % azúcar. (2) Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($p > 0,05$) entre los valores. Letras diferentes indican que sí hay diferencia significativa ($p \leq 0,05$).

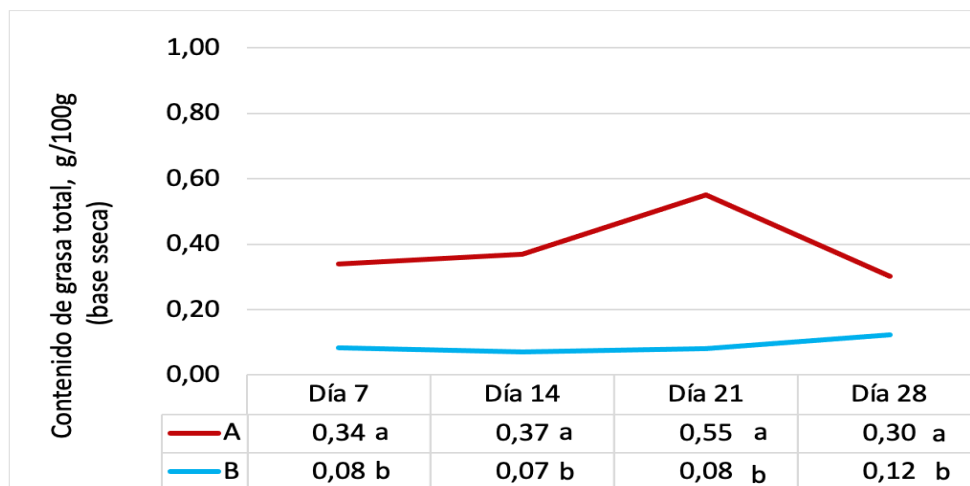
Al comparar las metodologías de diferentes investigaciones, se determina que la principal diferencia entre los valores puede ser atribuida al origen y tipos de microorganismos que conforman el SCOBY, ya que los otros factores (azúcar, té, entre otros) son similares entre sí. Finalmente, con el ANDEVA se concluye que no hay una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$) en el contenido de ceniza en base seca a lo largo de los cuatro tiempos de fermentación (7, 14, 21, 28 días). Con respecto a la concentración de azúcar, se determina que sí existe diferencia significativa ($p \leq 0,05$). Esto confirma que, en la menor concentración de azúcar, se obtiene un contenido de cenizas significativamente mayor.

4.2.2.3 Contenido de grasa total. Según los resultados obtenidos en la figura 12, el contenido de grasa presente en el SCOBY es prácticamente despreciable. Esto puede deberse a que, como se destacó en secciones anteriores, los microorganismos presentes utilizan como fuente principal de carbono el azúcar, el cual convierten en etanol y, posteriormente, en ácidos orgánicos. Además, las bacterias de los géneros *Komagataeibacter* y *Gluconacetobacter* se encargan de producir la celulosa a partir de la glucosa, etanol, sacarosa o glicerol, dando como resultado una biopelícula de polisacáridos (Villarreal et al., 2018).

Teniendo esto en consideración, se observa que las bacterias y levaduras no requieren ningún tipo de fuente ni reserva de grasa para sus metabolismos. Por tal motivo, es esperable que el contenido de este macronutriente sea bajo en esta matriz. Muchos estudios demuestran comportamientos similares en la bebida como tal Azizan et al. (2025) destacan un contenido de grasa completamente despreciable, en el que el valor no llega ni al tercer decimal ($0,00 \pm 0,000$ g/100g). En la biomasa como tal, das Chagas et al. (2024) destacan un contenido de lípidos de apenas 0,29 g/100g a 0 días de fermentación.

Figura 12

Comportamiento del contenido de grasa (base seca) en función del tiempo de fermentación, para las dos concentraciones de azúcar en el sustrato



Notas: (1) A = 7,0 % azúcar; B = 10,5 % azúcar. (2) Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($p > 0,05$) entre los valores. Letras diferentes indican que sí hay diferencia significativa ($p \leq 0,05$).

En la figura 12, se determina un comportamiento similar a lo obtenido por das Chagas et al. (2024), en donde se obtiene para la concentración de 7 % un $0,34 \pm 0,23$ g/100g en los primeros 7 días de fermentación. No obstante, el valor para la concentración 10,5 % resulta considerablemente menor ($0,08 \pm 0,08$ g/100g), lo cual puede deberse a los factores expuestos en la sección de cenizas.

Para el día 21, en la concentración menor de azúcar, se obtiene el mayor contenido de grasa ($0,55 \pm 0,52$ g/100g). Comparando con Jayabalan et al. (2010), se observa que el contenido es menor ($5,4 \pm 0,61$ g/100g), observando nuevamente que el origen del SCOBY puede ser el principal causante de estas diferencias. Al efectuar el análisis estadístico, se determina que no existe diferencia significativa ($p > 0,05$) en el contenido de grasa en base seca a lo largo de los cuatro tiempos de fermentación

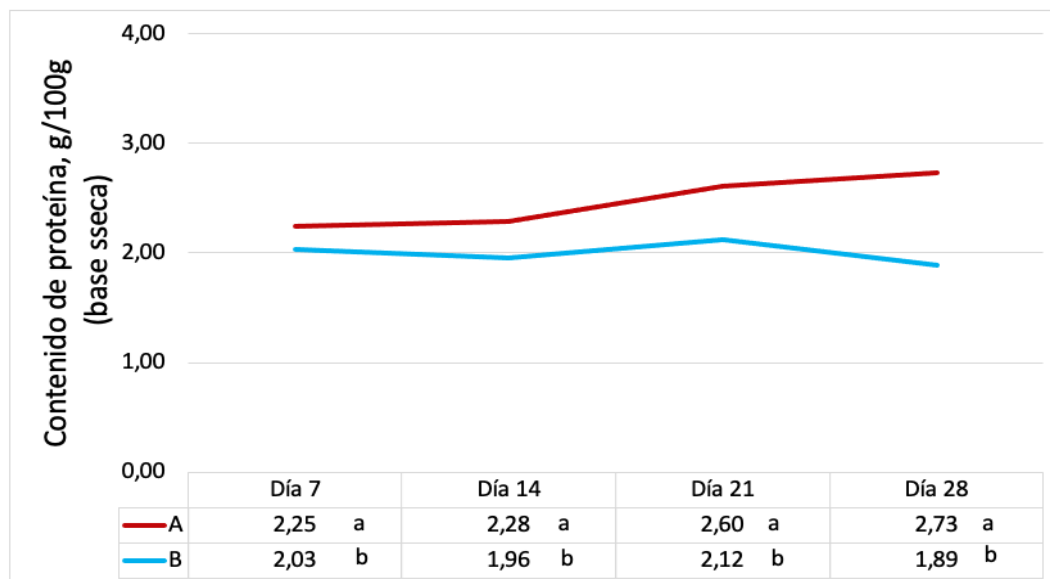
(7, 14, 21, 28). En cuanto a la influencia de la concentración de azúcar, se confirma que sí existe diferencia significativa ($p \leq 0,05$), en donde se obtiene un contenido significativamente mayor de grasa en base seca en la concentración menor de azúcar.

4.2.2.4 Contenido de proteína. El comportamiento del contenido de proteína en base seca (expresado como $N \times 6,25$) en el tiempo se presenta en la figura 13. Se observa que para la concentración de 7,0 % de azúcar, el contenido promedio de proteína aumenta conforme transcurren los días de fermentación. Por otra parte, para el sustrato con mayor concentración de azúcar (10,5 %) se observa un comportamiento no lineal (coeficiente de determinación $-R^2-$ de 0,1219), ya que se muestra una disminución entre los días 7 y 14, un aumento entre 14 y 21 y, nuevamente, una disminución en el día 28. En general, los resultados obtenidos son menores que los reportados previamente por otros autores (Ahmed y Dirar, 2005; Murugesan et al., 2005; Jayabalan et al., 2010; das Chagas et al., 2024).

En el estudio de das Chagas et al. (2024), se destaca que el contenido de este macronutriente puede variar en este tipo de muestras debido a diversos factores, por ejemplo: el sustrato utilizado en la fermentación, tipos de microorganismos que conforman el SCOBY y el periodo que transcurre entre la formación de la celulosa y el análisis de esta.

Figura 13

Comportamiento del contenido de proteína (base seca) en función del tiempo de fermentación, para las dos concentraciones de azúcar en el sustrato



Notas: (1) A = 7,0 % azúcar; B = 10,5 % azúcar. (2) Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($p > 0,05$) entre los valores. Letras diferentes indican que si hay diferencia significativa ($p \leq 0,05$).

El contenido promedio en el día 7 de fermentación es de $2,25 \pm 0,18$ g/100 g para la concentración de 7 % y $2,03 \pm 0,33$ g/100 g para la concentración de 10,5 %. Jayabalan et al. (2010) determinan un contenido de proteína mayor en 7 días de fermentación ($12,15 \pm 1,15$ g/100 g) utilizando sacarosa al 10 %. Estas diferencias pueden deberse a los tipos de microorganismos que conforman el SCOBY, debido a que su microflora varía dependiendo de dónde se origina el cultivo (Jayabalan et al., 2010; das Chagas et al., 2024).

Para el día 14, el contenido en la concentración de 7,0 % aumenta a $2,28 \pm 0,47$ g/100 g, comportamiento semejante al del estudio de Jayabalan et al. (2010), en

donde para el día 14 el contenido en la muestra resulta mayor ($18,4 \pm 1,63$ g/100g). Comparando con este mismo trabajo, se observa que el resultado obtenido es menor, pero este valor resulta mayor que la investigación de Muhialdin et al. (2019), quienes determinan un contenido de apenas $0,07 \pm 0,02$ g/100 g.

Con respecto al estudio de Jayabalan et al. (2010), para el caso de la concentración 10,5 % se contempla una disminución ($1,96 \pm 0,32$ g/100 g); lo cual puede ser justificado por el hecho de que las bacterias y levaduras liberan proteínas extracelulares conforme transcurre la fermentación. Esto hace que aumente el contenido de proteínas en el medio líquido, pudiendo disminuir consigo el de la biomasa (Ahmed et al., 2020; Treviño et al., 2020).

Una semana después, se percibe un aumento para el caso de la concentración 10,5 % ($2,12 \pm 0,55$ g/100 g), lo que se puede deber a que los microorganismos están utilizando las proteínas que fueron liberadas en el día 14 como fuente de nitrógeno y, por consiguiente, disminuye el contenido en el medio líquido como en el estudio de Treviño et al. (2020). Para la concentración 7,0 % se determina un ligero aumento nuevamente ($2,60 \pm 0,70$ g/100 g).

Estas diferencias pueden deberse al tipo de azúcar y la cantidad utilizada, pues se observa en el estudio de Muhialdin et al. (2019) que el contenido de proteína varía dependiendo de la fuente de carbono que se utilice. Así, se observa que utilizando melaza el contenido de proteína ($0,13 \pm 0,04$ g/100 g) es mayor que en el caso del azúcar blanca refinada ($0,07 \pm 0,02$ g/100 g).

Para el último día de fermentación, se observa un contenido promedio de $2,73 \pm 0,37$ g/100 g para el caso de la concentración 7 %, lo cual resulta mayor que el de

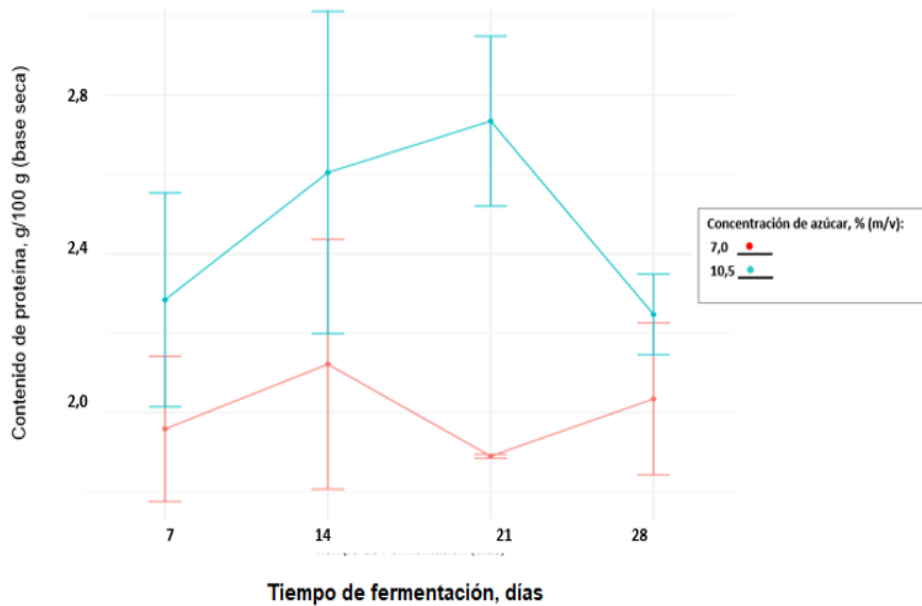
la concentración 10,5 % ($1,89 \pm 0,01$ g/100g), en la que se vuelve a apreciar una disminución semejante al comportamiento del día 14.

El análisis estadístico reveló que no existe diferencia significativa ($p > 0,05$) en el contenido de proteína en base seca a lo largo del tiempo de fermentación. Sin embargo, al igual que con el resto de los componentes, sí se tiene una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) con respecto a la concentración de azúcar. Al realizar un análisis de interacción, se determina que los factores tiempo y concentración de azúcar no ejercen un efecto combinado en el comportamiento del contenido de proteína.

Lo anterior se evidencia en la figura 14, en donde se aprecia que las líneas que describen el comportamiento para ambas concentraciones de azúcar son independientes y casi paralelas entre sí. El patrón que se observa a lo largo del tiempo es similar para ambas concentraciones y se evidencian unas variaciones conforme transcurren los días, pero por sí solas estas no son estadísticamente significativas como comprobó el ANDEVA.

Figura 14

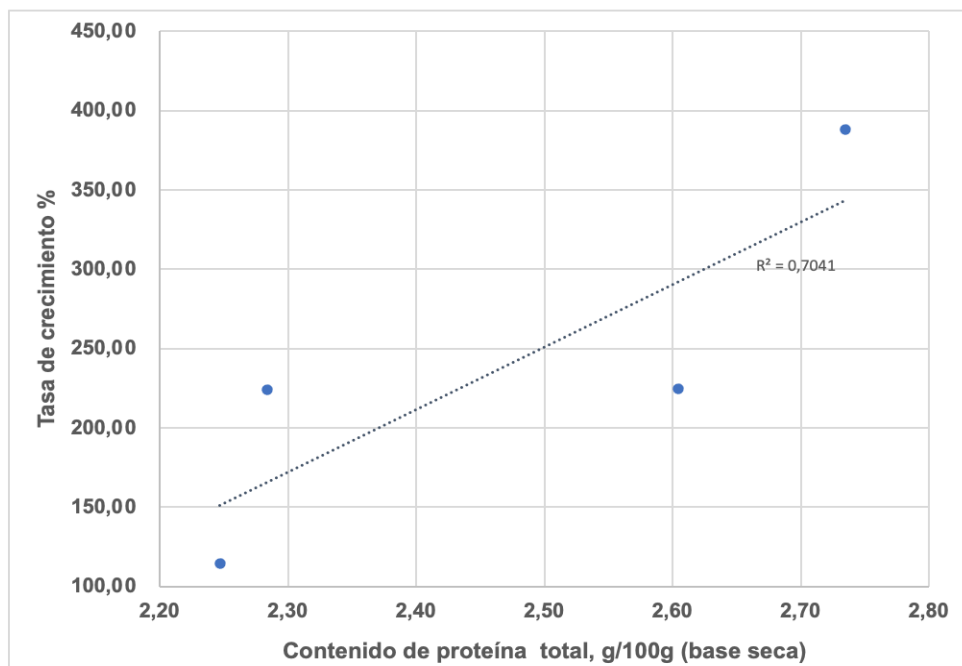
Interacción entre el tiempo de fermentación y concentración de azúcar para el contenido de proteína en el cultivo simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY)



Para evaluar la viabilidad de obtener proteína microbiana a partir del SCOBY, es importante relacionar su contenido proteico con la generación de biomasa. Dado que se puede afirmar estadísticamente que el contenido de este macronutriente fue mayor cuando se utilizó una concentración de 7,0 % de azúcar en el sustrato, se decidió realizar un análisis de correlación para determinar si una mayor tasa de crecimiento genera un mayor contenido proteico. Los resultados de este análisis se muestran en la figura 15, en donde se evidencia que la relación entre ambos parámetros muestra una tendencia positiva.

Figura 15

Correlación entre el contenido de proteína en base seca y la tasa de crecimiento del SCOBY para una concentración de sustrato de 7,0 % de azúcar



Al efectuar el análisis de correlación de Pearson, se obtiene que la correlación entre las variables es positiva ($r=0,836$), lo que quiere decir que, conforme un parámetro aumenta, el otro también tiende a aumentar. Además, con el valor obtenido se evidencia una correlación fuerte entre las variables, lo que indica una estrecha relación entre ambas. Sin embargo, el ANDEVA arroja que la proteína a través del tiempo no presenta una diferencia significativa, por lo cual, a pesar de que la tasa de crecimiento se ve influenciada por el tiempo de fermentación, la proteína no muestra un cambio detectable.

Por lo tanto, se puede decir que no existe evidencia de que sea necesario prolongar el tiempo de fermentación para obtener mayor porcentaje de proteína. Esto podría indicar que los microorganismos ya han alcanzado su pico, o bien que se ha presentado un agotamiento de nutrientes, lo que impide la síntesis de proteína por parte del SCOBY.

Dado lo anterior, una estrategia viable para aumentar el contenido de proteína podría ser aumentar la cantidad de nitrógeno en el medio de cultivo. Investigaciones recientes, como la realizada por Ye et al. (2025), señalan que la adición de fuentes fácilmente asimilables de nitrógeno y carbono como la urea, soluciones amoniacaes y sulfato de amonio puede favorecer un aumento en la cantidad total de proteína presente en la estructura celular.

Este efecto se explica, porque el nitrógeno desempeña un papel fundamental en los procesos fermentativos, al sostener las funciones fisiológicas y bioquímicas de los microorganismos. Además, interviene directamente en la síntesis de proteínas, aminoácidos, nucleótidos y enzimas (Ye et al., 2025).

En un estudio realizado por Peteghem et al. (2022), se concluye que en condiciones limitadas tanto de carbono como de nitrógeno, el crecimiento, rendimiento y contenido proteico de la biomasa generada pueden verse afectados. Esta investigación es pertinente, porque a pesar de que no destaca específicamente la biomasa generada por el SCOBY, menciona que al proporcionar una fuente rica y proporcional de nitrógeno-carbono se puede obtener un mayor crecimiento, lo cual resulta en un mayor contenido de proteínas.

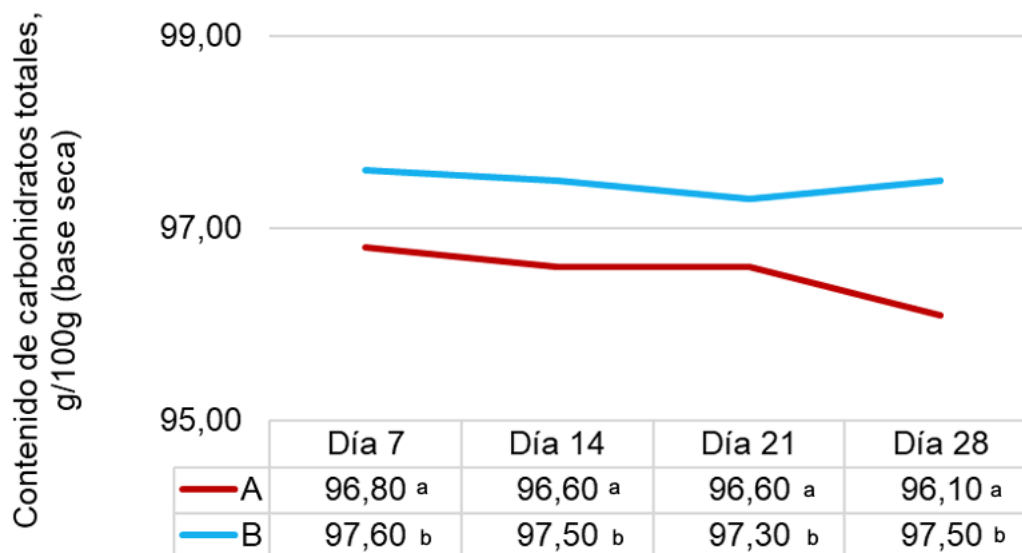
4.2.2.5 Contenido de carbohidratos. En la figura 16, se observa el comportamiento del contenido de carbohidratos en base seca para ambas concentraciones de azúcar a lo largo del tiempo. Se determina que para la concentración de 7 % de azúcar, el promedio de contenido de carbohidratos decrece conforme avanzan los días de fermentación. No obstante, para la concentración de 10,5 % de azúcar se observa un comportamiento ligeramente distinto, donde decrece el contenido de carbohidratos progresivamente para los días 7, 14 y 21 de fermentación y aumenta ligeramente para el día 28.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo descrito por diversos autores. Por ejemplo, Ahmed y Dirar (2005) afirman que los carbohidratos representan mayoritariamente la composición de la matriz (SCOBY). No obstante, los resultados de carbohidratos en base seca obtenidos para ambas concentraciones de azúcar son mayores que los reportados previamente por dichos autores en su estudio (43,2 g/100g en base seca).

Cabe destacar que esta diferencia de valores puede estar relacionada a diversos factores, tal como se ha mencionado en los apartados anteriores. Entre ellos, el tipo de sustratos utilizados en la fermentación, el tipo o cepas de microorganismos utilizados y el periodo transcurrido entre el desarrollo de la matriz y su evaluación proximal.

