RID | UNAJ
Repositorio Institucional Digital UNAJ

Universidad Nacional
ARTURO JAURETCHE

Vildozo, María Laura

Evaluación de la producción de celulosa en el sistema kombucha: Aislamiento e identificación de microorganismos productores del polímero

2022

Instituto: Ciencias de la Salud

Carrera: Bioquímica

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Compartir Igual 4.0
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Documento descargado de RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital de la Universidad Nacional Arturo Jauretche

Cita recomendada:
Vildozo, M.L. (2022) *Evaluación de la producción de celulosa en el sistema kombucha: Aislamiento e identificación de microorganismos productores del polímero* [tesis de grado Universidad Nacional Arturo Jauretche]
Disponible en RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital UNAJ https://biblioteca.unaj.edu.ar/rid-unaj-repositorio-institucional-digital-unaj

Universidad Nacional
ARTURO JAURETCHE

Instituto de Ciencias de la Salud

Bioquímica

Trabajo final:

Evaluación de la producción de celulosa en el sistema kombucha.
Aislamiento e identificación de microorganismos productores del polímero.

Estudiante: María Laura VILDOZO
Directora: Judith Piermaria
Co- directora: Micaela Medrano

AGRADECIMIENTOS

A las docentes Judith Piermaria y Micaela Medrano por su guía y ayuda en medio de un contexto complicado como fue la pandemia. Gracias por brindarme los recursos para poder desarrollar este trabajo, sin su colaboración no hubiera sido posible.

A mí familia por sus consejos y respaldo en el inicio de esta carrera y su aliento cuando había momentos difíciles.

A todos los docentes que fueron parte de mi formación. Su calidez humana y su responsabilidad académica convierten a la Universidad Nacional Arturo Jauretche en una casa de estudios que vino a transformar una región que para algunos estaba perdida, en una cuna del conocimiento que se extiende para transformar también nuestra sociedad.

Y ante todas las cosas quería dar gracias a Dios. Y para ello simplemente quisiera compartir estas palabras:

"Las palabras de los sabios son como aguijones, y el conjunto de las palabras de los maestros, impartidas por un solo guía, son como clavos bien hincados.

Hijo mío, además de lo antes dicho, toma en cuenta que nunca se acaba de escribir muchos libros, y que el cuerpo se cansa de tanto estudiar. El fin de todo el discurso oído es este: Teme a Dios y cumple sus mandamientos porque esto es el todo del hombre" (Eclesiastés 12: 11-13)

Gracias.

RESUMEN

La kombucha es una bebida elaborada a partir de té azucarado fermentado aeróbicamente por un conjunto de bacterias y levaduras que se encuentran inmersas en un *biofilm* conocido con el nombre de *SCOBY (Symbiotic colony of bacteria and yeasts)*. En la composición química de la bebida se destacan los ácidos acético, glucónico y glucurónico, y el etanol; mientras que el *biofilm* tiene elevados contenidos de agua e hidratos de carbono, junto a proteínas y minerales en porcentajes mínimos. La celulosa es la biomolécula más importante en la matriz del *biofilm.* El género bacteriano conocido como mayor productor de dicho polisacárido es el actualmente denominado *Komagataeibacter sp*. y la especie hallada con más frecuencia es *K. xylinus*.

Existen variables físicoquímicas como el tipo de sustrato, el pH, la temperatura, la concentración de inóculo inicial, la relación superficie/volumen del recipiente donde se desarrolla el cultivo y la aireación del mismo, que inciden en la estabilidad y actividad de los microorganismos y en consecuencia en las cantidades de celulosa producidas durante la fermentación.

Los objetivos del trabajo fueron relevar información bibliográfica sobre la generación de celulosa bacteriana durante la producción de kombucha; caracterizar el sistema y evaluar la producción del polisacárido en función de la modificación de algunas variables de fermentación; así como aislar microorganismos productores de celulosa.

Para concretar los objetivos experimentales se efectuó la fermentación a partir de *biofilms* preexistentes, en medios de cultivo con y sin aireación forzada, denominados respectivamente cultivos en agitación o estáticos. Durante dicho proceso, se evaluaron el pH, el índice de refracción, el contenido de ácidos orgánicos y el de etanol en el medio fermentado; mientras que en los *biofilms* se evaluó el incremento de peso y la composición química final. Paralelamente, se efectuó el aislamiento de cepas bacterianas a partir del *biofilm* y del líquido, se realizaron pruebas para su caracterización (evaluación de crecimiento en medio sólido, morfología de colonia, coloración de Gram, actividad oxidasa y catalasa) y, finalmente, las cepas seleccionadas fueron secuenciadas para su contrastación con bancos de datos y su potencial asignación de género y especie.