Figura 16

Comportamiento del contenido de carbohidratos (base seca) en función del tiempo de fermentación, para las dos concentraciones de azúcar en el sustrato



Notas: (1) A = 7,0 % azúcar; B = 10,5 % azúcar. (2) Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($p > 0,05$) entre los valores. Letras diferentes indican que si hay diferencia significativa ($p \leq 0,05$).

Para el día 7 de fermentación, el contenido promedio de carbohidratos para la concentración A de azúcar (7 %) es de $96,8 \pm 0,45$ g/100 g; para la misma cantidad de días de fermentación, se obtuvo como resultado en promedio $97,60 \pm 0,51$ g/100 para la concentración B de azúcar (10,5 %). Lo anterior difiere de lo presentado por Jayabalan et al. (2010), quienes, a los 7 días de fermentación, reportan un contenido de carbohidratos promedio de $6,0 \pm 0,65$ g/100 g.

Para el día 14, la concentración de 7 % de azúcar reporta un contenido de $96,6 \pm 0,31$ g/100 g, mientras que la concentración de 10,5 %, un contenido promedio de

97,5 ± 0,31 g/100 g de carbohidratos. Cabe destacar que Jayabalan et al. (2010), al día 14 de fermentación presentan un contenido de carbohidratos promedio de 6,65 ± 0,85 g/100 g. Se puede notar que tanto para el día 7 como para el día 14 de fermentación, en ambas concentraciones de azúcar, se obtienen mayores valores de contenido de carbohidratos promedio que con respecto al estudio de Jayabalan et al. (2010).

Para el día 21, la concentración A (7 %) de azúcar presentó un contenido promedio de 96,6 ± 1,35 g/100 g, mientras que la concentración B (10,5 %), un contenido promedio de 97,3 ± 0,73 g/100 g. En el estudio presentado por das Chagas et al. (2024), el valor de carbohidratos promedio en base seca (86,51 ± 0,55 g/100 g) resulta inferior a los obtenidos en el presente estudio. No obstante, este valor tiene mayor similitud a los obtenidos y las diferencias se pueden deber al factor diferencial presente en cuanto a cepas o tipos de microorganismos utilizados.

Finalmente, en el día 28 para la concentración de 7% de azúcar se obtuvo un contenido promedio de 96,1 ± 0,43 g/100 g, mientras que para la concentración de 10,5 % de azúcar, un contenido promedio de 97,5 ± 0,15 g/100 g. Se puede resaltar que Ahmed y Dirar (2005), a los 30 días de fermentación, alcanzan un contenido de carbohidratos promedio de 43,2 g/100 g. El valor obtenido por dichos autores resulta menor a los expuestos en el presente estudio para una cantidad similar de días de fermentación; no obstante, aún con las diferencias de resultados, dichos autores afirman que el SCOBY es una composición de microorganismos compuesta en gran parte por carbohidratos.

Según los resultados presentados, es curioso también mencionar que Jayabalan et al. (2010) afirman que la composición química del SCOBY está

directamente relacionada con la cantidad de días de fermentación de este. Es decir, a mayor cantidad de días de fermentación, aumenta su composición química. A pesar de esto, el ANDEVA indica que a lo largo del tiempo el contenido de carbohidratos en la biomasa no presenta diferencias significativas ($p > 0,05$); es decir, este componente no muestra variaciones significativas conforme avanza la fermentación.

No obstante, se determina que la concentración de azúcar sí afecta significativamente ($p \leq 0,05$) el contenido de carbohidratos, donde se concluye que para la mayor concentración de azúcar se obtiene un contenido de carbohidratos significativamente mayor.

4.2.2.6 Contenido de fibra. En las siguientes secciones se discuten los resultados obtenidos para fibra.

4.2.2.6.1 Fibra soluble. El comportamiento del contenido de fibra soluble en base seca a lo largo del tiempo, para la concentración 7,0 % de azúcar y para concentración 10,5 %, se observa en la figura 17. En el caso de la menor concentración de azúcar, se determina que el porcentaje tiende a incrementar conforme avanza el proceso de fermentación. Este comportamiento se aprecia en la figura 17.

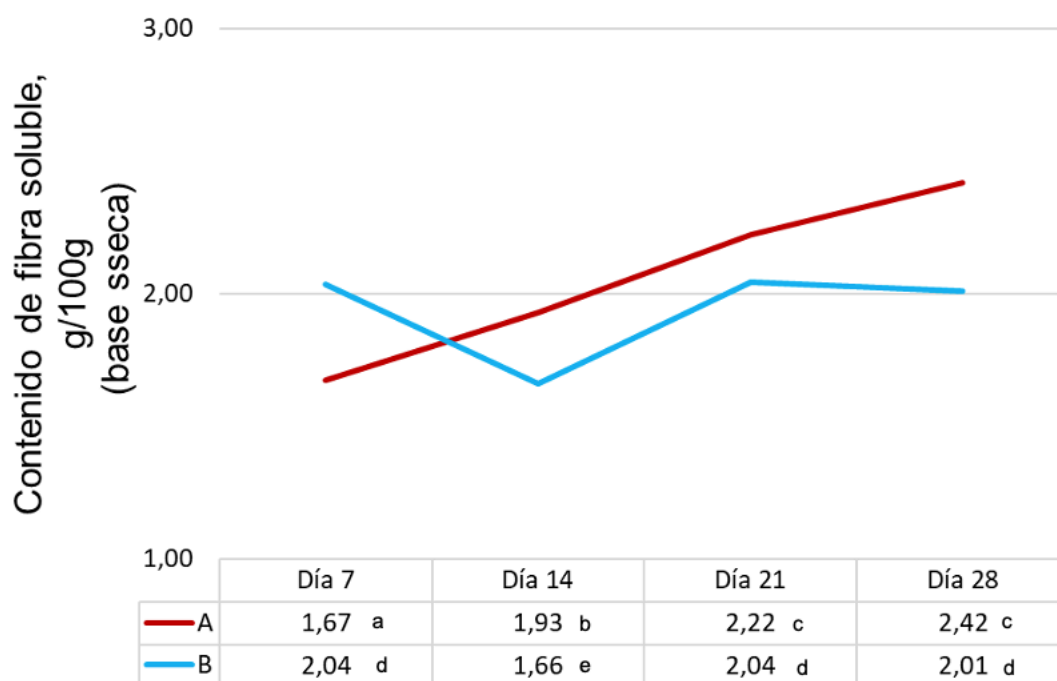
Tal aumento podría estar relacionado con la liberación de exopolisacáridos solubles (EPS). Hassler et al. (2024) mencionan que en la kombucha se encuentran diversos microorganismos capaces de formar EPS.

Para la concentración 10,5 %, se muestra un comportamiento no lineal, el cual se puede observar en la figura 17. Seguel et al. (2017) determinan que este comportamiento puede deberse a que, a mayores concentraciones de sustrato, las

levaduras pueden sufrir limitaciones respiratorias, generando inhibición de la actividad metabólica, lo que se traduce en una fermentación más descontrolada.

Figura 17

Comportamiento del contenido de fibra soluble (base seca) en función del tiempo de fermentación, para las dos concentraciones de azúcar en el sustrato



Notas: (1) A = 7,0 % azúcar; B = 10,5 % azúcar. (2) Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($p > 0,05$) entre los valores. Letras diferentes indican que si hay diferencia significativa ($p \leq 0,05$).

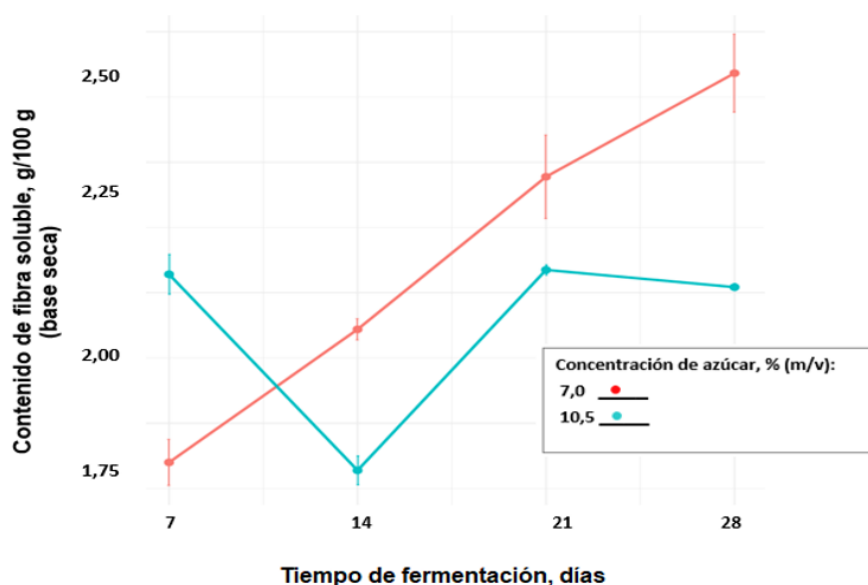
Comparando ambas concentraciones de azúcar con la literatura, se muestra en el estudio de Coello y Vizniac (2021) que el contenido de lignina soluble es menor, con un contenido de $0,0083 \pm 0,00024$ g/100 g.

En la figura 18, se observa que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre el contenido de fibra soluble y al menos algunos de los tiempos de fermentación, es decir, que el tiempo se asocia con un efecto significativo

sobre la cantidad de fibra soluble. De forma similar, se concluye que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre el promedio de fibra soluble y las dos concentraciones de azúcar. Por ello, ambos factores (sustrato y tiempo) tienen un efecto individual estadísticamente significativo.

Figura 18

Interacción entre el tiempo de fermentación y concentración de azúcar para el contenido de fibra soluble en el cultivo simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY)



Analizando el efecto de interacción entre los factores en estudio, se determina que sí existe una interacción estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre el tiempo y la concentración de azúcar. Como se muestra en la figura 18, el efecto del tiempo de fermentación sobre la fibra soluble no es el mismo para ambas concentraciones de sustrato. Por eso, se concluye que los efectos de estos factores no son aislados, sino que se deben considerar en conjunto.

Según el análisis Tukey, se determina que existe un punto de intersección en el que para el día 7, en la concentración mayor (10,5 %), se produce significativamente más fibra soluble que para la de 7 %. Este comportamiento se

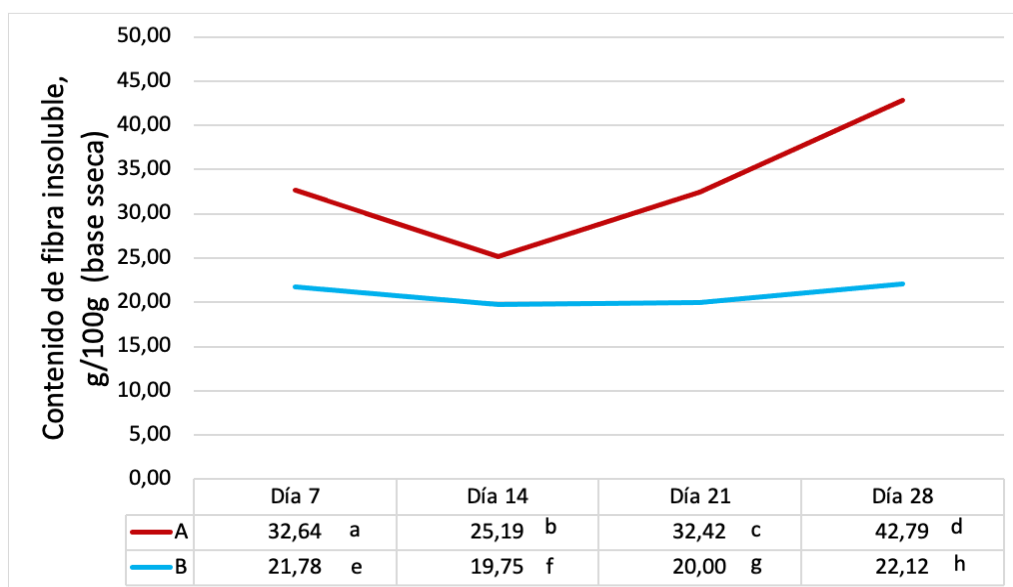
invierte para el día 14, en el que se obtiene mayor fibra soluble para la menor concentración de azúcar y se observa un aumento consistente a lo largo del tiempo, obteniendo los mayores porcentajes en los días 21 y 28.

Sin embargo, para la concentración 10,5 % no se observa un comportamiento lineal; se determina un decrecimiento significativo para el día 14 y un leve aumento para las últimas semanas de fermentación. Con esto, se concluye que se obtiene la mayor cantidad de fibra soluble en el día 28 para la concentración 7 %, por lo que se podría decir que estas son las mejores condiciones.

4.2.2.6.2 Fibra insoluble. El comportamiento del contenido de fibra insoluble en base seca a lo largo del tiempo, para la concentración 7,0 % de azúcar y para la concentración 10,5 %, se observa en la figura 19. Se puede observar que la concentración al 7 % de azúcar mostró un comportamiento general de aumento a lo largo del proceso de fermentación, con excepción del día 14, donde se observó una disminución en todas las corridas. Por otro lado, la concentración B presentó valores de fibra insoluble más bajos y con mayor variabilidad a lo largo del tiempo. Este comportamiento para ambas concentraciones se aprecia en la figura 19.

Figura 19

Comportamiento del contenido de fibra insoluble (base seca) en función del tiempo de fermentación, para las dos concentraciones de azúcar en el sustrato



Notas: (1) A = 7,0 % azúcar; B = 10,5 % azúcar. (2) Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($p > 0,05$) entre los valores. Letras diferentes indican que sí hay diferencia significativa ($p \leq 0,05$).

Con el análisis estadístico, se obtiene un comportamiento similar que con la fibra soluble. Se determina que existe una diferencia estadísticamente significativa

($p \leq 0,05$) en el contenido de fibra insoluble tanto a lo largo del tiempo como entre las dos concentraciones de azúcar. Es decir, ambos factores tienen un impacto extremadamente fuerte sobre la cantidad de este componente.

Esta diferencia que existe en el contenido de fibra insoluble entre las dos concentraciones de azúcar, puede deberse a lo mencionado por AL-Kalifawi y Hassan, (2014), quienes indican que una mayor concentración de sacarosa en el medio de cultivo representa un obstáculo para la generación de celulosa bacteriana, debido a que usando 7 % de sacarosa obtuvieron 35,44 % de fibra, resultado similar a los del presente estudio para la concentración A, pero, al aumentar la concentración de azúcar hasta llegar a un 19 %, los resultados de fibra decrecieron a 11,23 %.

En otro estudio, Coello y Vizniac, (2021), reportan cantidades más bajas de fibra insoluble a las determinadas en el presente estudio, un 18 % tras 10 días de fermentación con una concentración de azúcar de 6,25 %.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, en ambas concentraciones, son distintos a los obtenidos por das Chagas et al. (2024), quienes reportan porcentajes de fibra en base seca de $10,49 \pm 0,29$. Esta variación en los resultados del presente estudio y el mencionado anteriormente pueden deberse a diferencias que puedan existir en tipo y cantidad inicial de azúcar y té. La composición del cultivo iniciador que puede mostrar diferencias en la actividad microbiana, composición del medio, las condiciones de fermentación, las fuentes de carbono y nitrógeno presentes (Mukadam et al., 2016; Guamán, 2025).

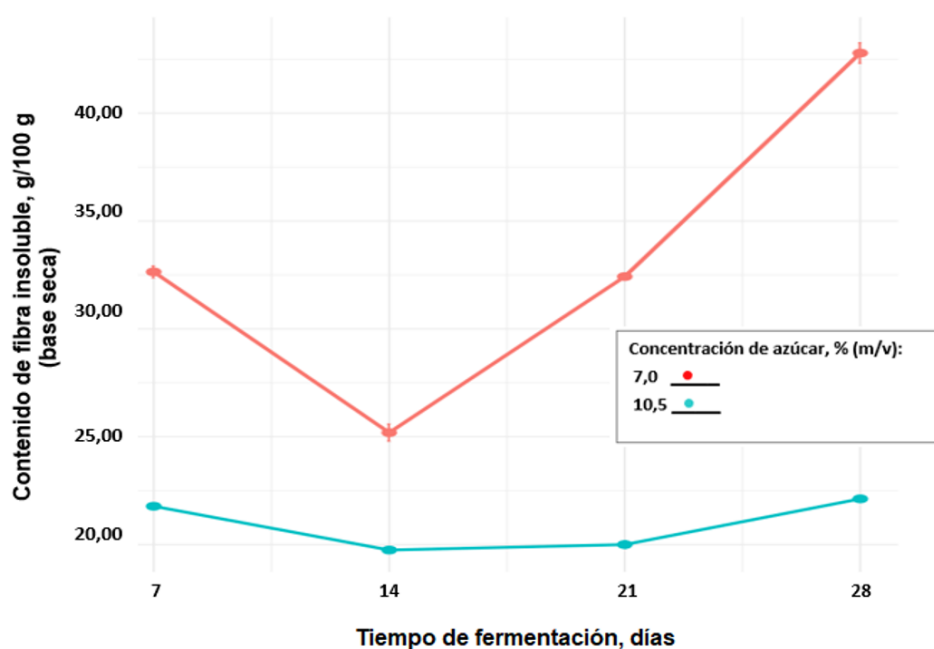
Otra posible razón por la cual el contenido de fibra puede variar entre estudios es el recipiente en el que se realice la fermentación, ya que esto representa una variante para la producción de celulosa bacteriana (CB). AL-Kalifawi y Hassan (2014) indican que a mayor superficie, incrementa el porcentaje de CB. Un recipiente

redondo con la mayor superficie y la menor profundidad generó mayor contenido de CB; por el contrario, el recipiente con menor superficie y mayor profundidad produjo el menor contenido de CB.

Como se observa en la figura 20, sí existe una interacción estadísticamente significativa entre el tiempo de fermentación y la concentración de sustrato. Así, se puede concluir que el efecto del tiempo en la fibra no es lo mismo para ambas concentraciones de azúcar, es decir, la forma en la que cambia este componente con el tiempo depende de la concentración.

Figura 20

Interacción entre el tiempo de fermentación y concentración de azúcar para el contenido de fibra insoluble en el cultivo simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY)



Asimismo, con el análisis Tukey se determinó que en casi todos los tiempos de fermentación la concentración 7 % produce significativamente más fibra insoluble que la concentración 10,5 %, observando una diferencia bastante notable al final de la fermentación (día 28). El comportamiento de la menor concentración parece disminuir

al inicio, pero aumenta drásticamente a lo largo del tiempo. Mientras que, para la mayor concentración, se muestra una tendencia más lineal. De forma similar, para la fibra soluble, se concluye que las mejores condiciones para mayores cantidades son con las menores concentraciones de azúcar (7 %), prolongando la fermentación hasta 28 días.

El elevado contenido de fibra insoluble presente en el SCOBY puede permitir un aprovechamiento de este material. Por ejemplo, Martínez (2024), tras un amplio estudio, señala que los *biofilms* creados gracias al proceso de la kombucha representan una muy buena alternativa para su aplicación en industrias altamente contaminantes como la textil. Otra interesante aplicación de la celulosa bacteriana presente en el SCOBY es en la industria alimentaria. La CB representa una buena y efectiva alternativa como emulsificante en mayonesa, formando emulsiones con excelentes características (Flores y Flores, 2024).

Por último, Valdiviezo (2024) confirma que la celulosa del SCOBY cumple con los parámetros y es una buena alternativa para ser utilizada en productos biodegradables, específicamente en papel y bioplástico para envases.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

A través de la investigación, se concluye que es de suma importancia efectuar los procesos fermentativos en condiciones y ambientes controlados, para así evitar la contaminación de los medios.

Por otro lado, se determina que los parámetros fisicoquímicos son una medida sencilla que permite monitorear con éxito el avance de la fermentación.

Ambos factores tuvieron un efecto diverso sobre los parámetros fisicoquímicos, donde el tiempo de fermentación afectó el comportamiento del pH, el contenido de sólidos solubles y la temperatura.

La tasa de crecimiento varía entre $80,4 \pm 45,6$ % en el día 7 a $257,6 \pm 56,6$ % en el día 28. Se aprecia que cada concentración de azúcar se comporta de manera independiente, siendo la concentración de un 7,0 % (m/v) la que muestra un mayor crecimiento. Además, se concluye que no es pertinente continuar la fermentación hasta día 28, puesto que no existe diferencia significativa entre los valores.

Por otra parte, se concluye que la biomasa generada presenta un alto contenido de humedad, con valores superiores a 90 g/100g en ambas

concentraciones. Esta variable se ve afectada significativamente por la concentración de azúcar en el sustrato, pero no por el tiempo de fermentación.

En cuanto al contenido de cenizas y grasa, se concluye que la cantidad presente de estos componentes es despreciable.

El contenido de proteína obtenido (1,89 – 2,73 g/100 g) es menor que en otros estudios y, a pesar de que este aumenta con el tiempo, según el análisis estadístico se determina que el contenido no depende ni de la cantidad de biomasa generada ni del tiempo de fermentación, pero sí de la concentración de azúcar. Por esto, se concluye que no existe evidencia suficiente que respalde la necesidad de extender los periodos fermentativos.

El contenido de carbohidratos en la biomasa no presenta variaciones significativas a lo largo del tiempo de fermentación, por lo que, este componente no depende del factor tiempo, pero sí de la concentración de azúcar.

La mayor proporción de fibra dietética presente en el SCOBY corresponde a fibra insoluble. Se determina que tanto el factor de tiempo como de sustrato tienen un efecto individual estadísticamente significativo en la producción de fibra. Sin embargo, estos factores no actúan de manera aislada, por lo cual se deben considerar en conjunto.

En conclusión, si bien el contenido de proteína en todos los casos resultó menor a 3 %, se requieren más estudios para optimizar la producción de este nutriente y respaldar la viabilidad técnica del SCOBY como fuente de proteína microbiana. Sin embargo, su elevado contenido de fibra dietética abre posibilidades para continuar investigando su potencial, tanto nutricional como funcional, para aplicación en alimentos y/o suplementos.

5.2 Recomendaciones

En trabajos futuros, sería interesante realizar un análisis microbiológico del SCOBY, de forma que se puede caracterizar su microbiota para relacionarla con su composición química.

Se recomienda ejecutar fermentaciones controladas adicionando distintas fuentes y cantidades de nitrógeno, ya sea orgánico y/o inorgánico, de forma que se pueda valorar el efecto que tiene este componente sobre el contenido de proteína del SCOBY.

Asociado a lo anterior, se podría determinar la mejor relación carbono-nitrógeno para optimizar tanto el crecimiento de la biomasa como para la mayor producción de proteína.

Se sugiere realizar análisis de ácidos nucleicos, ya que estos pueden ser una de las limitaciones de aplicación para el consumo humano.

La información sobre el contenido de fibra soluble en la biomasa es escasa, por lo que se recomienda investigar más sobre la funcionalidad potencial de este componente.

Finalmente, se establece como sugerencia dar continuidad a la investigación de las propiedades tecnológicas de la fibra insoluble en el ámbito de alimentos.

VI. REFERENCIAS

- Abedfar, A., Abbaszadeh, F. & Mardiha, F. (2025). A Review on the Importance of Producing Single-Cell Protein (SCP) from Agricultural By-products and Waste. *Chemical and Biomolecular Engineering*, 10(1), 8-15. <http://dx.doi.org/10.11648/j.cbe.20251001.12>.
- AL-Kalifawi, E., & Hassan, I. (2014). Factors Influence on the Yield of Bacterial Cellulose of Kombucha (Khubdat Humza). *Baghdad Science Journal*, 11 (3), Article 41. <https://doi.org/10.21123/bsj.2014.11.3.1420-1428>.
- Agbangba, C., Sacla, E., Honfo, H. & Glèlè, R. (2024). On the Use of Post-hoc Tests in Environmental and Biological Sciences: A Critical Review. *Heliyon*, 10 (3). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25131>.
- Aguirre, J, E., Ramírez, A., Aguilar, M, J., & Álvarez, M, M. (2009). Producción de proteína y biomasa probióticos de *Lactobacillus casei* liofilizadas a partir de suero de leche de cabra. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 8 (1), 67-76. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmiq/v8n1/v8n1a7.pdf>.
- Ahern, K., Rajagopal, I., & Tan, T. (2018). *Biochemistry Free For All*. Editorial NC. https://biochem.oregonstate.edu/sites/biochem.oregonstate.edu/files/2022-04/Biochemistry%20Free%20For%20All%201.3_compressed.pdf.

- Ahmad, M., Li, Y., Pan, J., Liu, F., Dai, H., Fu, Y., Huang, T., Farooq, S., & Zhang, H. (2024). Collagen and Gelatin: Structure, Properties, and Applications in Food Industry. *International Journal of Biological Macromolecules*, 254(3). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128037>.
- Ahmed, S. & Dirar, H. (2005). Studies on the Microbiology of Kombucha (Tea Fungus). *Journal of Agricultural Sciences*, 13(1). <https://research.kombuchabrewers.org/wp-content/uploads/kk-research-files/studies-on-the-microbiology-of-kombucha-tea-fungus.pdf>
- Ahmed, R., Hikal, M. & Abou, K. (2020). Biological, Chemical and Antioxidant Activities of Different Types Kombucha. *Annals of Agricultural Sciences*, 65(1), 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2020.04.001>.
- Almeida, D. & Sevilla, F. (2023). Elaboración de una bebida probiótica Kombucha empleando dos endulzantes no calóricos a partir de SCOBY (Colonia Simbiótica de Bacterias y Levaduras). [Trabajo para optar al título de Ingeniera e Ingeniero en Biotecnología, Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/25405/1/TTQ1174.pdf>.
- Almeida, D., Wang, B., Lima, E., Shebeko, S., Ermakov, A., Khramova, V., Ivanova, I., Rocha, R., Vaz.Velho, M., Mutukumira, A., & Todorov, S. (2025). Kombucha: una vieja tradición en un nuevo concepto de bebida beneficiosa y beneficiosa para la salud. *Alimentos*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/foods14091547>.
- Altuntas, S., & Hapoglu, H. (2019). Kefir type-Drinks from Whey. Mihai, A., & Holban, A. (Eds). *Non-Alcoholic Beverages, Volume 6: The Science of Beverages*. Pp. 185-226. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815270-6.00007-4>
- Andrade, C. (2024). Understanding Factorial Designs, Main Effects, and Interaction Effects: Simply Explained with a Worked Example. *Indian Journal of*

Psychological Medicine, 46(2).

<https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/02537176241237066>.

Andreu, M. & Saavedra, C. (2022). *El rol de los fermentos en la sostenibilidad alimentaria*. *Nutrición Hospitalaria*, 39(3), 56-59. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112022000700013.

Antolak, H., Piechote, D., & Kucharshaka, A. (2021). Kombucha Tea—A Double Power of Bioactive Compounds from Tea and Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts (SCOBY). *Antioxidants*, 10(10), 1-20. <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/10/1541>

Amarasinghe, H., Weerakkody, N. & Waisundara, V. (2018). Evaluation of Physicochemical Properties and Antioxidant Activities of Kombucha “Tea Fungus” during Extended Periods of Fermentation. *Food Science and Nutrition*, 6(3), 659-665. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29876117/>

Araya, A., & Umaña, Y. (2022). Aplicación de comunidades simbióticas en procesos fermentativos en una bebida que permita generar aportes nutricionales, aprovechando subproductos, a base de los residuos de piña (*Ananus comusus*). [Trabajo para optar el grado de Licenciatura en Ingeniería en Tecnología de Alimentos, Universidad Técnica Nacional]. <https://repositorio.utn.ac.cr/server/api/core/bitstreams/c0ff3437-3f13-45ba-86ca-c8f17ac22fa6/content>

Álvarez, M. (2018). Valorización catalítica de aceites vegetales: síntesis de ésteres metílicos y monoglicéridos de ácidos grasos. [Trabajo para optar por el grado de doctorado en Ingeniería Química, Universidad Nacional del Sur]. <https://repositoriodigital.uns.edu.ar/handle/123456789/4187>

- Asiri, F., & Chu, K. (2022). Valorization of Agro-industrial Wastes into Polyhydroxyalkanoates – rich-single-cell Proteins to Enable a Circular Waste-to Feed Economy. *Chemosphere*, 309. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653522031538?via%3Dihub>.
- Avcioglu, N., Birben, M., & Seyis, I. (2021). Optimization and Physicochemical Characterization of Enhanced Microbial Cellulose Production with a New Kombucha Consortium. *Process Biochemistry*, 108, 60-68. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.06.005> .
- Azizan, A, M., Qadir, R., Zakaria, A, M., Mohsin, Z, A. & Meor, S, A. (2025). Exploring the Characteristics of Kombucha Tea Fermented with Soursop (*Annona muricata*), Noni (*Morinda citrifolia*) and Pineapple (*Ananas comosus*). *BIO Web of Conferences*, 159. <https://doi.org/10.1051/bioconf/202515901002>.
- Bajic, B., Vucurovic, D., Vasic, D., Jevtic, R., & Dodic, S. (2022). Biotechnological Production of Sustainable Microbial Proteins from Agro-industrial Residues and By-products. *Foods*, 12, 107. <https://www.mdpi.com/2304-8158/12/1/107>.
- Ballinas, J, E., Meza, I, P., Aguilar, A, O., Vela, G., Flores, E, L., Perez, A. & Morales, A, L. (2023). El análisis proximal, práctica e interpretación de resultados. [Archivo PDF]. <https://redinvestigav2.chiapas.gob.mx/archivos/AnalisisProximal202320240530T144148.pdf>
- Babativa, C. (2017). Investigación cuantitativa. Fundación Universitaria del Área Andina. <https://digitk.areandina.edu.co/bitstreams/30b26254-a8d2-4cd6-b44f-e107d90d3e6f/download>

- Barbosa, M., de Souza, A., Tavares, G. & Antunes, E. (2019). Leites A1 e A2: revisão sobre seus potenciais efeitos no trato digestório. *Segur. Aliment. Nutri, Campinas*, 26, 1-11. <http://dx.doi.org/10.20396/san.v26i0.8652981>.
- Barrera, R., & Reyes, J. (2015). Optimización de los parámetros del proceso de fermentación del jugo de caña para obtener bioetanol en la planta piloto de alcohol de la Facultad de Ingeniería Química - UNAP. [Trabajo de investigación para optar por el título de Ingeniero Químico, Universidad Nacional de la Amazonía].
https://repositorio.unapikitos.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12737/4160/Richar_Tesis_Titulo_2016.pdf?sequence=1.
- Benavides, M. (2019). Aplicación de la fermentación láctica como estrategia de transformación y valorización de matrices vegetales. [Trabajo de investigación para optar por el título de Doctor en Ingeniería Química e Ingeniería de Procesos Químicos, Universidad Nacional de Colombia].
<https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/669678/TMABM1de1.pdf>.
- Benson, L., & Greene, J. (2023). *Cell-Cultivated Meat: An overview*. [Archivo PDF].
<https://sgp.fas.org/crs/misc/R47697.pdf>.
- Bello, R. (2021). Optimización de las condiciones de fermentación líquida en biorreactor para la producción de *Lentinula edodes*. [Trabajo de investigación para optar por el título de Magister en Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia].
<https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/80126/11275357.2021.pdf?sequence=2>
- Bhat, R., Goh, W., Rosma, A., Kaur, B., Fazilah, A., & Karim, A. (2012). Fermentation of Black Tea Broth (Kombucha): I. Effects of Sucrose Concentration and

Fermentation Time on the Yield of Microbial Cellulose. *International Food Research Journal*, 19(1), 109-117.

[http://ifrj.upm.edu.my/19%20\(01\)%202011/\(15\)IFRJ-2011-105%20Rajeev.pdf](http://ifrj.upm.edu.my/19%20(01)%202011/(15)IFRJ-2011-105%20Rajeev.pdf)

Bohórquez, A., Carvajal, S., Sánchez, C., González, I., González, C., Smith, J., Martínez, E., & Cárdenas, D. (2020). *Guía para la determinación de contenido de humedad en granos y cereales*. [Archivo PDF]. https://inm.gov.co/web/wp-content/uploads/2021/11/GUIA-DETERMINACION%CC%81N-CONTENIDO-DE-HUMEDAD_V5.pdf.

Buttle, L., Noorman, H., Engel, C., & Santigosa, E. (2024). Bridging the Protein Gap with Single Cell Protein Use in Aquafeeds. *Frontiers in Marine Science*. DOI: 10.3389/fmars.2024.1384083

Burini, J. (2022). Desarrollo de cultivos iniciadores cervceros basados en levaduras nativas para la producción de bebidas fermentadas con alto valor agregado. [Trabajo de tesis para optar por el título de Doctora en Biología, Universidad Nacional del Comahue]. https://rdi.uncoma.edu.ar/bitstream/handle/uncomaid/17094/CRUB_Burini_JA_Desarrollo_De_Cultivos_Iniciadores_Cervceros_Basados_En_Levaduras_Nativas_Para_La_Produccion_De_Bebidas_Fermentadas.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

Caicedo, A, M. (2021). *Obtención de una fuente de fibra dietaria a partir de residuos agroindustriales de pasifloras*. [Trabajo de investigación para optar por el título de Magister en Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/80472/1110544008.2021.pdf?sequence=2&isAllowed=y>.

- Castañeda, K., & Llorente, J. (2023). *Aproximación a una propuesta de aprovechamiento de residuos orgánicos a través de fermentación anaerobia*. [Trabajo de grado, Universidad Libre Seccional Pereira]. <https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/30420/Trabajo%20de%20grado%20Kevin%20y%20Juan%20Andres.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Castro, A., & Cuestas, J. (2022). Determinación del tiempo ideal de fermentación en la elaboración de un suplemento bovino usando *Saccharomyces cerevisiae*. [Título de grado para optar al título de Microbiólogo, Universidad Libre Seccional Barranquilla]. <https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/30418/CASTRO..pdf?sequence=1>.
- Callejas, N., Rebollar, S., Ortega, J., & Domínguez, J. (2017). Parámetros bioeconómicos de la producción intensiva de la carne de bovino en México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8(2), 129-138. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S200711242017000200129&script=sci_arttext
- Calizaya, U., Sotelo, A., & Chire, G. (2023). La fibra dietaria, importante componente fisicoquímico: un caso peruano. *Chemical Technology*, 43(3), pp. 677-702. <https://tecnologiaquimica.uo.edu.cu/index.php/tq/article/view/5377>
- Cerón, M., Santos, E., Sánchez, I., Rangel, E., Rodríguez, A., & Ibarra, I. (2020). Hongos comestibles: un ingrediente alternativo en la formulación de productos cárnicos. *Pädi*, 7(14), 47-51. https://www.researchgate.net/publication/338414316_Hongos_comestibles_Una_alternativa_saludable_en_productos_carnicos.

- Chacón, A. (2004). Perspectivas actuales de la proteína unicelular (SCP) en la agricultura y la industria. *Agronomía Mesoamericana*, 15(1), 93-106. <https://www.redalyc.org/pdf/437/43715114.pdf>
- Chong, A., Chin, N., Talib, R. & Basha, R. (2024). Modelling pH dynamics, SCOBY biomass formation, and acetic acid production of Kombucha fermentation using black, green, and oolong teas. *Processes*, 12(1301). <https://doi.org/10.3390/pr12071301>.
- Coello, D., & Vizniac, W. (2021). *Caracterización del Scoby de kombucha para la producción de biofilms*. *ResearchGate*. https://www.researchgate.net/publication/349455656_Caracterizacion_del_Scoby_de_Kombucha_para_la_produccion_de_Biofilms
- Coelho, R., Leite de Almeida, A., Queiroz, R., Mota, R. (2020). Kombucha: Review. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 22(1), DOI:10.1016/j.ijgfs.2020.100272
- Conejo, C. (2023). *Producción de proteína unicelular de hongos filamentosos utilizando como sustrato residuos de la industria de piña y banano de una empresa costarricense*. [Universidad Nacional de Costa Rica]. <https://repositorio.una.ac.cr/handle/11056/26844>.
- Córdova, M., Solórzano, J., Moreira, C. & Latorre, G. (2022). Cinética de fermentación acética utilizando *Acetobacter aceti* como agente biológico. *Ingeniería, Tecnología e Investigación*, 5(10). <https://doi.org/10.46296/ig.v5i10.0064>
- Corsetti, G., Pasini, E., Scarabelli, T., Romano, C., Singh, A., Scarabelli, C. & Dioguardi, F. (2024). Importance of Energy, Dietary Protein Sources, and Amino Acid Composition in the Regulation of Metabolism: An Indissoluble

Dynamic Combination for Life. *Nutrients*, 16(15).
<https://doi.org/10.3390/nu16152417>.

Cristancho, L., & Monroy, R. (2014). *Manual de métodos generales para determinación de carbohidratos*. [Archivo PDF].
<https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/38932449/manualdemtodosgeneralesparadeterminacindecarbohidratos>.

Cultures for Health. (2023). The ultimate guide to kombucha temperature: the vital role of kombuch brewing & fermenting temperatura. [junio 23, 2023].
https://culturesforhealth.com/blogs/learn/kombucha-temperature-brewing-fermenting?utm_

das Chagas, E., Zamarian, F., Souza, H., Kamimura, E., Boffo, E., & Ambrozin, A. (2024). Extraction of Polyphenols and Antioxidant Compounds from SCOBY, as a By-product of Kombucha, using Different Types of Extraction. *Discov Food* 4, 54. <https://doi.org/10.1007/s44187-024-00106-7>

Czarnecki, B., Chamberlain, K., Loscher, I., Swartz, E., Black, L., Oberholtzer, E., Scalia, J., Watson, B., Shearer, L., Richardson, J., & Kegerreis, J. (2024). Optimizing Oxygen Exposure during Kombucha Brewing Using Air-Permeable Silicone Bags. *Fermentation*, 10(7), 371.
<https://doi.org/10.3390/fermentation10070371>

Dahal, P. (2024). Benedict's Test: Principle, Procedure & Practical Uses.
<https://microbenotes.com/benedicts-test/>

Dahal, P. (2023). *Facultative Anaerobes: Characteristics, Examples, Uses*. Microbe Notes. <https://microbenotes.com/facultative-anaerobes/>

- Daniel, R., Danson, M., Eisenthal, R., Kai-Wu, C. & Peterson, M. (2008). The Effect of Temperature on Enzyme Activity: New Insights and their Implications. *Extremophiles*, 12, 51-59. DOI: 10.1007/s00792-007-0089-7
- Dai, F., & Chau C. (2017). Classification and Regulatory Perspectives of Dietary Fiber. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(1), 37 - 42. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.09.006>
- Day, L., Cakebread, J., & Loveday, S. (2022). Food Proteins from Animals and Plants: Differences in the Nutritional and Functional Properties. *Trends in Food Science and Technology*, 119, 428-422. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.12.020>
- di Corcia, M., Tartaglia, N., Polito, R., Ambrosi, A., Messina, G., Francavilla, V., Cincione, R., Della Malva, A., Ciliberti, M., Sevi, A., Messina, G., & Albenzio, M. (2022). Functional Properties of Meat in Athletes' Performance and Recovery. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(9), 5145. <https://doi.org/10.3390/ijerph19095145>
- Echebiri, U., Ugoh, C., Eze, F., Omeje, I., & Momoh, B. (2022). Analytical Methods in Proximate Composition of Ten Commonly Used Seasonings in Nigeria. *European Journal of Food Science and Technology*, 10(2), 24-34. <https://www.eajournals.org/wp-content/uploads/Analytical-Methods-in-Proximate-Composition.pdf>.
- El - Gendi, H., Taha, T., Basu Ray, J., & Saleh, A. (2022). Recent Advances in Bacterial Cellulose: A Low - cost Effective Production Media, Optimization Strategies and Applications. *Cellulose*, 29, 7495 - 7533. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10570-022-04697-1>

- Elmadfa, I., & Meyer, A. (2017). *Animal Proteins as Important Contributors to a Healthy Human Diet*. *Annu Rev Anim Biosci*, 5, 111-131. <https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-animal-022516-022943>.
- Escobar, P. (2019). El vino de Louis Pasteur. <https://buenosvinos.org/2019/03/07/el-vino-de-louis-pasteur/>.
- Erkmen, O. (2022). *Microbiological Analysis of Foods and Food Processing Environments*. Elsevier Inc. <https://www.sciencedirect.com/book/9780323916516/microbiological-analysis-of-foods-and-food-processing-environments#book-info>
- Fahey, G., Novotny, L., Layton, B., & Mertens, D. (2019). Critical Factors in Determining Fiber Content of Feeds and Foods and Their Ingredients. *Journal of AOAC International*, 102 (1), 52- 62. https://www.researchgate.net/publication/326805812_Critical_Factors_in_Determining_Fiber_Content_of_Feeds_and_Foods_and_Their_Ingredients.
- Ferrari, A., Vinderola, G., & Weill, R. (2020). *Alimentos fermentados: microbiología, nutrición, salud y cultura*. Instituto Danone. https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/162947/CONICET_Digital_Nro.c9ad9de6-dae1-492c-9e02-fadb3b13a8a8_B.pdf?sequence=5&isAllowed=y
- Flores, E. (2022). *Categoría de proteínas alternativas: oportunidad de negocio para Costa Rica*. [Magister en Gerencia del Comercio Internacional, Universidad Nacional de Costa Rica]. <https://repositorio.una.ac.cr/bitstream/handle/11056/23724/TFG%20ELISA%20FLORES%20Categori%CC%81a%20de%20protei%CC%81nas%20alternativas.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Flores, E. & Flores, P. (2024). Obtención de celulosa bacteriana a partir del consorcio microbiano Scoby mediante suero de leche y *Phoenix dactylifera* para su aplicación en una emulsión alimentaria. [Tesis para optar por el título profesional de Ingeniero Agroindustrial, Universidad Privada de Tacna]. <https://repositorio.upt.edu.pe/handle/20.500.12969/3914>
- Fon, M., & Zumbado, H. (2019). *Análisis proximal en alimentos. Fundamentos teóricos y técnicas experimentales*. Colloquium. https://www.researchgate.net/profile/Hector-Zumbado-Fernandez/publication/368653469_Analisis_proximal_en_alimentos_Fundamentos_teoricos_y_tecnicas_experimentales/links/63f310cf19130a1a4a92ba7a/Analisis-proximal-en-alimentos-Fundamentos-teoricos-y-tecnicas-experimentales.pdf
- Forero, V., Gómez, S., Penagos, N., & Porras, L. (2021). Producción industrial de proteína unicelular a partir de microorganismos: Una perspectiva anual. *ReCiTeIA*, 19(1), pp. 54-64. www.researchgate.net/profile/Luisa-Porras-Osorio/publication/356694010.
- García, E., & Fernández, I. (2012). *Determinación de proteínas de un alimento por el método Kjeldahl. Valoración con un ácido fuerte*. [Archivo PDF]. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/16338/Determinación%20de%20proteinas.pdf>.
- Godfrey, C., Aveyard, P., Garnett, T., Hall, J., Key, T., Lorimer, J., Pierrehumbert, R. & Scarborough, P. (2018). Meat Consumption, Health, and the Environment. *Science*, 361. https://www.researchgate.net/publication/326496818_Meat_consumption_health_and_the_environment.