En las condiciones ensayadas, la fermentación generó medios con un pH en un rango entre 3 y 4. Se observó la producción de celulosa en ambos modos de cultivo, sin embargo, los *biofilms* obtenidos a partir de cultivos estáticos presentaron un menor contenido de hidratos de carbono (28 %) que los provenientes de cultivos en agitación (32 %). Se pudieron aislar microorganismos productores de celulosa y se pudo identificar uno de ellos como *Komagataeibacter intermedius.*

Palabras clave: kombucha – celulosa microbiana

ÍNDICE

Introducción	pág. 5
Objetivos	pág. 17
Materiales y Métodos	pág. 19
Resultados y Discusión	pág. 30
Conclusiones	pág. 52
Referencias Bibliográficas	pág. 53
Apéndice	pág. 56

Introducción

La kombucha, también conocida con los nombres *"Hongos de té"* o *"Haipao",* es una bebida fermentada que se ha elaborado en China por más de dos mil años. También hay datos de su elaboración en Japón, Rusia y Europa del Este. Actualmente su producción se extiende a occidente y los trabajos de investigación que abordan el sistema son cada vez más numerosos (Liu y col.,1996; Kim & Adhikari, 2020). El producto se obtiene a partir de la fermentación aeróbica de té negro o verde, azucarado, por parte de una comunidad simbiótica conformada por bacterias ácido acéticas y levaduras, inmovilizadas en una matriz constituida principalmente por celulosa bacteriana. Dicha matriz, con forma de disco (Figura 1), se conoce como *SCOBY* por sus siglas en inglés *"Symbiotic colony of bacteria and yeasts"* (De Fillipis y col., 2018; May y col., 2019). Para generar la bebida, se prepara una infusión a partir de hojas (o "saquitos") de té colocadas en agua en ebullición durante al menos 5 minutos. Dicha infusión se suplementa con sacarosa (5-10 % p/v) y se deja enfriar a temperatura ambiente (20 °C), para luego agregarle un inóculo de líquido de kombucha fermentado previamente (aproximadamente 10 % v/v) y un "*biofilm"* maduro proveniente de un cultivo previo (Jayabalan y col., 2014). El *biofilm* se ubica generalmente en la superficie de la solución y provoca la fermentación que transcurre durante 10 a 14 días, aunque pueden realizarse fermentaciones más largas, hasta 60 días (Villareal-Soto y col., 2018). La presencia de una fuente de carbono como la sacarosa, junto a la acción de los microorganismos inoculados, inicia una serie de procesos metabólicos que generan una bebida levemente ácida y carbonatada al final del ciclo de fermentación (May y col., 2019).

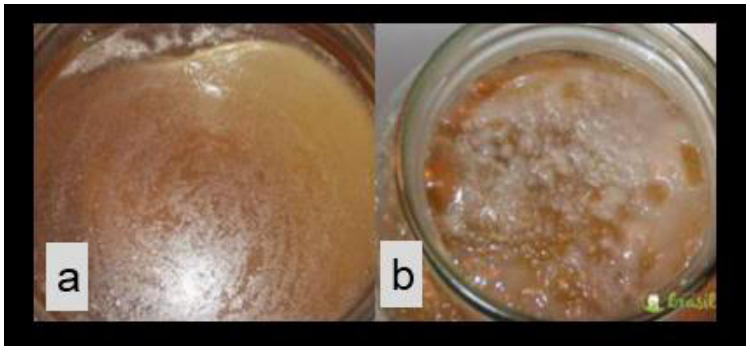


Figura 1: Imágenes correspondientes a *biofilms* de kombucha: Película de celulosa en los primeros días de fermentación (a) y crecimiento irregular del disco producto de los gases de la carbonatación, alta temperatura o baja calidad del té empleado (b). Imágenes de la revista *Probióticos* (Brasil).

Composición química de la kombucha

La composición de la kombucha (líquido y *biofilm*), varía de acuerdo al tipo y concentración inicial de sustrato, el tiempo de fermentación, la proporción de inóculo utilizada, la temperatura de fermentación y la disponibilidad de oxígeno (Villarreal-Soto y col., 2018). En la Tabla 1 se presentan los componentes más importantes tanto de la bebida como del *biofilm*.

Tabla 1: Principales componentes presentes en el sistema kombucha, tanto para la bebida fermentada como para el *biofilm.*

	Bebida	***Biofilm***	**Concentración**	**Referencia**
Ácido acético	presente	-	8,36 g/L a los 18 días de iniciada la fermentación.	Jayabalan y col., 2007
Ácido glucónico	presente	-	39 g/L a los 60 días de iniciada la fermentación.	Chen y Liu, 2000
Ácido glucurónico	presente	-	0,0160 g/L a los 20 días de iniciada la fermentación.	Lonĉar y col., 2006
Etanol	presente	-	5,5 g/L a los 20 días de iniciada la fermentación	Chen y Liu, 2000
Celulosa	-	presente	32,01 % (p/p)	Lescano Jimenez, 2015
Humedad	-	presente	58,01 % (p/p)	Lescano Jimenez, 2015
Cenizas	-	presente	0,14 % (p/p)	Lescano Jimenez, 2015
Proteínas	-	presente	8,74 % (p/p)	Lescano Jimenez, 2015

Microorganismos presentes en la Kombucha

Los microorganismos presentes en el consorcio del sistema kombucha pueden variar entre fermentaciones en función de sustrato, inóculo y condiciones de cultivo (Coton y col., 2017). Sin embargo, hay una serie de géneros que se encuentran en la mayoría de los cultivos y se presentan en la Tabla 2. Entre las levaduras, se han hallado los géneros

Torulaspora, Pichia, Brettanomyces/Dekkera, Saccharomyces, Lachancea, Saccharomycoides, Schizosaccharomyces y Kluyveromyces (Coton y col., 2017).

Las bacterias dominantes del cultivo de kombucha son las bacterias ácido acéticas, bacterias aeróbicas capaces de utilizar el etanol como sustrato para formar ácido acético. Estas bacterias, a diferencia de las levaduras, requieren grandes cantidades de oxígeno para su crecimiento y actividad. Entre los géneros de bacterias ácido acéticas comúnmente hallados en la kombucha se encuentran *Acetobacter, Gluconobacter* y *Komagataeibacter.* Entre las bacterias también se describió la presencia de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*, así como *Propionibacterium* y *Corynebacterium.*

Tabla 2: Géneros de bacterias y levaduras que se encuentran frecuentemente en kombucha (Chakravorty y col., 2016; Watawana y col., 2016; De Fillipis y col., 2018; Villareal-Soto y col., 2018; Lee y col., 2021).

Bacterias	**Levaduras**
Phylum Proteobacteria, incluyendo los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* y *Komagataeibacter* Phylum Firmicutes, incluyendo los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*incluyendo los géneros *Propionibacterium* y *Corynebacterium*	*Saccharomyces* *Schizosaccharomyces* *Torulaspora,* *Pichia* *Zigosaccharomyces* *Lachancea* *Candida* *Brettanomyces / Dekkera (*)*

(*) Brettanomyces / Dekkera: cada una representa un estadío distinto, la primera es la forma teleomorfa con reproducción sexual mientras que la segunda es la levadura anamorfa con reproducción asexual por gemación.

Procesos bioquímicos en la kombucha

Independientemente de la composición inicial del medio, el cultivo iniciador (proveniente de un cultivo anterior) proporciona el inóculo microbiano principal en la solución. En el inicio de la fermentación, la enzima invertasa, presente en las levaduras, degrada la sacarosa en sus monómeros glucosa y fructosa. La metabolización posterior de dichos monosacáridos, realizada por las levaduras, produce etanol y dióxido de carbono. A continuación, enzimas presentes en las bacterias ácido acéticas oxidan el etanol a ácido acético, disminuyendo el pH. Este medio ácido selecciona a los microorganismos ácido tolerantes de aquellos que no lo son, que podrían ser contaminantes. Las bacterias ácido

acéticas pueden sobrevivir en estas condiciones y, dado que algunas especies de este grupo son las productoras de celulosa del *biofilm*, esta selección natural constituye un hecho importante para la autopreservación del sistema (Jayabalan y col., 2014; Trček y col., 2015; Chakravorty y col., 2016). La secuencia de conversiones que genera el medio ácido, basada en la interacción cooperativa entre bacterias y levaduras, y la subsiguiente interacción competitiva que selecciona los microorganismos ácido tolerantes, conduce a la definición de la bioquímica de la kombucha como "social" por parte de algunos autores. La interacción que ejercen sus microorganismos contribuye a las características del producto y evita las alteraciones que podrían causar posibles contaminantes (May y col., 2019).