- González, P., Alanís, E., Delgado, L. & Cruz, N. (2021). *Fibra dietética: historia, definición y efectos en la salud*. 9(18), pp.187.195. <https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/ICSA/article/view/6604/7989>
- Greenwalt, J. C., Steinkraus, H. K. & Ledford, A. R. (2000). Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition and claimed health effects. *Journal of Food Protection*, 63(7), 976-981. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10914673/>
- Guamán, F. (2025). *Producción de Celulosa Bacteriana con Consorcios Microbianos de Kombucha Modificados: evaluación de la Producción de Celulosa Microbiana en Té a partir de SCOBY Modificado con NaCl*. [Trabajo para optar por el título de Ingeniería Agroindustrial, Escuela Politécnica Nacional]. <https://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/26399>.
- Guha, S., Majumder, K., & Mine, Y. (2018). *Egg Proteins*. Elsevier Inc. https://www.researchgate.net/publication/326014864_Egg_Proteins.
- Guzmán, M. (2021). *Resistencia de microorganismos aislados de kombucha a condiciones del tracto gastrointestinal in vitro*. [Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Innovación Biotecnológica con opción Terminal de Tecnología Alimentaria, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco]. <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/766/1/M%c3%b3nica%20Aidee%20Guzm%c3%a1n%20Ortiz.pdf>
- Han, D., Yang, Y., Gou, Z., Dai, S., Jiang, M., Zhu, Y., Wang, Y., Yu, Z., Wang, K., Rong, C. & Yu, Y. (2024). A Review on the Interaction of Acetic Acid Bacteria and Microbes in Food Fermentation: A Microbial Ecology Perspective. *Foods*, 13(16). <https://doi.org/10.3390/foods13162534>

- Hassler, V., Brand, N. & Wefers, D. (2024). Isolation and Characterization of Exopolysaccharides from Kombucha Samples of Different Origins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 267. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.131377
- Hayes, M. (2020). Measuring Protein Content in Food: An Overview of Methods. *Food*, 9(10), 1340. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7597951/#:~:text=proteins%20is%20available,-,In%20order%20to%20determine%20the%20quantity%20of%20protein%20in%20food,total%20amino%20acid%20content%20methods.>
- Hernández, A., Ramírez, M., Arízaga, A., Flores, O., & Huitzil, I. (2014). *Medición en línea de pH, temperatura y agitación de medio de cultivo en fermentación utilizando Saccharomyces cerevisiae* [Archivo PDF]. <https://www.ecorfan.org/handbooks/Ciencias%20de%20la%20Ingenieria%20y%20Tecnologia%20T-VI/ARTICULO%2017.pdf>
- Hernández, R., Fernández, C. & Baptista, M. (2014). *Metodología de la investigación*. Mc Graw Hill. <https://academia.utp.edu.co/grupobasicoclinicayaplicadas/files/2013/06/Methodolog%C3%ADa-de-la-Investigaci%C3%B3n.pdf>.
- Hertzler, S., Lieblein, J., Weiler, M. & Allgeier, C. (2020). Plant Proteins: Assessing Their Nutritional Quality and Effects on Health and Physical Function. *Nutrients*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/nu12123704>.
- Högg, E. & Rauh, C. (2023). Towards a Better Understanding of Texturization during High-Moisture Extrusion (HME)-Part I: Modeling the Texturability of Plant-

- Based Proteins. *Food Physics and (Bio)Chemistry*, 12(10).
<https://doi.org/10.3390/foods12101955>.
- Holesh, J., Aslam, S., & Martín, A. (2023). *Physiology, carbohydrates*. StatPearls.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459280/>
- Hülßen, T., Hsieh, K., Lu, Y., Tait, S., & Batstone, D. (2018). Simultaneous treatment and single cell protein production from agri-industrial wastewaters using purple phototrophic bacteria or microalgae - A comparison. *Bioresource Technology*, 254, pp. 214 - 223. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.032>
- Içen, H., Corbo, M., Sinigaglia, M., Omurtag, B. & Bevilacqua, A. (2023). Microbiology and antimicrobial effects of kombucha, a short overview. *Food Bioscience*, 56. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212429223009215>
- Iturbe, F. & Sandoval, J. (2011). *Análisis de Alimentos Fundamentos y Técnicas*. [Archivo PDF]. https://ada.educatic.unam.mx/pluginfile.php/522/mod_assign/intro/An%C3%A1lisis%20de%20alimentos%20fundamentos%20y%20t%C3%A9cnicas.pdf
- Jayabalan, R., Malbaša, R., Lončar, E., Vitas, J. & Sathishkumar, M. (2014). A review on kombucha tea-Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effect, Toxicity and Tea Fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13. <https://www.kombuchakamp.com/wp-content/uploads/2015/07/A-Review-on-Kombucha-Tea%E2%80%94Microbiology.pdf>.
- Jayabalan, R., Malini, K., Sathishkumar, M., Swaminathan, K., & Sei-Eok, Y. (2010). Biochemical Characteristics of Tea Fungus Produced During Kombucha Fermentation [Características bioquímicas del hongo del té producido durante la fermentación de la kombucha]. *Food Science Biotechnology*, 19(3). DOI: 10.1007/s10068-010-.

- Jayaraman, P., Livingstone, A., Harikrishan, S., Vinoth, S., & Logambal, R. (2017). Evaluation of Ethanol Production using Various Carbon Substrates by *Sacharomyces Cerevisiae* and *Schizosacharomyces Bombe*. *Journal of pure and applied microbiology*, 11(3), pp. 1469 – 1478. DOI:10.22207/JPAM.11.3.31
- Jarrell, J., Walia, N., Nemergut, D., Agadi, A. & Bennett, J. (2022). Inoculation, Growth and Bactericidal Effects of Three Kombucha Cultures. *Microbiol. Res*, 13(1), 128-136. <https://doi.org/10.3390/microbiolres13010010>
- Jorgensen, P. (28 de mayo de 2023). Tutorial (estadística- Modelo Lineal General): Parte 1: ANOVA, Regresión Lineal, ANCOVA. https://www.iimyc.gob.ar/estadistica/iimyc.tutorial__estadistica_anova.regresion_HTML.html#modelos-lineales.
- Kallel, L., Desseaux, V., Hamdi, M., Stocker, P. & Ajandouz, H, E. (2012). Insights into the Fermentation Biochemistry of Kombucha Teas and Potential Impacts of Kombucha Drinking on Starch Digestion. *Food Research International*, 49, 226-232. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996912003274>
- Kapp, J., & Sumner, W. (2019). Kombucha: A Systematic Review of the Empirical Evidence of Human Health Benefit. *Annals of Epidemiology*, 30, pp. 66-70. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2018.11.001>
- Karunnamithy, V., Abdul Rahman, N., Abdullah, N., Fauzi, M., Lokanathan, Y., Min Hwei, A., Maarof, M. (2024). Effectiveness of Lyoprotectants in Protein Stabilization During Lyophilization. *Pharmaceutics*, 16(10). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16101346>.

- Karuppasamy, H., Padmanaban, V., & Durairaj, S. (2015). Nutritional Components of Seafood. *International Journal on Biological Sciences*, 6(1), 78-91. https://www.researchgate.net/publication/360672416_NUTRITIONAL_COMPONENTS_OF_SEAFOOD.
- Kieliszek, M., Kot, A., Bzducha-Wrobel, A., Blazejak, S., Gientka, I., & Kurcz, A. (2017). Biotechnological Use of Candida Yeasts in the Food Industry: A Review. *Fungal Biology Reviews*, 31(4), pp. 185-198. DOI:10.1016/j.fbr.2017.06.001
- Kitwetcharoen, H., Phung, L., 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. <https://doi.org/10.3390/fermentation9010048>.
- Kumari, A. (2020). Single Cell Protein: A Review. *Just Agriculture*, 1(1). <https://justagriculture.in/files/newsletter/sep/041.%20Single%20Cell%20Protein-%20A%20Review.pdf>.
- Landi, N., Ragucci, S., & Di Maro, A. (2021). Amino Acid Composition of Milk from Cow, Sheep and Goat Raised in Ailano and Valle Agricola, Two Localities of 'Alto Casertano' (Campania Region). *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(10), 2431. <https://doi.org/10.3390/foods10102431>
- Lemus, D, J. (2023). *Elaboración y evaluación de bebida fermentada Kombucha*. [Trabajo de investigación para optar por el título de Licenciatura en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Galileo]. https://biblioteca.galileo.edu/tesario/bitstream/123456789/1938/1/2023-T-lcta-038_lemus_godoy_josue_david%20%28Autosaved%29.pdf

- Li, Y., Ahmadi, F., Kariman, K. & Lackner, M. (2024). Recent Advances and Challenges in Single Cell Protein (SCP) Technologies for Food and Feed Production. *npj Science of Food*, 8(66). <https://doi.org/10.1038/s41538-024-00299-2>
- Licon, C. (2022). Proximate and other Chemical Analyses. McSweeney, P., & McNamara, J. (Eds). *Encyclopedia of Dairy Sciences (Third edition)*. pp.521-529. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00344-5>
- Loor, F. (2022). *Evaluación del crecimiento del cultivo simbiótico de celulosa (SCOBY) y características sensoriales en kombucha obtenida a partir de diferentes sustratos*. [Tesis de Posgrado. Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, Manta, Manabí, Ecuador.]. <https://repositorio.uleam.edu.ec/handle/123456789/4155>
- López, J, E. (2014). *Aminoácidos y proteínas*. [Título de Ingeniería en Industrias Alimentarias, Universidad Nacional de San Agustín]. <https://repositorio.unsa.edu.pe/server/api/core/bitstreams/78c7a01e-a182-49ed-abcd-7f6223fde303/content>.
- López, M., & Mohiuddin, S. (2024). Biochemistry, Essential Amino Acids. National Library of Medicine. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32496725/>
- Loveday, S. (2019). Food Proteins: Technological, Nutritional, and Sustainability Attributes of Traditional and Emerging Proteins. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10, 311-339. https://www.researchgate.net/publication/330432385_Food_Proteins_Technological_Nutritional_and_Sustainability_Attributes_of_Traditional_and_Emerging_Proteins.

- Lapeña, D., Kosa, G., Hansen, L., Mydland, L., Passoth, V., Horn, S., Eijsink, V. (2020). Production and Characterization of Yeasts Grown on Media Composed of Spruce-derived Sugars and Protein Hydrolysates from Chicken By-products. *Microbial Cell Factories*, 19 (19). <https://doi.org/10.1186/s12934-020-1287-6>
- Majumder, S., Ghosh, A., Chakraborty, S. & Bhattacharya, M. (2021). The Rhythmic Growth Pattern of Microbes is Antithetical to Antioxidant Activity of Kombucha: A New Finding in Food Biochemistry. *Asian Journal of Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*, 8(2), 1-7. https://www.researchgate.net/publication/352795603_The_Rhythmic_Growth_Pattern_of_Microbes_is_Antithetical_to_Antioxidant_Activity_of_Kombucha_A_New_Finding_in_Food_Biochemistry.
- Maliki, M., Ikhouria, E. & Aluyor, P. (2023). Proximate Analysis of Selected Agricultural Waste for their Nutritional Potential. *The North African Journal of Food and Nutritional Research*, 7(15), 117-125. <https://doi.org/10.51745/najfnr.7.15.117-125>.
- Malecki, J., Muszynski, S., & Solowiej, B. (2021). Proteins in Food Systems- Bionanomaterials, Conventional and Unconventional Sources, Functional Properties, and Development Opportunities. *Polymers*, 13. <https://www.mdpi.com/2073-4360/13/15/2506>.
- Mani, A. (2018). Food Preservation by Fermentation and Fermented Food Products. *International Journal of Academic Research & Development*, (1), 51 - 57. <http://uop.edu.pk/ocontents/Lecture%20no%207%20part%202.pdf>.
- Martín, J., Fernández, L., & Asuero, A. (2017). The Kjeldahl Titrimetric Finish: On the Ammonia Titration Trapping in Boric Acid. Dang, V (Ed). *Advances in Titration Techniques*. DOI: 10.5772/intechopen.68826

- Martínez, A. (2024). Estudio del biofilm de kombucha como tejido y su aplicación en la industria textil. [Para optar por el grado en Biología, Universidad Rey Juan Carlos]. <https://burjcdigital.urjc.es/items/f11ed143-64e1-4a6c-b5b5-bb4485320620>
- Md Noh, Mohd., Gunasegavan, R., Khalid, N., Balasubramaniam, V., Mustar, S. & Rashed, A. (2020). Recent Techniques in Nutrient Analysis for Food Composition Database. *Molecules*, 25(19). <https://doi.org/10.3390/molecules25194567>.
- Miranda, B., & Molina, M. (2015). Evaluación de factores que pueden influir en el proceso de sacarificación - fermentación simultáneas para la producción de etanol a partir de materiales amiláceos. *Ingeniería*, 25(1), 47-61. [file:///C:/Users/Dell/Downloads/14665-Texto%20del%20art%C3%ADculo-41753-2-10-20170824%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/Dell/Downloads/14665-Texto%20del%20art%C3%ADculo-41753-2-10-20170824%20(2).pdf)
- Morales, J., Maldonado, D., Espinosa, E., Rosas, F., & Luna, S. (2017). *Proteínas en alimentos: su importancia nutricional y sus efectos terapéuticos*. <https://www.revistafronterabiotecnologica.cibatlaxcala.ipn.mx/volumen/vol08/pdf/vol-08-2.pdf>.
- Morales, A. (2022). *Aplicación de mucílago de cacao como fuente de azúcares en el proceso fermentativo del scoby (Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast) para obtener una bebida fermentada*. [Proyecto de investigación previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial, Universidad técnica Estatal de Quevedo]. <https://repositorio.uteq.edu.ec/server/api/core/bitstreams/4012c41d-3393-4632-8c42-c9b8297ef3cd/content>

- Morales, L. (2014). *Desarrollo, elaboración y optimización bromatológica de una bebida de té negro fermentada a base de Manchurian fungus (kombucha) y evaluación de su actividad como potencial alimento funcional*. [Tesis de Posgrado. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <https://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/3422>
- Méndez, L. (2020). *Determinación de los parámetros de etanol en el proceso de fermentación y destilación para la producción artesanal de pox con sabor*. [Informe técnico de Residencia Profesional, Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez]. <http://repositoriodigital.tuxtla.tecnm.mx/xmlui/bitstream/handle/123456789/1576/1914.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Muhialdin, B., Osman, F., Muhamad, R., Che Wan, C., Anzian, A., Voon, W., & Meor, A. (2019). Effects of sugar sources and fermentation time on the properties of tea fungus (kombucha) beverage. *International Food Research Journal*, 26(2), 481-487. https://www.researchgate.net/publication/332898247_Effects_of_sugar_sources_and_fermentation_time_on_the_properties_of_tea_fungus_kombucha_beverage
- Mukadam, T., Punjabi, K., Deshpande, S., Vaidya, S., & Chowdhary, A. (2016). Isolation and Characterization of Bacteria and Yeast from Kombucha Tea. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(6), 32-41. <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.506.004>
- Murugesan, G.S., Sathishkumar, M. & Swaminathan, K. (2005). Supplementation of waste tea fungal biomass as a dietary ingredient for broiler chicks. *Bioresource Technology*, 96, 1743-1748. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.01.006.

- Nanda, A., Bhutan, B., Prasada, A., Prasad, A. & Prasad, A. (2021). Multiple comparison test by Tukey's honestly significant difference (HSD): Do the confident level control type I error. *International Journal of Statistics and Applied Mathematics*, 6(1), 59-65. DOI: 10.22271/math.2021.v6.i1a.636
- Nario, C., & Albaladejo, B. (2021). *FoodTech: El sector de las proteínas alternativas en Estados Unidos*. [Archivo PDF]. <https://www.icex.es/content/dam/es/icex/oficinas/070/documentos/2022/03/documentos-anexos/DOC2021897146.pdf>.
- Nasseri, T, A. Rasoul, S., Morowvat, M., & Ghasemi, Y. (2011). Single Cell Protein: Production and Process. *American Journal of Food Technology*. https://www.researchgate.net/profile/Mohammad-Hosseini-Morowvat/publication/49619680_Single_Cell_Protein_Production_and_Process/links/0c960525ff4b4c94d3000000/Single-Cell-Protein-Production-and-Process.pdf?_sg%5B0%5D=started_experiment_milestone&origin=journalDetail&_rtd=e30%3D.
- National Library of Medicine. (2016). Proximate Composition Analysis. *Prog Grus Res*, 71, 21-31. [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26939262/#:~:text=The%20proximate%20composition%20of%20foods,\(QC\)%20or%20regulatory%20purposes](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26939262/#:~:text=The%20proximate%20composition%20of%20foods,(QC)%20or%20regulatory%20purposes).
- Nummer, B. (2013). Kombucha Brewing Under the Food and Drug Administration Model Food Code: Risk Analysis and Processing Guidance. *Journal of Environmental Health*, 76(4). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24341155/>
- Nguyen, L., Do, A. & Phan, T. (2025). Development and Evaluation of Piper Sarmentosum-based Kombucha: Fermentation, Bioactivity, and Sensory Acceptance. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 75(1), 16-23.

<https://journal.pan.olsztyn.pl/pdf-199629-120853?filename=Development%20and.pdf>

Nyhan, L., Lynch, K., Sahin, A. & Arendt, E. (2022). Advances in Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Applied Microbiology*, 2(1), 73-103. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol2010005>.

Ojo, A. & de Smidt. (2023). Microbial Composition, Bioactive Compounds, Potential Benefits and Risks Associated with Kombucha: A Concise Review. *Fermentation*, 9(5), 472. <https://doi.org/10.3390/fermentation9050472>

Oreluwa, T., & Stephen, O. (2021). Fermentation in the Perspective of Agriculture. En Laranjo, M. (Ed.), *Fermentation: Processes, Benefits and Risks*, DOI: 10.5772/intechopen.87513.

Organización de las Naciones Unidas. (2023). *Objetivo 2: Poner fin al hambre*. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/hunger/>.

Organización de las Naciones Unidas, Departamento de Asuntos Económicos y Sociales. (2022). *World Population Prospects 2022: Summary Results*. [Archivo PDF]. https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pd/files/wpp2022_summary_of_results.pdf.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Fondo Internacional de Desarrollo Agrícola, Organización Mundial de la Salud, Programa Mundial de Alimentos, & Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (2022). *El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo*. <https://www.fao.org/3/cc0640es/cc0640es.pdf>.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (8 de diciembre de 2023). *La ganadería representa el 12 % de las emisiones de*

gases con efecto invernadero. <https://www.fao.org/republica-dominicana/noticias/detail-events/es/c/1675383/>

Oshoma, C., Eguakun, O. & Obuekwe, I. (2017). Utilization of Banana Peel as a Substrate for Single Cell Protein and Amylase Production by *Aspergillus niger*. *African Scientist*, 18(3).

<https://publications.africanscientistjournal.org/sites/default/files/2022-12/310-1196-1-PB.pdf>.

Palmerín, D., Guevara, L., Villaseñor, F., & Pérez, C. (2011). Identificación de una levadura para producción de proteína unicelular para consumo humano y determinación de los parámetros cinéticos a nivel de matraces agitados. *Ciencia@UAQ*, 4(2), 35-46.

https://www.uaq.mx/investigacion/revista_ciencia@uaq/ArchivosPDF/v4-n2/t5.pdf

Pérez, J. (2020). Estudio del efecto de pH y relación sustrato/inóculo sobre la producción de ácidos grasos volátiles durante la fermentación de lactosuero. [Trabajo de investigación, Universidad Veracruzana]. https://www.researchgate.net/publication/355032617_Estudio_del_efecto_de_pH_y_relacion_sustratoinoculo_sobre_la_produccion_de_acidos_grasos_volatiles_durante_la_fermentacion_de_lactosuero.

Peteghem, V, L., Sakarika, M., Matassa, S. & Rabaey, K. (2022). The Role of Microorganisms and Carbon-to-Nitrogen Ratios for Microbial Protein Production from Bioethanol. *Biotechnology*, 88(22). <https://doi.org/10.1128/aem.01188-22>.

Piercy, E., Verstraete, W., Ellis, P., Rockstrom, J., Smith, P., Witard, O., Hallett, J., Hogstrand, C., Knott, G., Karwati, A., Felambohangry, H., Leslie, A., He, Y.,

- Banks, M., & Guo, M. (2022). *A Sustainable Waste-to-protein System to Maximise Waste Resource Utilization for Developing Food-and- feed-grade Protein Solutions*. [PDF]. <https://arxiv.org/pdf/2208.07703>
- Pocco, M. (2019). Comparación de métodos de extracción de aceite por soxhlet y ultrasonido a partir del nogal andino (*Junglans regia* L.). [Tesis para optar por el título de ingeniero agroindustrial, Universidad Nacional José María Arguedas]. <https://repositorio.unajma.edu.pe/handle/20.500.14168/871>
- Prieto, B. (2017). El uso de los métodos deductivo e inductivo para aumentar la eficiencia del procesamiento de adquisición de evidencias digitales. *Cuaderno de Contabilidad*, 18(46). <http://www.scielo.org.co/pdf/cuco/v18n46/0123-1472-cuco-18-46-00056.pdf>.
- Quesada, D., & Gómez, G. (2019). ¿Proteínas de origen vegetal o de origen animal?: Una mirada a su impacto sobre la salud y el medio ambiente. *Revista de Nutrición Clínica y Metabolismo*, 2(1), 79-86. <https://www.kerwa.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/82330/2019%20Articulo%20Prote%C3%ADnas%20vegetales%20y%20animales.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Ramakrishnan, I. (2022). Microbial and Chemical Profiles of Kombucha made from Freeze-dried SCOBY. [Tesis de maestría, Cornell University]. <https://hdl.handle.net/1813/113192>.
- Ramírez, Y., Di Monte, V., Peltzer, M. & Salvay, A. (2022). Bacterial Cellulose Films Production by Kombucha Symbiotic Community Cultured on Different Herbal Infusions. *Food Chemistry*, 372. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131346>

- Ramos, C. (2020). Los Alcances de una Investigación. *Ciencia América*, 9(3).
<https://cienciamerica.edu.ec/index.php/uti/article/view/336/621>
- Ramos, C. (2021). Diseño de Investigación Experimental. *Ciencia América*, 10(1).
<https://cienciamerica.edu.ec/index.php/uti/article/view/356/698>
- Ritchie, H., Rosado, P., & Roser, M. (2017). *Meat and Dairy Production*. Our World on Data. <https://ourworldindata.org/meat-production?>
- Román, J., García, I., Santos, I., García, T. & Mauricio, J. (2023). Latest Trends in Industrial Vinegar Production and the Role of Acetic Acid Bacteria: Classification, Metabolism, and Applications - A Comprehensive Review. *Foods*, 12(19). <https://doi.org/10.3390/foods12193705>
- Saadah, S., Tulandi, M, S. & Sarmila, S. (2025). Optimizing Fermentation Time for Maximum Micronutrient Content in Kombucha made from *Sandoricum koetjape* stem. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1478.
<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/1478/1/012004/pdf>
- Sáenz, P., García, A., & Martín, J. (2019). An Annotation on the Kjeldahl Method. *A Real Acad Farm*, 85(1), 14-19.
https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/96406/ARANF_garcia-asuero_2019_una-anotacion.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Saini, R., Prasad, P., Shang, X., & Keum, Y. (2021). Advances in Lipid Extraction Methods-A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22.
https://www.researchgate.net/publication/357191348_Advances_in_Lipid_Extraction_Methods-A_Review.
- Sánchez, A, C. (2021). Guía para la determinación de contenido de humedad en granos y cereales. [Archivo PDF]. <https://inm.gov.co/wp->

content/uploads/2022/11/17_2022_GUIA-DETERMINACION-CONTENIDO-DE-HUMEDAD.pdf.

Santos, M. (2016). *Evaluación enológica de co-inoculación de levaduras Saccharomyces y no-Saccharomyces en vinos chilenos*. [Proyecto fin de carrera de Ingeniería Química, Universidad Politécnica de Madrid]. https://oa.upm.es/43986/1/TFG_MARIA_DE_LA_CRUZ_SANTOS_NAVARRETE.pdf

Sarbu, I., & Csutak, O. (2019). The Microbiology of Cocoa Fermentation. *Caffeinated and Cocoa Based Beverages*, 8, 423-446. <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/acetic-acid-bacteria#:~:text=The%20acetic%20acid%20fermentation%20is,part%20is%20transformed%20into%20acetoin.>

Salazar, A, L., Hurtado, R, J., Ayala, A, V. & Mazacón, C, M. (2025). El papel de las proteínas en la recuperación y crecimiento celular. *LATAM Revista Latinoamericana de Ciencias Sociales y Humanidades*, 6(3), 478. <https://latam.redilat.org/index.php/lt/article/view/3961/7422>.

Salazar, L., & Muñoz, G. (2019). Seguridad alimentaria en América Latina y el Caribe. <https://publications.iadb.org/es/seguridad-alimentaria-en-america-latina-y-el-caribe>.

Sekoai, P., Roets, Y., O'Brien, F., Ramchuran, S., & Chunilall, V. (2024). Valorization of Food Waste into Single-cell protein: An Innovative Technological Strategy for Sustainable Protein Production. *Microorganisms*, 12(166). DOI: 10.3390/microorganisms12010166

- Setyaningsih, W., Reza, W., Dewi, I., Yanti, R., & Utami, T. (2025). Bioprocess Strategies for Maximizing SCOBY Growth and Evaluating Fermentation Dynamics on Phenolic Content and Antioxidant Activity in Roselle-based Kombucha. *Phytomedicine Plus*, 5, <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2025.100791>.
- Seguel, C., Soto, E., Marín, J. (2017). Parámetros cinéticos de fermentación de la macroalga *Gracilaria chilensis*. *Interciencia: Revista de Ciencia y Tecnología de América*, 42 (10), 641-645. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7682683>
- Sharif, M., Hammad, M., Islam, A. Saeed, M., Farag, M., & Alagawany, M. (2021). Single cell protein: Sources, Mechanism of Production, Nutritional Value and its Uses in Aquaculture Nutrition. *Aquaculture*, 531. https://www.researchgate.net/publication/346732659_Single_cell_protein_Sources_mechanism_of_production_nutritional_value_and_its_uses_in_aquaculture_nutrition#:~:text=In%20addition%20to%20high%20content,%2C%20fats%2C%20minerals%20and%20vitamins.
- Sharma, R., Garg, P., K., Kant, S., & Kulshrestha, S. (2020). *La fermentación microbiana y su papel en la mejora de la calidad de los alimentos fermentados*. *Fermentación*, 6 (4), 106. <https://www.mdpi.com/2311-5637/6/4/106>
- Silva, J., Meireles, I., Lima, I., & Tribuzy, Á. (2022). *Kombucha: Formulación, composición química y potencialidades terapéuticas*. *Investigación actual en ciencia de los alimentos*, 5, 360-365. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2665927122000235?via%3Dihub#bib1>.

- Sourvinos, G. (2022). Methods Involved in Aerobic and Anaerobic Fermentation. *Journal of Probiotics & Health*, 10(6). <https://www.longdom.org/open-access/methods-involved-in-aerobic-and-anaerobic-fermentation-93271.html>
- Song, J., Luo, C., Lim, L., Cheong, K. L., Farhadi, A., & Tan, K. (2025). Protein Quality of Commercially Important Edible Bivalves. *Critical reviews in food science and nutrition*, 65(10), 1950–1961. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38329037/>
- Srividya, A., Vishnuvarthan, V., Murugappan, M., & Gopal, P. (2014). Single Cell Protein-A Review. *International Journal for Pharmaceutical Research Scholars*, 2(4). https://www.researchgate.net/publication/259694851_Single_cell_Protein-A_Review.
- Raziq, A., Lateef, M., Ullah, A., Ullah, H., & Waseem, M. (2020). Single Cell Protein (SCP) Production and Potential Substrates: A Comprehensive Review. *Pure and Applied Biology*, 9(3), 1743-1754. <http://dx.doi.org/10.19045/bspab.2020.90185>.
- Thiviya, P., Gamage, A., Kapilan, R., Merah, O. & Madhujith, T. (2022). Producción de proteínas unicelulares a partir de diferentes residuos de frutas: una revisión. *Calidad y Seguridad Alimentaria: Avances en Metodos Analiticos y Aplicaciones* 9(7), 178. <https://doi.org/10.3390/separations9070178>.
- Tirado, D., Montero, P., & Acevedo, D. (2015). Estudio comparativo de métodos empleados para la determinación de humedad de varias matrices alimentarias. *Información Tecnológica*, 26(2), 3-10. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v26n2/art02.pdf>.
- Tian, Y., Li, J., Meng, J., & Li, J. (2023). High-yield Production of Single-cell Protein from Starch Processing Wastewater Using Co-cultivation of Yeasts.

Bioresource Technology, Vol. 370.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852422018600?via%3Dihub>

Torrejón, A. (09 de septiembre de 2020). *Single Cell Protein: la alternativa a las proteínas de origen animal para el desarrollo de nuevos ingredientes.*

<https://www.ainia.es/ainia-news/single-cell-protein-alternativa-proteinas-origen-animal-desarrollo-nuevos-ingredientes/>.

Treviño, M., Guerrero, A., González, R., García, C., Guzmán, A., Báez, J. & Márquez, J. (2020). Production of Microbial Cellulose Films from Green Tea (*Camellia*

Sinensis) Kombucha with Various Carbon Sources. *Coatings*, 10 (11), 1132. <https://doi.org/10.3390/coatings10111132>.

Ugbogu, E. & Ugbogu, O. (2016). A review of microbial protein production: prospects and challenges. *FUW Trend in Science and Technology Journal*, 1(1), 182-185.

[https://www.researchgate.net/profile/Ositadinma-](https://www.researchgate.net/profile/Ositadinma-Ugbogu/publication/305607422_A_REVIEW_OF_MICROBIAL_PROTEIN_PRODUCTION_PROSPECTS_AND_CHALLENGES/links/57951bf008aeb0ffc4c231/A-REVIEW-OF-MICROBIAL-PROTEIN-PRODUCTION-PROSPECTS-AND-CHALLENGES.pdf)

[Ugbogu/publication/305607422_A_REVIEW_OF_MICROBIAL_PROTEIN_PRODUCTION_PROSPECTS_AND_CHALLENGES/links/57951bf008aeb0ffc4c231/A-REVIEW-OF-MICROBIAL-PROTEIN-PRODUCTION-PROSPECTS-AND-CHALLENGES.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Ositadinma-Ugbogu/publication/305607422_A_REVIEW_OF_MICROBIAL_PROTEIN_PRODUCTION_PROSPECTS_AND_CHALLENGES/links/57951bf008aeb0ffc4c231/A-REVIEW-OF-MICROBIAL-PROTEIN-PRODUCTION-PROSPECTS-AND-CHALLENGES.pdf).

Ullah, S., Ullah, M., Rahim, G., Khan, S. & Ullah, I. (2023). Proximate Analysis and Mineral Composition of Some Selected Medicinal Plants of Malakand Division, Pakistan. *Natural Products Chemistry and Research*, 11(3), 008-0012.

<https://www.iomcworld.com/open-access/proximate-analysis-and-mineral-composition-of-some-selected-medicinal-plants-of-malakand-division-pakistan.pdf>.

- Universidad Técnica Nacional. (2023). Plan General de Investigación. https://drive.google.com/drive/folders/1LNUy9SFR56fHALtVbzS_VDDFNdrhq_nWR
- Upadhyaya, S., Tiwari, S., Arora, N., & Singh, D. (2016). *Microbial Protein: A valuable component for future food security*. [Archivo PDF]. https://www.researchgate.net/publication/288761631_Microbial_Protein_A_Valuable_Component_for_Future_Food_Security.
- Vargas, F. (2011). *Elaboración de una bebida refrescante fermentando la simbiosis kombucha con el objeto de mejorar la calidad de vida de los consumidores de bebidas no alcohólicas*. [Tesis de Grado. Universidad Técnica de Ambato]. <https://repositorio.uta.edu.ec/server/api/core/bitstreams/74cdd257-0252-4ace-8c99-7060d3522cdb/content>.
- Valdiviezo, N. (2024). Obtención y caracterización de celulosa microbiana de Kombucha (*Medusomyces gisevi*) desarrollados a partir de té negro (*Camellia sinensis*) y Flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), considerando distintas concentraciones de sacarosa, y su aplicación en la elaboración de productos biodegradables. [Trabajo para optar por el título de ingeniero en Biotecnología. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <https://repositoriobe.espe.edu.ec/server/api/core/bitstreams/c043c277-7665-4cdc-b52e-a4d43733f929/content>
- Vega, G. (02 de octubre de 2020). Proteína microbiana, una nueva alternativa en ingredientes. <https://thefoodtech.com/ingredientes-y-aditivos-alimentarios/proteina-microbiana-una-nueva-alternativa-en-ingredientes/>

- Vega, N., & Reyes, E. (2020). Introducción al análisis estructural de proteínas y glicoproteínas. (1ª ed.). Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/81133>
- Vegas, R., Acosta, Y., & Fernández, C. (2024). Obtención, purificación y aprovechamiento de azúcares reductores a partir de materiales lignocelulósicos. *Revista Boliviana de Química*, 41(2), pp. 67-84. <https://doi.org/10.34098/2078-3949.41.2.2>
- Villarreal, S., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, P. J. & Taillandier, P. (2018). Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of Food Science*, 83(3). DOI: 10.1111/1750-3841.14068.
- Voidarou, C., Antoniadou, M., Rozos, G., Tzora, A., Skoufos, I., Varzakas, T., Lagiou, A., & Bezirtzoglou, E. (2020). Fermentative Foods: Microbiology, Biochemistry, Potential Human Health Benefits and Public Health Issues. *Foods*, 10(1), DOI: 10.3390/foods10010069
- Vohra, B., Fazry, S., Sairi, F. & Othman, B. (2019). Effects of Medium Variation and Fermentation Time Towards the pH Level and Ethanol Content of Kombucha. *API Conference Proceedings* 2111, 040008. https://www.researchgate.net/publication/334093327_Effects_of_medium_variation_and_fermentation_time_towards_the_pH_level_and_ethanol_content_of_Kombucha.
- Wang, B., Rutherford-Markwick, K., Zhang, X.-X., & Mutukumira, A. (2022). Kombucha: Production and Microbiological Research. *Foods*, 11(21), 3456. <https://doi.org/10.3390/foods11213456>.
- Wang, B., Rutherford-Markwick, K., Naren, N., Zhang, X.-X., & Mutukumira, A. (2023a). Microbiological and Physico-Chemical Characteristics of Black Tea

- Kombucha Fermented with a New Zealand Starter Culture. *Foods*, 12(12), 2314. <https://doi.org/10.3390/foods12122314>.
- Wang, W., Liang, L., Wang, B., Bi, H., Su, H., Liao, C., & Niu, F. (2023b). Ethanol Synthesis by *Saccharomyces cerevisiae*: Summary, Discovery, and Prospects. *Preprints*, DOI:10.20944/preprints202305.0625.v1
- Yadav, G., Kumar, R. & Sen, R., (2014). Fermentation Techniques in Bioenergy Production. *Marine Bioenergy: Trends and Developments*. DOI: 10.1201/b18494-10
- Yij, R., Nazri, M., Roslan, J., Hayati, N., Huda, N. & Khalizan, M. (2024). Chemical Profile, Antioxidants, and Enzymatic Activity of the Kombucha Tea Beverages as a Potential Anti-obesity Beverage. *Journal of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology*, 12(1), 16-18. https://www.researchgate.net/publication/382739764_Chemical_Profile_Antioxidants_and_Enzymatic_Activity_of_the_Kombucha_Tea_Beverages_as_a_Potential_Anti-obesity_Beverage.
- Yimam, M., Andreini, M., Carnevale, S., & Muscaritoli, M. (2024). The Role of Algae, Fungi, and Insect-derived Proteins and bioactive Peptides in Preventive and Clinical Nutrition. *Frontier in Nutrition*, 11, 1461621. <https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1461621>
- Ye, Y., Cai, Y., Wang, F., He, Y., Yang, Y., Guo, Z., Liu, M., Ren, H., Wang, S., Liu, D., Xu, J., & Wang, Z. (2025). Industrial Microbial Technologies for Feed Protein Production from Non-Protein Nitrogen. *Microorganisms*, 13(742), pp. 1-27. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13040742>

- Zandona, E., Blazic, M., & Rezek, A. (2021). Whey Utilization: Sustainable Uses and Environmental Approach. *Food Technology and Biotechnology*, 59(2). <http://www.ftb.com.hr/images/pdfarticles/2021/April-June/FTB-59-147.pdf>.
- Zarrinmehr, M., Daneshvar, E., Nigam, S., Gopinath, K., Biswas, J., Kwon, E., Wang, H., Farhadian, O. & Bhatnagar, A. (2022). The effect of solvents polarity and extraction conditions on the microalgal lipids yield, fatty acids profile, and biodiesel properties. *Bioresource Technology*, vol. 344. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126303>
- Zhao, Z., Sui Y., Wu, H. & Zhou, C. (2018). Flavour Chemical Dynamics during Fermentation of Kombucha Tea. *Emirates Journal of Food Agriculture*, 30(9), 732-741. https://www.researchgate.net/publication/329355839_Flavour_chemical_dynamics_during_fermentation_of_kombucha_tea.
- Zhang, J., Van, J., Dias, D., & Schwan, R. (2021a). The Chemistry and Sensory Characteristics of New Herbal Tea-based Kombuchas. *Journal of Food Science*, 86(3), 740–748. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15613>
- Zhang, L., Zhou, P., Chen, C, Y., Cao, Q., Liu, F. & Li, D. (2021). The Production of Single Cell Protein from Biogas Slurry with High Ammonia-nitrogen Content by Screened *Nectaromyces rattus*. *Poultry Science*, 100(9). <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101334>.
- Zou, X., He, J., Zhao, D., Zhang, M., Xie, Y., Dai, C., Wang, C., & Li, C. (2020). Cambios estructurales y evolución de los péptidos durante el almacenamiento refrigerado de carne de cerdo. *Fronteras en Nutrición*, 7, 151. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00151>

VII. APÉNDICES

Apéndice 1

Resultados obtenidos del análisis proximal para los días 14 y 21 para las muestras obtenidas en la prueba preliminar 2



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

2/4
SAQ-8228-2024

RE-PRSA#000004 Versión 9 03/11/2023

RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS REALIZADOS POR NÚMERO DE MUESTRA

# Muestra:	SAQ-8228-1	
Descripción:		
Biomasa (SCOBY) A14-1		
Análisis	Resultado	Método Empleado
Ceniza	(Menor a 0,10) g/100 g	940.26 AOAC, P-SA-MQ-004 (MA-SALQ#000004)
Grasa cruda	(0,2560 ± 0,0040) g/100 g	Carpenter, D.; Ngeh-Ngwainbi, J. & Lee, S. Lipid Analysis en Methods of Analysis for Nutrition Labeling. AOAC International, P-SA-MQ-005 (MA-SALQ#000005)
Humedad	(93,1 ± 5,7) g/100 g	920.151 AOAC, P-SA-MQ-002 (MA-SALQ#000002)
Proteína (Nx6,25)	(0,177 ± 0,017) g/100 g	979.09 AOAC modificado, P-SA-MQ-003 (MA-SALQ#000003)
Fibra soluble	(Menor a 0,50) g/100 g	993.19 AOAC
Fibra insoluble	(1,72 ± 0,34) g/100 g	991.42 AOAC

# Muestra:	SAQ-8228-2	
Descripción:		
Biomasa (SCOBY) B14-1		
Análisis	Resultado	Método Empleado
Ceniza	(Menor a 0,10) g/100 g	940.26 AOAC, P-SA-MQ-004 (MA-SALQ#000004)
Grasa cruda	(Menor a 0,10) g/100 g	Carpenter, D.; Ngeh-Ngwainbi, J. & Lee, S. Lipid Analysis en Methods of Analysis for Nutrition Labeling. AOAC International, P-SA-MQ-005 (MA-SALQ#000005)
Humedad	(90,7 ± 5,5) g/100 g	920.151 AOAC, P-SA-MQ-002 (MA-SALQ#000002)



CENTRO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

TEL: 2511-7223, FAX: 2253-3762

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio 100 m oeste detrás de la Facultad de Ciencias Agroalimentarias

Continuación Apéndice 1

UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA3/4
SAQ-8228-2024
RE-PRSA#000004 Versión 9 03/11/2023

# Muestra:		SAQ-8228-2	
Descripción:			
Biomasa (SCOBY) B14-1			
Análisis	Resultado	Método Empleado	
Proteína (Nx6,25)	(0,202 ± 0,020) g/100 g	979.09 AOAC modificado, P-SA-MQ-003 (MA-SALQ#000003)	
Fibra soluble	(Menor a 0,50) g/100 g	993.19 AOAC	
Fibra insoluble	(1,84 ± 0,36) g/100 g	991.42 AOAC	

# Muestra:		SAQ-8228-3	
Descripción:			
Biomasa (SCOBY) A21-1			
Análisis	Resultado	Método Empleado	
Ceniza	(Menor a 0,10) g/100 g	940.26 AOAC, P-SA-MQ-004 (MA-SALQ#000004)	
Grasa cruda	(Menor a 0,10) g/100 g	Carpenter, D.; Ngeh-Ngwainbi, J. & Lee, S. Lipid Analysis en Methods of Analysis for Nutrition Labeling. AOAC International, P-SA-MQ-005 (MA-SALQ#000005)	
Humedad	(93,1 ± 5,7) g/100 g	920.151 AOAC, P-SA-MQ-002 (MA-SALQ#000002)	
Proteína (Nx6,25)	(0,222 ± 0,021) g/100 g	979.09 AOAC modificado, P-SA-MQ-003 (MA-SALQ#000003)	
Fibra soluble	(Menor a 0,50) g/100 g	993.19 AOAC	
Fibra insoluble	(2,03 ± 0,40) g/100 g	991.42 AOAC	

# Muestra:		SAQ-8228-4	
Descripción:			
Biomasa (SCOBY) B21-1			
Análisis	Resultado	Método Empleado	
Ceniza	(Menor a 0,10) g/100 g	940.26 AOAC, P-SA-MQ-004 (MA-SALQ#000004)	



CENTRO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

TEL: 2511-7223, FAX: 2253-3762

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio 100 m oeste detrás de la Facultad de Ciencias Agroalimentarias

Continuación Apéndice 1

UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

4/4

SAQ-8228-2024

RE-PRSA#000004 Versión 9 03/11/2023

# Muestra:	SAQ-8228-4	
Descripción:		
Biomasa (SCOBY) B21-1		
Análisis	Resultado	Método Empleado
Grasa cruda	(Menor a 0,10) g/100 g	Carpenter, D.; Ngeh-Ngwainbi, J. & Lee, S. Lipid Analysis en Methods of Analysis for Nutrition Labeling. AOAC International, P-SA-MQ-005 (MA-SALQ#000005)
Humedad	(90,7 ± 5,5) g/100 g	920.151 AOAC, P-SA-MQ-002 (MA-SALQ#000002)
Proteína (Nx6,25)	(0,169 ± 0,016) g/100 g	979.09 AOAC modificado, P-SA-MQ-003 (MA-SALQ#000003)
Fibra soluble	(Menor a 0,50) g/100 g	993.19 AOAC
Fibra insoluble	(1,97 ± 0,38) g/100 g	991.42 AOAC

GRACIELA ARTAVIA GONZALEZ (FIRMA)
PERSONA FÍSICA, CPF-01-1238-0157.
Fecha declarada: 13/12/2024 02:41:16 PM
Esta es una representación gráfica únicamente,
verifique la validez de la firma.