Celulosa bacteriana

La celulosa bacteriana, al igual que la celulosa vegetal, es un polímero de residuos de glucosa unidos por enlaces covalentes entre el carbono 1 y el carbono 4 (enlaces glucosídicos $\beta_{1\text{---}>4}$) formando una cadena lineal. Las cadenas se asocian entre sí a través de puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Walls. La asociación de al menos 10 cadenas forma una estructura llamada "microfibrillas" de celulosa (Chavez-Pacheco y col., 2004).

La celulosa bacteriana fue reportada por primera vez en 1886 por Brown (Carreño Pineda y col., 2012), sin embargo, fue recién en la segunda mitad del siglo XX cuando cobró notoriedad por sus características fisicoquímicas, como su alta resistencia a la presión, su elasticidad y su durabilidad. Además, tiene alta capacidad para absorber agua y, por ser sus microfibrillas de menor diámetro, posee mayor área superficial con respecto a la celulosa vegetal. Otra de las características importantes de la celulosa bacteriana es su pureza, que la distingue de la celulosa vegetal usualmente asociada a hemicelulosa y lignina. Asimismo, posee alto grado de cristalinidad (mayor a 60 %). Los cristales están compuestos de celulosa tipo Iα y Iβ y la relación entre las dos formas cristalinas depende de los microorganismos productores y de las condiciones de cultivo (fuente de carbono, suplementos, temperatura). Una vez purificada, la celulosa bacteriana no es tóxica ni alergénica, además de ser biocompatible y biodegradable (Bielecki y col., 2005).

Microorganismos productores de celulosa en la kombucha

Dentro de los géneros de bacterias presentes en la kombucha, el mayor productor de celulosa es *Acetobacter*. Estas bacterias, incluidas en el grupo de bacterias denominadas ácido acéticas, pertenecen a la familia Acetobacteriaceae. Son microorganismos Gram negativos o Gram variables, de forma elipsoidal o cilíndrica, que pueden crecer aislados, en grupos de dos o formando cadenas. Al realizar las pruebas bioquímicas se puede observar una actividad catalasa positiva y oxidasa negativa. Estas bacterias, pueden producir celulosa a partir de diversas fuentes de carbono tales como glucosa, sacarosa, glicerol, manitol o arabitol (Keshk y Sameshima, 2005).

Dentro del género *Acetobacter*, la especie considerada como la mayor productora de celulosa es *Acetobacter xylinus* (Ross y col., 1991; Chavez-Pacheco y col., 2004; Carreño Pineda y col., 2012; Yamada y col., 2012), la cual fue reclasificada primero al género *Gluconacetobacter* y finalmente a *Komagataeibacter* (Yamada y col., 2012; Villarreal-Soto y col., 2018), siendo la especie actualmente nombrada como *Komagataeibacter xylinus,* nomenclatura que se utilizará a lo largo de este trabajo (Figura 2). Otras especies del mismo género, también productoras de celulosa son *K. intermedius* (Dos Santos, 2015), *K. rhaeticus* (Machado y col., 2016; Semjonovs y col., 2016) y *K. saccharivorans* (De Fillipis y col., 2018).