Emitido por: Lic. Graciela Artavia González

GERENTE TÉCNICO

LABORATORIO QUÍMICO DE ALIMENTOS



***** ÚLTIMA LINEA *****



CENTRO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

TEL: 2511-7223, FAX: 2253-3762

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio 100 m oeste detrás de la Facultad de Ciencias Agroalimentarias

Apéndice 2

Resultados obtenidos del análisis proximal para el día 21 y concentración 7 % para la muestra obtenida en la prueba preliminar 3



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

2/2
SAQ-8613-2025

RE-PRSA#000004 Versión 9 03/11/2023

RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS REALIZADOS POR NÚMERO DE MUESTRA

# Muestra:	SAQ-8613-1	
Descripción:		
Biomasa microbiana A21 202		
Análisis	Resultado	Método Empleado
Carbohidratos totales	(95 ± 12) g/100 g	Por diferencia 100-(%Humedad + %Ceniza + %Proteína + %Grasa)
Ceniza	(0,317 ± 0,011) g/100 g	925.51 AOAC, P-SA-MQ-004 (MA-SALQ#000004)
Grasa cruda	(0,1340 ± 0,0090) g/100 g	11.0 ASTA, Official Analytical Methods, P-SA-MQ-005 (MA-SALQ#000005)
Humedad en fresco [en liofilizado]	(93,7 ± 7,9) g/100 g [3,14 ± 0,27] g/100 g	964.22 AOAC, P-SA-MQ-002 (MA-SALQ#000002)
Proteína (Nx6,25)	(1,474 ± 0,085) g/100 g	920.152 AOAC modificado, P-SA-MQ-003 (MA-SALQ#000003)*
Fibra soluble	(1,08 ± 0,21) g/100 g	993.19 AOAC
Fibra insoluble	(22,1 ± 4,2) g/100 g	991.42 AOAC

GRACIELA ARTAVIA GONZALEZ (FIRMA)
PERSONA FÍSICA, CPF-01-1238-0157.
Fecha declarada: 01/04/2025 11:52:31 AM
Esta es una representación gráfica únicamente,
verifique la validez de la firma.

Emitido por: Lic. Graciela Artavia González

GERENTE TÉCNICO

LABORATORIO QUÍMICO DE ALIMENTOS



***** ÚLTIMA LINEA *****



CENTRO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

TEL: 2511-7223, FAX: 2253-3762

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio 100 m oeste detrás de la Facultad de Ciencias Agroalimentarias

Apéndice 3

Datos experimentales para el cálculo de la tasa de crecimiento

Tabla 12

Masa del SCOBY para las tres corridas definitivas a lo largo del tiempo de fermentación

Fecha	8/2/2025	15/2/2025	22/2/2025	1/3/2025	8/3/2025
Masa (g) - corrida 1					
Muestra	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
A1-1	50,00	100,00	164,00	162,00	225,00
A1-2	50,00	109,00	165,00	150,00	261,00
A1-3	50,00	113,00	157,00	175,00	246,00
B1-1	50,00	74,00	141,00	123,00	167,00
B1-2	50,00	80,00	148,00	155,00	227,00
B1-3	50,00	83,00	151,00	118,00	176,00

Fecha	8/3/2025	15/3/2025	22/3/2025	29/3/2025	5/4/2025
Masa (g) - corrida 2					
Muestra	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
A1-1	50,00	89,00	187,00	181,00	143,00
A1-2	50,00	124,00	133,00	192,00	145,00
A1-3	50,00	114,00	135,00	218,00	152,00
B1-1	50,00	120,00	127,00	165,00	150,00
B1-2	50,00	110,00	148,00	193,00	140,00
B1-3	50,00	116,00	163,00	177,00	139,00

Fecha	29/3/2025	5/4/2025	12/4/2025	19/4/2025	26/4/2025
Masa (g) - corrida 3					
Muestra	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
A1-1	50,00	78,00	115,00	215,00	206,00
A1-2	50,00	96,00	133,00	229,00	240,00
A1-3	50,00	73,00	132,00	264,00	153,00
B1-1	50,00	70,00	100,00	175,00	117,00
B1-2	50,00	75,00	83,00	188,00	100,00
B1-3	50,00	84,00	91,00	150,00	105,00

Nota: A = 7,0 % azúcar; B = 10,5 % azúcar.

Tabla 13

Aumento de masa del SCOBY para las tres corridas definitivas a lo largo del tiempo de fermentación

Fecha	8/2/2025	15/2/2025	22/2/2025	1/3/2025	8/3/2025
Aumento de masa (g) - corrida 1					
Muestra	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
A1-1	-	50,00	114,00	112,00	175,00
A1-2	-	59,00	115,00	100,00	211,00
A1-3	-	63,00	107,00	125,00	196,00
B1-1	-	24,00	91,00	73,00	117,00
B1-2	-	30,00	98,00	105,00	177,00
B1-3	-	33,00	101,00	68,00	126,00

Fecha	8/3/2025	15/3/2025	22/3/2025	29/3/2025	5/4/2025
Aumento de masa (g) - corrida 2					
Muestra	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
A1-1	-	39,00	137,00	131,00	93,00
A1-2	-	74,00	83,00	142,00	95,00
A1-3	-	64,00	85,00	168,00	102,00
B1-1	-	70,00	77,00	115,00	100,00
B1-2	-	60,00	98,00	143,00	90,00
B1-3	-	66,00	113,00	127,00	89,00

Fecha	29/3/2025	5/4/2025	12/4/2025	19/4/2025	26/4/2025
Aumento de masa (g) - corrida 3					
Muestra	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
A1-1	-	28,00	65,00	165,00	156,00
A1-2	-	46,00	83,00	179,00	190,00
A1-3	-	23,00	82,00	214,00	103,00
B1-1	-	20,00	50,00	125,00	67,00
B1-2	-	25,00	33,00	138,00	50,00
B1-3	-	34,00	41,00	100,00	55,00

Nota: A = 7,0 % azúcar; B = 10,5 % azúcar.

Apéndice 4

Resultados obtenidos del análisis proximal para las tres corridas definitivas

Informe de Ensayos

Cliente: Universidad Técnica Nacional		Código del informe: U037-040825-01
		Fecha del muestreo: 15-02-2025
Muestreado por: El Interesado		Fecha de recepción: 05-06-2025
Dirección: Sede Atenas, Provincia: Alajuela, Cantón: Atenas Distrito: Balsa de Atenas, antigua Escuela de Ganadería.		Fecha de reporte: 04-08-2025
Permiso Sanitario de Funcionamiento del Laboratorio San Martín #1794-2023 dado el 09/12/2023, vence el 09/12/2025, y #1887-2024 dado el 09/12/2024, vence el 11/11/2026.		
Metodología de análisis: de acuerdo al procedimiento AOAC y al procedimiento FAO.		
Métodos de análisis acreditados por el ECA identificados en este informe por medio de un asterisco (*). Para consulta de variables acreditadas ingresar a la página del ECA (http://www.eca.or.cr/acr_lab.php) en el link del Laboratorio San Martín.		
Código LSM	NB25-0045	
Punto de muestreo	Muestra: A1-7	
Ensayo	Resultado	
*Humedad (%)	93,15	
**Cenizas (%)	0,05	
**Grasa (%)	0,01	
**Proteína (%)	0,14	
**Carbohidratos totales (%)	6,66	
**Fibra soluble (%)	0,11	
**Fibra insoluble (%)	2,24	
Observaciones: Ejecución de actividades del Laboratorio: 05/06/2025 - 04/08/2025 Los resultados de los análisis de este informe, solamente se refieren a las muestras aquí descritas (**) Método de ensayo no acreditado		

Informe de Ensayos

Cliente: Universidad Técnica Nacional		Código del informe: U037-040825-02
		Fecha del muestreo: 22-02-2025
Muestreado por: El Interesado		Fecha de recepción: 05-06-2025
Dirección: Sede Atenas, Provincia: Alajuela, Cantón: Atenas Distrito: Balsa de Atenas, antigua Escuela de Ganadería.		Fecha de reporte: 04-08-2025
Permiso Sanitario de Funcionamiento del Laboratorio San Martín #1794-2023 dado el 09/12/2023, vence el 09/12/2025, y #1887-2024 dado el 09/12/2024, vence el 11/11/2026.		
Metodología de análisis: de acuerdo al procedimiento AOAC y al procedimiento FAO.		
Métodos de análisis acreditados por el ECA identificados en este informe por medio de un asterisco (*). Para consulta de variables acreditadas ingresar a la página del ECA (http://www.eca.or.cr/acr_lab.php) en el link del Laboratorio San Martín.		
Código LSM	NB25-0046	
Punto de muestreo	Muestra: A1-14	
Ensayo	Resultado	
*Humedad (%)	93,35	
**Cenizas (%)	0,06	
**Grasa (%)	0,01	
**Proteína (%)	0,18	
**Carbohidratos totales (%)	6,41	
**Fibra soluble (%)	0,13	
**Fibra insoluble (%)	1,71	
Observaciones: Ejecución de actividades del Laboratorio: 05/06/2025 - 04/08/2025 Los resultados de los análisis de este informe, solamente se refieren a las muestras aquí descritas (**) Método de ensayo no acreditado		

Continuación Apéndice 4

Informe de Ensayos

Cliente: Universidad Técnica Nacional		Código del informe: U037-040825-03
		Fecha del muestreo: 01-03-2025
Muestreado por: El Interesado		Fecha de recepción: 05-06-2025
Dirección: Sede Atenas, Provincia: Alajuela, Cantón: Atenas Distrito: Balsa de Atenas, antigua Escuela de Ganadería.		Fecha de reporte: 04-08-2025
Permiso Sanitario de Funcionamiento del Laboratorio San Martín #1794-2023 dado el 09/12/2023, vence el 09/12/2025, y #1887-2024 dado el 09/12/2024, vence el 11/11/2026.		
Metodología de análisis: de acuerdo al procedimiento AOAC y al procedimiento FAO.		
Métodos de análisis acreditados por el ECA identificados en este informe por medio de un asterisco (*). Para consulta de variables acreditadas ingresar a la página del ECA (http://www.eca.or.cr/acr_lab.php) en el link del Laboratorio San Martín.		
Código LSM	NB25-0047	
Punto de muestreo	Muestra: A1-21	
Ensayo	Resultado	
*Humedad (%)	93,23	
**Cenizas (%)	0,04	
**Grasa (%)	0,01	
**Proteína (%)	0,15	
**Carbohidratos totales (%)	6,57	
**Fibra soluble (%)	0,15	
**Fibra insoluble (%)	2,21	
Observaciones: Ejecución de actividades del Laboratorio: 05/06/2025 - 04/08/2025 Los resultados de los análisis de este informe, solamente se refieren a las muestras aquí descritas (**) Método de ensayo no acreditado		

Informe de Ensayos

Cliente: Universidad Técnica Nacional		Código del informe: U037-040825-04
		Fecha del muestreo: 08-03-2025
Muestreado por: El Interesado		Fecha de recepción: 05-06-2025
Dirección: Sede Atenas, Provincia: Alajuela, Cantón: Atenas Distrito: Balsa de Atenas, antigua Escuela de Ganadería.		Fecha de reporte: 04-08-2025
Permiso Sanitario de Funcionamiento del Laboratorio San Martín #1794-2023 dado el 09/12/2023, vence el 09/12/2025, y #1887-2024 dado el 09/12/2024, vence el 11/11/2026.		
Metodología de análisis: de acuerdo al procedimiento AOAC y al procedimiento FAO.		
Métodos de análisis acreditados por el ECA identificados en este informe por medio de un asterisco (*). Para consulta de variables acreditadas ingresar a la página del ECA (http://www.eca.or.cr/acr_lab.php) en el link del Laboratorio San Martín.		
Código LSM	NB25-0048	
Punto de muestreo	Muestra: A1-28	
Ensayo	Resultado	
*Humedad (%)	94,00	
**Cenizas (%)	0,04	
**Grasa (%)	0,01	
**Proteína (%)	0,15	
**Carbohidratos totales (%)	5,79	
**Fibra soluble (%)	0,14	
**Fibra insoluble (%)	2,54	
Observaciones: Ejecución de actividades del Laboratorio: 05/06/2025 - 04/08/2025 Los resultados de los análisis de este informe, solamente se refieren a las muestras aquí descritas (**) Método de ensayo no acreditado		

Continuación Apéndice 4

Informe de Ensayos

Cliente: Universidad Técnica Nacional		Código del informe: U037-040825-09
		Fecha del muestreo: 15-03-2025
Muestreado por: El Interesado		Fecha de recepción: 05-06-2025
Dirección: Sede Atenas, Provincia: Alajuela, Cantón: Atenas Distrito: Balsa de Atenas, antigua Escuela de Ganadería.		Fecha de reporte: 04-08-2025
Permiso Sanitario de Funcionamiento del Laboratorio San Martín #1794-2023 dado el 09/12/2023, vence el 09/12/2025, y #1887-2024 dado el 09/12/2024, vence el 11/11/2026.		
Metodología de análisis: de acuerdo al procedimiento AOAC y al procedimiento FAO.		
Métodos de análisis acreditados por el ECA identificados en este informe por medio de un asterisco (*). Para consulta de variables acreditadas ingresar a la página del ECA (http://www.eca.or.cr/acr_lab.php) en el link del Laboratorio San Martín.		
Código LSM	NB25-0053	
Punto de muestreo	Muestra: A2-7	
Ensayo	Resultado	
*Humedad (%)	93,17	
**Cenizas (%)	0,05	
**Grasa (%)	0,04	
**Proteína (%)	0,16	
**Carbohidratos totales (%)	6,58	
**Fibra soluble (%)	0,12	
**Fibra insoluble (%)	2,26	
Observaciones: Ejecución de actividades del Laboratorio: 05/06/2025 - 04/08/2025 Los resultados de los análisis de este informe, solamente se refieren a las muestras aquí descritas (**) Método de ensayo no acreditado		

Informe de Ensayos

Cliente: Universidad Técnica Nacional		Código del informe: U037-040825-10
		Fecha del muestreo: 22-03-2025
Muestreado por: El Interesado		Fecha de recepción: 05-06-2025
Dirección: Sede Atenas, Provincia: Alajuela, Cantón: Atenas Distrito: Balsa de Atenas, antigua Escuela de Ganadería.		Fecha de reporte: 04-08-2025
Permiso Sanitario de Funcionamiento del Laboratorio San Martín #1794-2023 dado el 09/12/2023, vence el 09/12/2025, y #1887-2024 dado el 09/12/2024, vence el 11/11/2026.		
Metodología de análisis: de acuerdo al procedimiento AOAC y al procedimiento FAO.		
Métodos de análisis acreditados por el ECA identificados en este informe por medio de un asterisco (*). Para consulta de variables acreditadas ingresar a la página del ECA (http://www.eca.or.cr/acr_lab.php) en el link del Laboratorio San Martín.		
Código LSM	NB25-0054	
Punto de muestreo	Muestra: A2-14	
Ensayo	Resultado	
*Humedad (%)	93,65	
**Cenizas (%)	0,05	
**Grasa (%)	0,03	
**Proteína (%)	0,15	
**Carbohidratos totales (%)	6,12	
**Fibra soluble (%)	0,12	
**Fibra insoluble (%)	1,55	
Observaciones: Ejecución de actividades del Laboratorio: 05/06/2025 - 04/08/2025 Los resultados de los análisis de este informe, solamente se refieren a las muestras aquí descritas (**) Método de ensayo no acreditado		

Continuación Apéndice 4

Informe de Ensayos

Cliente: Universidad Técnica Nacional		Código del informe: U037-040825-11
		Fecha del muestreo: 29-03-2025
Muestreado por: El Interesado		Fecha de recepción: 05-06-2025
Dirección: Sede Atenas, Provincia: Alajuela, Cantón: Atenas Distrito: Balsa de Atenas, antigua Escuela de Ganadería.		Fecha de reporte: 04-08-2025
Permiso Sanitario de Funcionamiento del Laboratorio San Martín #1794-2023 dado el 09/12/2023, vence el 09/12/2025, y #1887-2024 dado el 09/12/2024, vence el 11/11/2026.		
Metodología de análisis: de acuerdo al procedimiento AOAC y al procedimiento FAO.		
Métodos de análisis acreditados por el ECA identificados en este informe por medio de un asterisco (*). Para consulta de variables acreditadas ingresar a la página del ECA (http://www.eca.or.cr/acr_lab.php) en el link del Laboratorio San Martín.		
Código LSM	NB25-0055	
Punto de muestreo	Muestra: A2-21	
Ensayo	Resultado	
*Humedad (%)	94,73	
**Cenizas (%)	0,05	
**Grasa (%)	0,06	
**Proteína (%)	0,18	
**Carbohidratos totales (%)	4,98	
**Fibra soluble (%)	0,11	
**Fibra insoluble (%)	1,71	
Observaciones: Ejecución de actividades del Laboratorio: 05/06/2025 - 04/08/2025 Los resultados de los análisis de este informe, solamente se refieren a las muestras aquí descritas (**) Método de ensayo no acreditado		

Informe de Ensayos

Cliente: Universidad Técnica Nacional		Código del informe: U037-040825-12
		Fecha del muestreo: 01-03-2025
Muestreado por: El Interesado		Fecha de recepción: 05-06-2025
Dirección: Sede Atenas, Provincia: Alajuela, Cantón: Atenas Distrito: Balsa de Atenas, antigua Escuela de Ganadería.		Fecha de reporte: 04-08-2025
Permiso Sanitario de Funcionamiento del Laboratorio San Martín #1794-2023 dado el 09/12/2023, vence el 09/12/2025, y #1887-2024 dado el 09/12/2024, vence el 11/11/2026.		
Metodología de análisis: de acuerdo al procedimiento AOAC y al procedimiento FAO.		
Métodos de análisis acreditados por el ECA identificados en este informe por medio de un asterisco (*). Para consulta de variables acreditadas ingresar a la página del ECA (http://www.eca.or.cr/acr_lab.php) en el link del Laboratorio San Martín.		
Código LSM	NB25-0056	
Punto de muestreo	Muestra: A2-28	
Ensayo	Resultado	
*Humedad (%)	94,49	
**Cenizas (%)	0,04	
**Grasa (%)	0,03	
**Proteína (%)	0,14	
**Carbohidratos totales (%)	5,30	
**Fibra soluble (%)	0,13	
**Fibra insoluble (%)	2,41	
Observaciones: Ejecución de actividades del Laboratorio: 05/06/2025 - 04/08/2025 Los resultados de los análisis de este informe, solamente se refieren a las muestras aquí descritas (**) Método de ensayo no acreditado		

Continuación Apéndice 4

Informe de Ensayos

Cliente: Universidad Técnica Nacional		Código del informe: U037-040825-17
		Fecha del muestreo: 05-04-2025
Muestreado por: El Interesado		Fecha de recepción: 05-06-2025
Dirección: Sede Atenas, Provincia: Alajuela, Cantón: Atenas Distrito: Balsa de Atenas, antigua Escuela de Ganadería.		Fecha de reporte: 04-08-2025
Permiso Sanitario de Funcionamiento del Laboratorio San Martín #1794-2023 dado el 09/12/2023, vence el 09/12/2025, y #1887-2024 dado el 09/12/2024, vence el 11/11/2026.		
Metodología de análisis: de acuerdo al procedimiento AOAC y al procedimiento FAO.		
Métodos de análisis acreditados por el ECA identificados en este informe por medio de un asterisco (*). Para consulta de variables acreditadas ingresar a la página del ECA (http://www.eca.or.cr/acr_lab.php) en el link del Laboratorio San Martín.		
Código LSM	NB25-0061	
Punto de muestreo	Muestra:A3-7	
Ensayo	Resultado	
*Humedad (%)	92,78	
**Cenizas (%)	0,05	
**Grasa (%)	0,02	
**Proteína (%)	0,17	
**Carbohidratos totales (%)	6,98	
**Fibra soluble (%)	0,12	
**Fibra insoluble (%)	2,32	
Observaciones: Ejecución de actividades del Laboratorio: 05/06/2025 - 04/08/2025 Los resultados de los análisis de este informe, solamente se refieren a las muestras aquí descritas (**) Método de ensayo no acreditado		

Informe de Ensayos

Cliente: Universidad Técnica Nacional		Código del informe: U037-040825-18
		Fecha del muestreo: 12-04-2025
Muestreado por: El Interesado		Fecha de recepción: 05-06-2025
Dirección: Sede Atenas, Provincia: Alajuela, Cantón: Atenas Distrito: Balsa de Atenas, antigua Escuela de Ganadería.		Fecha de reporte: 04-08-2025
Permiso Sanitario de Funcionamiento del Laboratorio San Martín #1794-2023 dado el 09/12/2023, vence el 09/12/2025, y #1887-2024 dado el 09/12/2024, vence el 11/11/2026.		
Metodología de análisis: de acuerdo al procedimiento AOAC y al procedimiento FAO.		
Métodos de análisis acreditados por el ECA identificados en este informe por medio de un asterisco (*). Para consulta de variables acreditadas ingresar a la página del ECA (http://www.eca.or.cr/acr_lab.php) en el link del Laboratorio San Martín.		
Código LSM	NB25-0062	
Punto de muestreo	Muestra: A3-14	
Ensayo	Resultado	
*Humedad (%)	93,83	
**Cenizas (%)	0,05	
**Grasa (%)	0,03	
**Proteína (%)	0,11	
**Carbohidratos totales (%)	5,98	
**Fibra soluble (%)	0,12	
**Fibra insoluble (%)	1,57	
Observaciones: Ejecución de actividades del Laboratorio: 05/06/2025 - 04/08/2025 Los resultados de los análisis de este informe, solamente se refieren a las muestras aquí descritas (**) Método de ensayo no acreditado		

Continuación Apéndice 4

Informe de Ensayos

Cliente: Universidad Técnica Nacional		Código del informe: U037-040825-19
		Fecha del muestreo: 19-04-2025
Muestreado por: El Interesado		Fecha de recepción: 05-06-2025
Dirección: Sede Atenas, Provincia: Alajuela, Cantón: Atenas Distrito: Balsa de Atenas, antigua Escuela de Ganadería.		Fecha de reporte: 04-08-2025
Permiso Sanitario de Funcionamiento del Laboratorio San Martín #1794-2023 dado el 09/12/2023, vence el 09/12/2025, y #1887-2024 dado el 09/12/2024, vence el 11/11/2026.		
Metodología de análisis: de acuerdo al procedimiento AOAC y al procedimiento FAO.		
Métodos de análisis acreditados por el ECA identificados en este informe por medio de un asterisco (*). Para consulta de variables acreditadas ingresar a la página del ECA (http://www.eca.or.cr/acr_lab.php) en el link del Laboratorio San Martín.		
Código LSM	NB25-0063	
Punto de muestreo	Muestra: A3-21	
Ensayo	Resultado	
*Humedad (%)	94,50	
**Cenizas (%)	0,05	
**Grasa (%)	0,02	
**Proteína (%)	0,12	
**Carbohidratos totales (%)	5,31	
**Fibra soluble (%)	0,13	
**Fibra insoluble (%)	1,77	
Observaciones: Ejecución de actividades del Laboratorio: 05/06/2025 - 04/08/2025 Los resultados de los análisis de este informe, solamente se refieren a las muestras aquí descritas (**) Método de ensayo no acreditado		

Informe de Ensayos

Cliente: Universidad Técnica Nacional		Código del informe: U037-040825-20
		Fecha del muestreo: 26-04-2025
Muestreado por: El Interesado		Fecha de recepción: 05-06-2025
Dirección: Sede Atenas, Provincia: Alajuela, Cantón: Atenas Distrito: Balsa de Atenas, antigua Escuela de Ganadería.		Fecha de reporte: 04-08-2025
Permiso Sanitario de Funcionamiento del Laboratorio San Martín #1794-2023 dado el 09/12/2023, vence el 09/12/2025, y #1887-2024 dado el 09/12/2024, vence el 11/11/2026.		
Metodología de análisis: de acuerdo al procedimiento AOAC y al procedimiento FAO.		
Métodos de análisis acreditados por el ECA identificados en este informe por medio de un asterisco (*). Para consulta de variables acreditadas ingresar a la página del ECA (http://www.eca.or.cr/acr_lab.php) en el link del Laboratorio San Martín.		
Código LSM	NB25-0064	
Punto de muestreo	Muestra: A3-28	
Ensayo	Resultado	
*Humedad (%)	94,94	
**Cenizas (%)	0,06	
**Grasa (%)	0,01	
**Proteína (%)	0,16	
**Carbohidratos totales (%)	4,84	
**Fibra soluble (%)	0,13	
**Fibra insoluble (%)	2,14	
Observaciones: Ejecución de actividades del Laboratorio: 05/06/2025 - 04/08/2025 Los resultados de los análisis de este informe, solamente se refieren a las muestras aquí descritas (**) Método de ensayo no acreditado		

Continuación Apéndice 4

Informe de Ensayos

Cliente: Universidad Técnica Nacional		Código del informe: U037-040825-05
		Fecha del muestreo: 15-03-2025
Muestreado por: El Interesado		Fecha de recepción: 05-06-2025
Dirección: Sede Atenas, Provincia: Alajuela, Cantón: Atenas Distrito: Balsa de Atenas, antigua Escuela de Ganadería.		Fecha de reporte: 04-08-2025
Permiso Sanitario de Funcionamiento del Laboratorio San Martín #1794-2023 dado el 09/12/2023, vence el 09/12/2025, y #1887-2024 dado el 09/12/2024, vence el 11/11/2026.		
Metodología de análisis: de acuerdo al procedimiento AOAC y al procedimiento FAO.		
Métodos de análisis acreditados por el ECA identificados en este informe por medio de un asterisco (*). Para consulta de variables acreditadas ingresar a la página del ECA (http://www.eca.or.cr/acr_lab.php) en el link del Laboratorio San Martín.		
Código LSM	NB25-0049	
Punto de muestreo	Muestra: B1-7	
Ensayo	Resultado	
*Humedad (%)	90,58	
**Cenizas (%)	0,01	
**Grasa (%)	0,01	
**Proteína (%)	0,18	
**Carbohidratos totales (%)	9,23	
**Fibra soluble (%)	0,19	
**Fibra insoluble (%)	2,05	
Observaciones: Ejecución de actividades del Laboratorio: 05/06/2025 - 04/08/2025 Los resultados de los análisis de este informe, solamente se refieren a las muestras aquí descritas (**) Método de ensayo no acreditado		

Informe de Ensayos

Cliente: Universidad Técnica Nacional		Código del informe: U037-040825-06
		Fecha del muestreo: 22-02-2025
Muestreado por: El Interesado		Fecha de recepción: 05-06-2025
Dirección: Sede Atenas, Provincia: Alajuela, Cantón: Atenas Distrito: Balsa de Atenas, antigua Escuela de Ganadería.		Fecha de reporte: 04-08-2025
Permiso Sanitario de Funcionamiento del Laboratorio San Martín #1794-2023 dado el 09/12/2023, vence el 09/12/2025, y #1887-2024 dado el 09/12/2024, vence el 11/11/2026.		
Metodología de análisis: de acuerdo al procedimiento AOAC y al procedimiento FAO.		
Métodos de análisis acreditados por el ECA identificados en este informe por medio de un asterisco (*). Para consulta de variables acreditadas ingresar a la página del ECA (http://www.eca.or.cr/acr_lab.php) en el link del Laboratorio San Martín.		
Código LSM	NB25-0050	
Punto de muestreo	Muestra: B1-14	
Ensayo	Resultado	
*Humedad (%)	91,01	
**Cenizas (%)	0,03	
**Grasa (%)	0,01	
**Proteína (%)	0,20	
**Carbohidratos totales (%)	8,75	
**Fibra soluble (%)	0,15	
**Fibra insoluble (%)	1,76	
Observaciones: Ejecución de actividades del Laboratorio: 05/06/2025 - 04/08/2025 Los resultados de los análisis de este informe, solamente se refieren a las muestras aquí descritas (**) Método de ensayo no acreditado		

Continuación Apéndice 4

Informe de Ensayos

Cliente: Universidad Técnica Nacional		Código del informe: U037-040825-07
		Fecha del muestreo: 01-03-2025
Muestreado por: El Interesado		Fecha de recepción: 05-06-2025
Dirección: Sede Atenas, Provincia: Alajuela, Cantón: Atenas Distrito: Balsa de Atenas, antigua Escuela de Ganadería.		Fecha de reporte: 04-08-2025
Permiso Sanitario de Funcionamiento del Laboratorio San Martín #1794-2023 dado el 09/12/2023, vence el 09/12/2025, y #1887-2024 dado el 09/12/2024, vence el 11/11/2026.		
Metodología de análisis: de acuerdo al procedimiento AOAC y al procedimiento FAO.		
Métodos de análisis acreditados por el ECA identificados en este informe por medio de un asterisco (*). Para consulta de variables acreditadas ingresar a la página del ECA (http://www.eca.or.cr/acr_lab.php) en el link del Laboratorio San Martín.		
Código LSM	NB25-0051	
Punto de muestreo	Muestra: B1-21	
Ensayo	Resultado	
*Humedad (%)	90,66	
**Cenizas (%)	0,04	
**Grasa (%)	0,01	
**Proteína (%)	0,17	
**Carbohidratos totales (%)	9,13	
**Fibra soluble (%)	0,19	
**Fibra insoluble (%)	1,89	
Observaciones: Ejecución de actividades del Laboratorio: 05/06/2025 - 04/08/2025 Los resultados de los análisis de este informe, solamente se refieren a las muestras aquí descritas (**) Método de ensayo no acreditado		

Informe de Ensayos

Cliente: Universidad Técnica Nacional		Código del informe: U037-040825-08
		Fecha del muestreo: 08-03-2025
Muestreado por: El Interesado		Fecha de recepción: 05-06-2025
Dirección: Sede Atenas, Provincia: Alajuela, Cantón: Atenas Distrito: Balsa de Atenas, antigua Escuela de Ganadería.		Fecha de reporte: 04-08-2025
Permiso Sanitario de Funcionamiento del Laboratorio San Martín #1794-2023 dado el 09/12/2023, vence el 09/12/2025, y #1887-2024 dado el 09/12/2024, vence el 11/11/2026.		
Metodología de análisis: de acuerdo al procedimiento AOAC y al procedimiento FAO.		
Métodos de análisis acreditados por el ECA identificados en este informe por medio de un asterisco (*). Para consulta de variables acreditadas ingresar a la página del ECA (http://www.eca.or.cr/acr_lab.php) en el link del Laboratorio San Martín.		
Código LSM	NB25-0052	
Punto de muestreo	Muestra: B1-28	
Ensayo	Resultado	
*Humedad (%)	92,08	
**Cenizas (%)	0,03	
**Grasa (%)	0,01	
**Proteína (%)	0,15	
**Carbohidratos totales (%)	7,73	
**Fibra soluble (%)	0,16	
**Fibra insoluble (%)	1,77	
Observaciones: Ejecución de actividades del Laboratorio: 05/06/2025 - 04/08/2025 Los resultados de los análisis de este informe, solamente se refieren a las muestras aquí descritas (**) Método de ensayo no acreditado		

Continuación Apéndice 4

Informe de Ensayos

Cliente: Universidad Técnica Nacional		Código del informe: U037-040825-13
		Fecha del muestreo: 05-04-2025
Muestreado por: El Interesado		Fecha de recepción: 05-06-2025
Dirección: Sede Atenas, Provincia: Alajuela, Cantón: Atenas Distrito: Balsa de Atenas, antigua Escuela de Ganadería.		Fecha de reporte: 04-08-2025
Permiso Sanitario de Funcionamiento del Laboratorio San Martín #1794-2023 dado el 09/12/2023, vence el 09/12/2025, y #1887-2024 dado el 09/12/2024, vence el 11/11/2026.		
Metodología de análisis: de acuerdo al procedimiento AOAC y al procedimiento FAO.		
Métodos de análisis acreditados por el ECA identificados en este informe por medio de un asterisco (*). Para consulta de variables acreditadas ingresar a la página del ECA (http://www.eca.or.cr/acr_lab.php) en el link del Laboratorio San Martín.		
Código LSM	NB25-0057	
Punto de muestreo	Muestra: B2-7	
Ensayo	Resultado	
*Humedad (%)	93,36	
**Cenizas (%)	0,02	
**Grasa (%)	0,01	
**Proteína (%)	0,16	
**Carbohidratos totales (%)	6,44	
**Fibra soluble (%)	0,14	
**Fibra insoluble (%)	1,44	
Observaciones: Ejecución de actividades del Laboratorio: 05/06/2025 - 04/08/2025 Los resultados de los análisis de este informe, solamente se refieren a las muestras aquí descritas (**) Método de ensayo no acreditado		

Informe de Ensayos

Cliente: Universidad Técnica Nacional		Código del informe: U037-040825-14
		Fecha del muestreo: 22-03-2025
Muestreado por: El Interesado		Fecha de recepción: 05-06-2025
Dirección: Sede Atenas, Provincia: Alajuela, Cantón: Atenas Distrito: Balsa de Atenas, antigua Escuela de Ganadería.		Fecha de reporte: 04-08-2025
Permiso Sanitario de Funcionamiento del Laboratorio San Martín #1794-2023 dado el 09/12/2023, vence el 09/12/2025, y #1887-2024 dado el 09/12/2024, vence el 11/11/2026.		
Metodología de análisis: de acuerdo al procedimiento AOAC y al procedimiento FAO.		
Métodos de análisis acreditados por el ECA identificados en este informe por medio de un asterisco (*). Para consulta de variables acreditadas ingresar a la página del ECA (http://www.eca.or.cr/acr_lab.php) en el link del Laboratorio San Martín.		
Código LSM	NB25-0058	
Punto de muestreo	Muestra: B2-14	
Ensayo	Resultado	
*Humedad (%)	91,19	
**Cenizas (%)	0,05	
**Grasa (%)	0,01	
**Proteína (%)	0,18	
**Carbohidratos totales (%)	8,58	
**Fibra soluble (%)	0,15	
**Fibra insoluble (%)	1,75	
Observaciones: Ejecución de actividades del Laboratorio: 05/06/2025 - 04/08/2025 Los resultados de los análisis de este informe, solamente se refieren a las muestras aquí descritas (**) Método de ensayo no acreditado		

Continuación Apéndice 4

Informe de Ensayos

Cliente: Universidad Técnica Nacional		Código del informe: U037-040825-15
		Fecha del muestreo: 29-03-2025
Muestreado por: El Interesado		Fecha de recepción: 05-06-2025
Dirección: Sede Atenas, Provincia: Alajuela, Cantón: Atenas Distrito: Balsa de Atenas, antigua Escuela de Ganadería.		Fecha de reporte: 04-08-2025
Permiso Sanitario de Funcionamiento del Laboratorio San Martín #1794-2023 dado el 09/12/2023, vence el 09/12/2025, y #1887-2024 dado el 09/12/2024, vence el 11/11/2026.		
Metodología de análisis: de acuerdo al procedimiento AOAC y al procedimiento FAO.		
Métodos de análisis acreditados por el ECA identificados en este informe por medio de un asterisco (*). Para consulta de variables acreditadas ingresar a la página del ECA (http://www.eca.or.cr/acr_lab.php) en el link del Laboratorio San Martín.		
Código LSM	NB25-0059	
Punto de muestreo	Muestra: B2-21	
Ensayo	Resultado	
*Humedad (%)	92,73	
**Cenizas (%)	0,06	
**Grasa (%)	0,01	
**Proteína (%)	0,20	
**Carbohidratos totales (%)	7,01	
**Fibra soluble (%)	0,15	
**Fibra insoluble (%)	1,43	
Observaciones: Ejecución de actividades del Laboratorio: 05/06/2025 - 04/08/2025 Los resultados de los análisis de este informe, solamente se refieren a las muestras aquí descritas (**) Método de ensayo no acreditado		

Informe de Ensayos

Cliente: Universidad Técnica Nacional		Código del informe: U037-040825-16
		Fecha del muestreo: 05-04-2025
Muestreado por: El Interesado		Fecha de recepción: 05-06-2025
Dirección: Sede Atenas, Provincia: Alajuela, Cantón: Atenas Distrito: Balsa de Atenas, antigua Escuela de Ganadería.		Fecha de reporte: 04-08-2025
Permiso Sanitario de Funcionamiento del Laboratorio San Martín #1794-2023 dado el 09/12/2023, vence el 09/12/2025, y #1887-2024 dado el 09/12/2024, vence el 11/11/2026.		
Metodología de análisis: de acuerdo al procedimiento AOAC y al procedimiento FAO.		
Métodos de análisis acreditados por el ECA identificados en este informe por medio de un asterisco (*). Para consulta de variables acreditadas ingresar a la página del ECA (http://www.eca.or.cr/acr_lab.php) en el link del Laboratorio San Martín.		
Código LSM	NB25-0060	
Punto de muestreo	Muestra: B2-28	
Ensayo	Resultado	
*Humedad (%)	91,56	
**Cenizas (%)	0,04	
**Grasa (%)	0,01	
**Proteína (%)	0,16	
**Carbohidratos totales (%)	8,23	
**Fibra soluble (%)	0,17	
**Fibra insoluble (%)	1,85	
Observaciones: Ejecución de actividades del Laboratorio: 05/06/2025 - 04/08/2025 Los resultados de los análisis de este informe, solamente se refieren a las muestras aquí descritas (**) Método de ensayo no acreditado		

Continuación Apéndice 4

Informe de Ensayos

Cliente: Universidad Técnica Nacional		Código del informe: U037-040825-21
		Fecha del muestreo: 05-04-2025
Muestreado por: El Interesado		Fecha de recepción: 05-06-2025
Dirección: Sede Atenas, Provincia: Alajuela, Cantón: Atenas Distrito: Balsa de Atenas, antigua Escuela de Ganadería.		Fecha de reporte: 04-08-2025
Permiso Sanitario de Funcionamiento del Laboratorio San Martín #1794-2023 dado el 09/12/2023, vence el 09/12/2025, y #1887-2024 dado el 09/12/2024, vence el 11/11/2026.		
Metodología de análisis: de acuerdo al procedimiento AOAC y al procedimiento FAO.		
Métodos de análisis acreditados por el ECA identificados en este informe por medio de un asterisco (*).		
Para consulta de variables acreditadas ingresar a la página del ECA (http://www.eca.or.cr/acr_lab.php) en el link del Laboratorio San Martín.		
Código LSM	NB25-0065	
Punto de muestreo	Muestra: B3-7	
Ensayo	Resultado	
*Humedad (%)	89,90	
**Cenizas (%)	0,04	
**Grasa (%)	0,01	
**Proteína (%)	0,18	
**Carbohidratos totales (%)	9,87	
**Fibra soluble (%)	0,20	
**Fibra insoluble (%)	2,21	
Observaciones:		
Ejecución de actividades del Laboratorio: 05/06/2025 - 04/08/2025		
Los resultados de los análisis de este informe, solamente se refieren a las muestras aquí descritas		
(**) Método de ensayo no acreditado		

Informe de Ensayos

Cliente: Universidad Técnica Nacional		Código del informe: U037-040825-22
		Fecha del muestreo: 12-04-2025
Muestreado por: El Interesado		Fecha de recepción: 05-06-2025
Dirección: Sede Atenas, Provincia: Alajuela, Cantón: Atenas Distrito: Balsa de Atenas, antigua Escuela de Ganadería.		Fecha de reporte: 04-08-2025
Permiso Sanitario de Funcionamiento del Laboratorio San Martín #1794-2023 dado el 09/12/2023, vence el 09/12/2025, y #1887-2024 dado el 09/12/2024, vence el 11/11/2026.		
Metodología de análisis: de acuerdo al procedimiento AOAC y al procedimiento FAO.		
Métodos de análisis acreditados por el ECA identificados en este informe por medio de un asterisco (*).		
Para consulta de variables acreditadas ingresar a la página del ECA (http://www.eca.or.cr/acr_lab.php) en el link del Laboratorio San Martín.		
Código LSM	NB25-0066	
Punto de muestreo	Muestra: B3-14	
Ensayo	Resultado	
*Humedad (%)	90,05	
**Cenizas (%)	0,05	
**Grasa (%)	0,01	
**Proteína (%)	0,16	
**Carbohidratos totales (%)	9,74	
**Fibra soluble (%)	0,16	
**Fibra insoluble (%)	1,97	
Observaciones:		
Ejecución de actividades del Laboratorio: 05/06/2025 - 04/08/2025		
Los resultados de los análisis de este informe, solamente se refieren a las muestras aquí descritas		
(**) Método de ensayo no acreditado		

Continuación Apéndice 4

Informe de Ensayos

Cliente: Universidad Técnica Nacional		Código del informe: U037-040825-23
		Fecha del muestreo: 19-04-2025
Muestreado por: El Interesado		Fecha de recepción: 05-06-2025
Dirección: Sede Atenas, Provincia: Alajuela, Cantón: Atenas Distrito: Balsa de Atenas, antigua Escuela de Ganadería.		Fecha de reporte: 04-08-2025
Permiso Sanitario de Funcionamiento del Laboratorio San Martín #1794-2023 dado el 09/12/2023, vence el 09/12/2025, y #1887-2024 dado el 09/12/2024, vence el 11/11/2026.		
Metodología de análisis: de acuerdo al procedimiento AOAC y al procedimiento FAO.		
Métodos de análisis acreditados por el ECA identificados en este informe por medio de un asterisco (*). Para consulta de variables acreditadas ingresar a la página del ECA (http://www.eca.or.cr/acr_lab.php) en el link del Laboratorio San Martín.		
Código LSM	NB25-0067	
Punto de muestreo	Muestra: B3-21	
Ensayo	Resultado	
*Humedad (%)	91,64	
**Cenizas (%)	0,04	
**Grasa (%)	0,02	
**Proteína (%)	0,15	
**Carbohidratos totales (%)	8,16	
**Fibra soluble (%)	0,17	
**Fibra insoluble (%)	1,68	
Observaciones: Ejecución de actividades del Laboratorio: 05/06/2025 - 04/08/2025 Los resultados de los análisis de este informe, solamente se refieren a las muestras aquí descritas (**) Método de ensayo no acreditado		

Informe de Ensayos

Cliente: Universidad Técnica Nacional		Código del informe: U037-040825-24
		Fecha del muestreo: 26-04-2025
Muestreado por: El Interesado		Fecha de recepción: 05-06-2025
Dirección: Sede Atenas, Provincia: Alajuela, Cantón: Atenas Distrito: Balsa de Atenas, antigua Escuela de Ganadería.		Fecha de reporte: 04-08-2025
Permiso Sanitario de Funcionamiento del Laboratorio San Martín #1794-2023 dado el 09/12/2023, vence el 09/12/2025, y #1887-2024 dado el 09/12/2024, vence el 11/11/2026.		
Metodología de análisis: de acuerdo al procedimiento AOAC y al procedimiento FAO.		
Métodos de análisis acreditados por el ECA identificados en este informe por medio de un asterisco (*). Para consulta de variables acreditadas ingresar a la página del ECA (http://www.eca.or.cr/acr_lab.php) en el link del Laboratorio San Martín.		
Código LSM	NB25-0068	
Punto de muestreo	Muestra: B3-28	
Ensayo	Resultado	
*Humedad (%)	91,49	
**Cenizas (%)	0,05	
**Grasa (%)	0,01	
**Proteína (%)	0,16	
**Carbohidratos totales (%)	8,28	
**Fibra soluble (%)	0,17	
**Fibra insoluble (%)	1,88	
Observaciones: Ejecución de actividades del Laboratorio: 05/06/2025 - 04/08/2025 Los resultados de los análisis de este informe, solamente se refieren a las muestras aquí descritas (**) Método de ensayo no acreditado		

Continuación Apéndice 4

LEONARDO
ROJAS SANCHEZ
(FIRMA)

Firmado digitalmente
por LEONARDO ROJAS
SANCHEZ (FIRMA)
Fecha: 2025.08.05
14:51:26 -06'00'

Dr. Leonardo Rojas Sánchez
Químico N.I. 2523

Queda prohibida la reproducción parcial de este informe sin la autorización escrita del **Laboratorio San Martín**.

Control de los registros del sistema:

Solicitud de cambio N°: SCS – 2018 – 001	Elaborado por: Gerente Químico	Aprobado por: Gerente Químico	Fecha de aprobación 01 Noviembre 2018	Rige a partir de 02 Noviembre 2018	Versión 14
---	-----------------------------------	----------------------------------	--	---------------------------------------	---------------



Apéndice 5

Evidencia del análisis estadístico

A continuación, se presenta el resumen del análisis estadístico de los resultados obtenidos, utilizando el *software* R y la interfaz RStudio.

5.1 Análisis estadístico de los parámetros fisicoquímicos que describen el avance de la fermentación

Figura 21

Análisis de varianza de dos vías para el comportamiento del pH del medio de cultivo

```
> modelo_anova_ph <- aov(pH ~ tiempo_fermentación * concentración_sustrato, data = datos)
> summary(modelo_anova_ph)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
tiempo_fermentación	4	20.581	5.145	74.750	<2e-16 ***
concentración_sustrato	1	0.028	0.028	0.413	0.522
tiempo_fermentación:concentración_sustrato	4	0.019	0.005	0.070	0.991
Residuals	80	5.507	0.069		

```
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Figura 22

Prueba post-hoc de Tukey para el comportamiento del pH del medio de cultivo

```
> tukey_resultado_ph_tiempo <- TukeyHSD(modelo_anova_ph, "tiempo_fermentación")
> print(tukey_resultado_ph_tiempo)
```

Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = pH ~ tiempo_fermentación * concentración_sustrato, data = datos)

\$tiempo_fermentación	diff	lwr	upr	p adj
7-0	-0.8722222	-1.1163028	-0.628141658	0.0000000
14-0	-1.0111111	-1.2551917	-0.767030547	0.0000000
21-0	-1.1555556	-1.3996361	-0.911474992	0.0000000
28-0	-1.4055556	-1.6496361	-1.161474992	0.0000000
14-7	-0.1388889	-0.3829695	0.105191675	0.5093054
21-7	-0.2833333	-0.5274139	-0.039252770	0.0146226
28-7	-0.5333333	-0.7774139	-0.289252770	0.0000004
21-14	-0.1444444	-0.3885250	0.099636119	0.4694775
28-14	-0.3944444	-0.6385250	-0.150363881	0.0002087
28-21	-0.2500000	-0.4940806	-0.005919436	0.0419969

Figura 23

Análisis de varianza de dos vías para los sólidos solubles del medio de cultivo

```
> summary(modelo_anova_solidos)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
tiempo_fermentación	1	25.09	25.09	209.767	<2e-16	***
concentración_sustrato	1	182.04	182.04	1522.117	<2e-16	***
tiempo_fermentación:concentración_sustrato	1	0.21	0.21	1.786	0.185	
Residuals	86	10.29	0.12			

 Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Figura 24

Prueba post-hoc de Tukey para los sólidos solubles del medio de cultivo

```
> tukey_resultado_solidos_tiempo <- TukeyHSD(modelo_anova_solidos, "tiempo_fermentación")
> print(tukey_resultado_solidos_tiempo)
```

Tukey multiple comparisons of means
 95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Solidos_solubles ~ tiempo_fermentación * concentración_sustrato, data = Datos_Estadistica)

\$tiempo_fermentación	diff	lwr	upr	p adj
7-0	-0.3000000	-0.6128094	0.01280937	0.0664940
14-0	-0.4444444	-0.7572538	-0.13163508	0.0014559
21-0	-1.0444444	-1.3572538	-0.73163508	0.0000000
28-0	-1.4944444	-1.8072538	-1.18163508	0.0000000
14-7	-0.1444444	-0.4572538	0.16836492	0.6988242
21-7	-0.7444444	-1.0572538	-0.43163508	0.0000000
28-7	-1.1944444	-1.5072538	-0.88163508	0.0000000
21-14	-0.6000000	-0.9128094	-0.28719063	0.0000079
28-14	-1.0500000	-1.3628094	-0.73719063	0.0000000
28-21	-0.4500000	-0.7628094	-0.13719063	0.0012283

Figura 25

Descripción estadística del efecto de la concentración de azúcar en el contenido de sólidos solubles

```
> Datos_Estadistica %>%
+   group_by(concentración_sustrato) %>%
+   summarise(media_solidos = mean(Solidos_solubles, na.rm = TRUE),
+             desviacion_estandar_solidos = sd(Solidos_solubles, na.rm = TRUE)) %>%
+   print()
# A tibble: 2 × 3
  concentración_sustrato media_solidos desviacion_estandar_solidos
  <fct>                  <dbl>                  <dbl>
1 7                      5.72                   0.691
2 10.5                  8.56                   0.576
```

Figura 26

Análisis de varianza de dos vías para la temperatura del medio de cultivo

```
> summary(modelo_anova_temperatura)

                Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
tiempo_fermentación      4  397.9   99.47  39.486 <2e-16 ***
concentración_sustrato    1    0.0    0.01   0.004  0.952
tiempo_fermentación:concentración_sustrato  4    1.3    0.33   0.131  0.971
Residuals                80  201.5    2.52
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Figura 27

Prueba post-hoc de Tukey para la temperatura del medio de cultivo

```
> print(tukey_resultado_temperatura_tiempo)
Tukey multiple comparisons of means
 95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Temperatura ~ tiempo_fermentación * concentración_sustrato, data = Datos_Estadistica)

$tiempo_fermentación
      diff      lwr      upr    p adj
7-0    -4.9611111 -6.4376927 -3.484529 0.0000000
14-0   -6.1277778 -7.6043594 -4.651196 0.0000000
21-0   -4.6555556 -6.1321372 -3.178974 0.0000000
28-0   -4.4833333 -5.9599150 -3.006752 0.0000000
14-7   -1.1666667 -2.6432483  0.309915 0.1884129
21-7    0.3055556 -1.1710261  1.782137 0.9780041
28-7    0.4777778 -0.9988038  1.954359 0.8949128
21-14  1.4722222 -0.0043594  2.948804 0.0510587
28-14  1.6444444  0.1678628  3.121026 0.0213313
28-21  0.1722222 -1.3043594  1.648804 0.9975236
```

Figura 28

Análisis de varianza de dos vías para la tasa de crecimiento del SCOBY

```
> summary(modelo_anova)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
tiempo_fermentación	4	851261	212815	66.541	< 2e-16 ***
concentración_sustrato	1	48534	48534	15.175	0.000202 ***
tiempo_fermentación:concentración_sustrato	4	30372	7593	2.374	0.059025 .
Residuals	80	255860	3198		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Figura 29

Prueba post-hoc de Tukey para la tasa de crecimiento del SCOBY.

```
> tukey_resultado_tiempo <- TukeyHSD(modelo_anova, "tiempo_fermentación")
> print(tukey_resultado_tiempo)
```

Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = tasa_crecimiento ~ tiempo_fermentación * concentración_sustrato, data = datos)

```
$tiempo_fermentación
      diff      lwr      upr      p adj
7-0    89.77778  37.16519 142.39036 0.0000808
14-0   174.77778 122.16519 227.39036 0.0000000
21-0   258.88889 206.27631 311.50147 0.0000000
28-0   243.55556 190.94297 296.16814 0.0000000
14-7    85.00000  32.38742 137.61258 0.0002096
21-7   169.11111 116.49853 221.72369 0.0000000
28-7   153.77778 101.16519 206.39036 0.0000000
21-14   84.11111  31.49853 136.72369 0.0002495
28-14   68.77778  16.16519 121.39036 0.0041661
28-21  -15.33333 -67.94592  37.27925 0.9257868
```

Figura 30

Descripción estadística del efecto de la concentración de azúcar en la tasa de crecimiento del SCOBY

```
> datos %>%
+ group_by(concentración_sustrato) %>%
+ summarise(media_crecimiento = mean(tasa_crecimiento, na.rm = TRUE),
+ desviacion_estandar = sd(tasa_crecimiento, na.rm = TRUE))
# A tibble: 2 × 3
  concentración_sustrato media_crecimiento desviacion_estandar
  <fct>                  <dbl>                <dbl>
1 7                      177.                 129.
2 10.5                  130.                 95.8
```

5.2 Análisis estadístico de los resultados de la composición química proximal del SCOBY

Figura 31

Análisis de varianza de dos vías para la humedad del SCOBY

```
> # 1. Modelo ANOVA
> modelo_anova_humedad <- aov(Humedad ~ tiempo_fermentacion * concentracion_sustrato, data = datos_proximal)
> cat("--- Resumen del ANOVA ---\n")
--- Resumen del ANOVA ---
> summary(modelo_anova_humedad)
              Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
tiempo_fermentacion      3  4.29   1.43   1.941  0.164
concentracion_sustrato    1 36.43  36.43 49.460 2.83e-06 ***
tiempo_fermentacion:concentracion_sustrato  3  1.13   0.38   0.512  0.680
Residuals                16 11.79   0.74
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Figura 32

Análisis de varianza de dos vías para las cenizas (base seca) del SCOBY

```

--- ANÁLISIS PARA: % ceniza bs ---
>
> # 1. Modelo ANOVA
> modelo_anova_ceniza_bs <- aov(Ceniza_bs ~ tiempo_fermentacion * concentracion_sustrato, data = datos_proximal)
> cat("--- Resumen del ANOVA ---\n")
--- Resumen del ANOVA ---
> summary(modelo_anova_ceniza_bs)
              Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
tiempo_fermentacion      3  0.1528   0.0509   1.858   0.177
concentracion_sustrato    1  0.7704   0.7704  28.096 7.18e-05 ***
tiempo_fermentacion:concentracion_sustrato  3  0.0349   0.0116   0.425   0.738
Residuals                 16  0.4387   0.0274
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

Figura 33

Análisis de varianza de dos vías para la grasa total (base seca) del SCOBY

```

> # 1. Modelo ANOVA
> modelo_anova_grasa_bs <- aov(Grasa_bs ~ tiempo_fermentacion * concentracion_sustrato, data = datos_proximal)
> cat("--- Resumen del ANOVA ---\n")
--- Resumen del ANOVA ---
> summary(modelo_anova_grasa_bs)
              Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
tiempo_fermentacion      3  0.0452   0.0151   0.28 0.83894
concentracion_sustrato    1  0.5460   0.5460  10.14 0.00576 **
tiempo_fermentacion:concentracion_sustrato  3  0.0678   0.0226   0.42 0.74144
Residuals                 16  0.8612   0.0538
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

Figura 34

Análisis de varianza de dos vías para la proteína total (base seca) del SCOBY

```

> cat("\n--- ANÁLISIS PARA: % proteína base seca ---\n")
--- ANÁLISIS PARA: % proteína base seca ---
> # 1. Modelo ANOVA
> modelo_anova_proteina_bs <- aov(Proteina_bs ~ tiempo_fermentacion * concentracion_sustrato, data = datos_proximal)
> cat("--- Resumen del ANOVA ---\n")
--- Resumen del ANOVA ---
> summary(modelo_anova_proteina_bs)
              Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
tiempo_fermentacion      3  0.2650   0.0883   0.509 0.6817
concentracion_sustrato    1  1.3053   1.3053   7.521 0.0145 *
tiempo_fermentacion:concentracion_sustrato  3  0.3408   0.1136   0.655 0.5917
Residuals                 16  2.7769   0.1736
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

Figura 35

Análisis de medias para la proteína total (base seca) del SCOBY

```
> datos_proximal %>%
+   group_by(concentracion_sustrato) %>%
+   summarise(media_proteina_bs = mean(Proteina_bs, na.rm = TRUE),
+             desviacion_estandar_proteina_bs = sd(Proteina_bs, na.rm = TRUE)) %>%
+   print()
# A tibble: 2 × 3
  concentracion_sustrato media_proteina_bs desviacion_estandar_proteina_bs
  <fct>                  <dbl>                  <dbl>
1 10.5                   2.00                   0.317
2 7                      2.47                   0.455
```

Figura 36

Análisis de correlación de Pearson para la interacción entre la proteína total (base seca) y la tasa de crecimiento del SCOBY

```
--- Correlación entre % Proteína Base Seca y Tasa de Crecimiento ---
> correlacion_proteina_tasa <- cor(relacion_proteina_tasa$Proteina_bs, relacion_proteina_tasa$tasa_crecimiento, use = "pairwise.complete.obs")
> print(correlacion_proteina_tasa)
[1] 0.8360936
```

Figura 37

Análisis de varianza de dos vías para los carbohidratos totales (base seca) del SCOBY

```
> # 1. Modelo ANOVA
> modelo_anova_CHO_bs <- aov(CHO_bs ~ tiempo_fermentacion * concentracion_sustrato, data = datos_proximal)
> cat("--- Resumen del ANOVA ---\n")
--- Resumen del ANOVA ---
> summary(modelo_anova_CHO_bs)
              Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
tiempo_fermentacion      3  0.983   0.328   0.813 0.505264
concentracion_sustrato    1  7.161   7.161  17.771 0.000657 ***
tiempo_fermentacion:concentracion_sustrato  3  0.270   0.090   0.223 0.878834
Residuals                16  6.448   0.403
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Figura 38

Análisis de varianza de dos vías para la fibra dietética soluble (base seca) del SCOBY

```
> summary(modelo_anova_fs)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
tiempo_fermentacion	3	0.7638	0.25459	40.74	1.02e-07	***
concentracion_sustrato_code	1	0.0931	0.09312	14.90	0.00138	**
tiempo_fermentacion:concentracion_sustrato_code	3	0.5109	0.17029	27.25	1.59e-06	***
Residuals	16	0.1000	0.00625			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Figura 39

Prueba post-hoc de Tukey para la fibra dietética soluble (base seca) del SCOBY

```
> TukeyHSD(modelo_anova_fs, "tiempo_fermentacion:concentracion_sustrato_code")
Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = fibra_soluble ~ tiempo_fermentacion * concentracion_sustrato_code, data = datos_fibras)

$`tiempo_fermentacion:concentracion_sustrato_code`
      diff      lwr      upr      p adj
21:7%-14:7%  0.29234485  0.06889288  0.51579682  0.0063741
28:7%-14:7%  0.49076810  0.26731612  0.71422007  0.0000235
7:7%-14:7%   -0.25490059 -0.47835256 -0.03144861  0.0197261
14:10.5%-14:7% -0.27012473 -0.49357670 -0.04667276  0.0124747
21:10.5%-14:7%  0.11382738 -0.10962459  0.33727935  0.6502836
28:10.5%-14:7%  0.08084140 -0.14261057  0.30429337  0.9033573
7:10.5%-14:7%  0.10535708 -0.11809489  0.32880905  0.7261138
28:7%-21:7%   0.19842324 -0.02502873  0.42187522  0.1015206
7:7%-21:7%   -0.54724544 -0.77069741 -0.32379347  0.0000058
14:10.5%-21:7% -0.56246958 -0.78592156 -0.33901761  0.0000041
21:10.5%-21:7% -0.17851747 -0.40196944  0.04493450  0.1722568
28:10.5%-21:7% -0.21150345 -0.43495542  0.01194852  0.0704533
7:10.5%-21:7% -0.18698777 -0.41043974  0.03646420  0.1381909
7:7%-28:7%   -0.74566868 -0.96912065 -0.52221671  0.0000001
14:10.5%-28:7% -0.76089283 -0.98434480 -0.53744086  0.0000001
21:10.5%-28:7% -0.37694071 -0.60039269 -0.15348874  0.0005194
28:10.5%-28:7% -0.40992669 -0.63337867 -0.18647472  0.0002040
7:10.5%-28:7% -0.38541101 -0.60886299 -0.16195904  0.0004074
14:10.5%-7:7%  -0.01522415 -0.23867612  0.20822782  0.9999968
21:10.5%-7:7%  0.36872797  0.14527600  0.59217994  0.0006584
28:10.5%-7:7%  0.33574199  0.11229002  0.55919396  0.0017336
7:10.5%-7:7%  0.36025767  0.13680570  0.58370964  0.0008423
21:10.5%-14:10.5%  0.38395211  0.16050014  0.60740409  0.0004248
28:10.5%-14:10.5%  0.35096613  0.12751416  0.57441811  0.0011056
7:10.5%-14:10.5%  0.37548181  0.15202984  0.59893379  0.0005417
28:10.5%-21:10.5% -0.03298598 -0.25643795  0.19046599  0.9994149
7:10.5%-21:10.5% -0.00847030 -0.23192227  0.21498167  0.9999999
7:10.5%-28:10.5%  0.02451568 -0.19893629  0.24796765  0.9999175
```

Figura 40

Análisis de varianza de dos vías para la fibra dietética insoluble (base seca) del SCOBY

```
> summary(modelo_anova_fi)

```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
tiempo_fermentacion	3	305.5	101.8	508.1	4.51e-16	***
concentracion_sustrato_code	1	915.1	915.1	4565.6	< 2e-16	***
tiempo_fermentacion:concentracion_sustrato_code	3	178.7	59.6	297.1	3.10e-14	***
Residuals	16	3.2	0.2			

```
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Figura 41

Prueba post-hoc de Tukey para la fibra dietética insoluble (base seca) del SCOPY

```

> TukeyHSD(modelo_anova_fi, "tiempo_fermentacion:concentracion_sustrato_code")
Tukey multiple comparisons of means
 95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = fibra_insoluble ~ tiempo_fermentacion * concentracion_sustrato_code, dat

$`tiempo_fermentacion:concentracion_sustrato_code`
      diff      lwr      upr      p adj
21:7%-14:7%    7.2347381  5.9691546  8.5003215 0.0000000
28:7%-14:7%   17.5983470 16.3327635 18.8639304 0.0000000
7:7%-14:7%    7.4511887  6.1856053  8.7167722 0.0000000
14:10.5%-14:7% -5.4431151 -6.7086985 -4.1775317 0.0000000
21:10.5%-14:7% -5.1894412 -6.4550246 -3.9238578 0.0000000
28:10.5%-14:7% -3.0699555 -4.3355389 -1.8043721 0.0000066
7:10.5%-14:7% -3.4130988 -4.6786822 -2.1475154 0.0000016
28:7%-21:7%   10.3636089  9.0980255 11.6291923 0.0000000
7:7%-21:7%    0.2164507 -1.0491327  1.4820341 0.9984993
14:10.5%-21:7% -12.6778532 -13.9434366 -11.4122697 0.0000000
21:10.5%-21:7% -12.4241792 -13.6897627 -11.1585958 0.0000000
28:10.5%-21:7% -10.3046936 -11.5702770 -9.0391102 0.0000000
7:10.5%-21:7% -10.6478369 -11.9134203 -9.3822534 0.0000000
7:7%-28:7%   -10.1471582 -11.4127416 -8.8815748 0.0000000
14:10.5%-28:7% -23.0414621 -24.3070455 -21.7758786 0.0000000
21:10.5%-28:7% -22.7877881 -24.0533716 -21.5222047 0.0000000
28:10.5%-28:7% -20.6683025 -21.9338859 -19.4027191 0.0000000
7:10.5%-28:7% -21.0114458 -22.2770292 -19.7458623 0.0000000
14:10.5%-7:7% -12.8943038 -14.1598873 -11.6287204 0.0000000
21:10.5%-7:7% -12.6406299 -13.9062133 -11.3750465 0.0000000
28:10.5%-7:7% -10.5211443 -11.7867277 -9.2555608 0.0000000
7:10.5%-7:7% -10.8642875 -12.1298710 -9.5987041 0.0000000
21:10.5%-14:10.5% 0.2536739 -1.0119095  1.5192573 0.9959863
28:10.5%-14:10.5% 2.3731596  1.1075762  3.6387430 0.0001585
7:10.5%-14:10.5% 2.0300163  0.7644329  3.2955997 0.0008887
28:10.5%-21:10.5% 2.1194857  0.8539022  3.3850691 0.0005618
7:10.5%-21:10.5% 1.7763424  0.5107590  3.0419258 0.0033558
7:10.5%-28:10.5% -0.3431433 -1.6087267  0.9224401 0.9770255

```