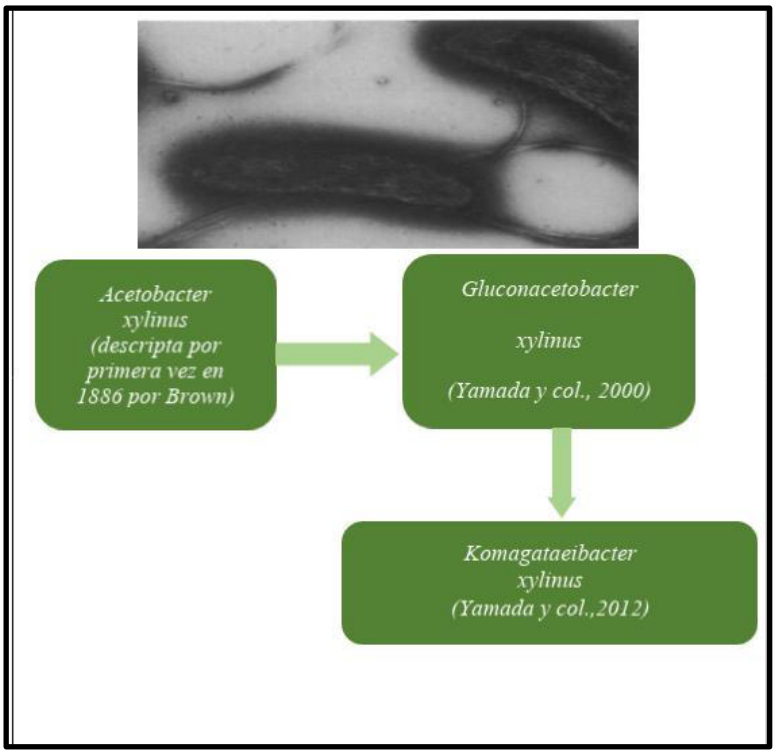


Figura 2: Micrografía electrónica de bacterias de la especie conocida actualmente con el nombre de *Komagataeibacter xylinus*, formando microfibrillas de celulosa (Brown Jr. y col., 1976) junto a la evolución del nombre de esta especie a partir de su descubrimiento y hasta la actualidad.

En el caso de *K. xylinus,* la producción de celulosa le otorga al microorganismo protección mecánica, química y biológica en su hábitat natural. La película de celulosa bacteriana funciona como un mecanismo de "flotación", permitiendo a esta especie ubicarse en la interfase aire/líquido para obtener más fácilmente el oxígeno requerido para su desarrollo. Por su parte, la lámina de celulosa también actúa a modo de barrera física y protege a la bacteria de la radiación ultravioleta, aumenta la capacidad de colonizar sustratos y retiene humedad, debido a su carácter altamente higroscópico, previniendo la desecación (Williams y Cannon, 1989). La matriz de celulosa facilita la incorporación de nutrientes, por las propiedades de adsorción con las que cuenta la estructura de este *biofilm* (Chavez-Pacheco y col., 2004). A diferencia de lo que sucede con las productoras de celulosa en kombucha, en la naturaleza hay otras especies, pertenecientes a los géneros *Rhizobium* y *Agrobacterium,* que también son capaces de producir celulosa bacteriana. Sin embargo, en estos casos el polímero les confiere a los microorganismos la capacidad de adherirse a otras células en interacciones simbióticas o infecciosas.

Síntesis bioquímica de celulosa bacteriana

En la síntesis de celulosa bacteriana están implicadas dos vías metabólicas, la vía de las pentosas fosfato y el ciclo de Krebs. La primera, implica la oxidación de carbohidratos, y el ciclo de Krebs involucra la oxidación de acetato (derivado de carbohidratos, grasas y proteínas) a oxalosuccinato y α-cetoglutarato. Sin embargo, *K. xylinus* no puede metabolizar la glucosa anaeróbicamente porque carece de fosfofructoquinasa-1, enzima responsable de la conversión de la fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-bifosfato (Gromet y col., 1957). *K. xylinus* puede oxidar succinato, piruvato y acetato a dióxido de carbono y sintetizar celulosa cuando estos ácidos están presentes en altas concentraciones. Esta bacteria puede producir glucosa *de novo*, a partir de fuentes de carbono como el glicerol, el citrato y otros intermediarios del ciclo de Krebs, a partir de gluconeogénesis y convertir moléculas como la fructosa o manosa a glucosa 6-fosfato para la posterior síntesis de celulosa (Weinhouse y Benziman, 1974).
La síntesis de celulosa bacteriana a partir de glucosa se efectúa de acuerdo a los siguientes pasos (Lee y col., 2013), ilustrados también en la Figura 3:

- Fosforilación de la glucosa por acción de la enzima glucoquinasa, generando el sustrato glucosa-6-fosfato.

- Isomerización de glucosa-6-fosfato a glucosa-1-fosfato por acción de la enzima fosfoglucomutasa.
- Síntesis de UDP-glucosa por acción de la enzima UDPG-pirofosforilasa.
- Síntesis de celulosa bacteriana a partir de la actividad enzimática de celulosa sintasa, la cual aumenta su actividad por la presencia de un activador alostérico (compuesto que se une a un sitio diferente del sitio activo de la enzima modificando su conformación y en consecuencia su actividad) llamado ácido diguanílico cíclico.

Finalmente, la celulosa es secretada al medio de cultivo como una subfibrilla elemental de 1,5 nm de diámetro a través de poros presentes en la membrana celular de 3,5 nm. Luego las subfibrillas se juntan para formar microfibrillas y el empaquetamiento de microfibrillas produce las fibras y las cintas de celulosa.

La síntesis de la celulosa implica el gasto de dos enlaces de alta energía por cada residuo de glucosa añadido al polímero, lo que consume hasta un 10 % del ATP generado por un metabolismo aerobio, y es por ello que la cadena respiratoria está involucrada en este proceso (Chavez-Pacheco y col., 2004).

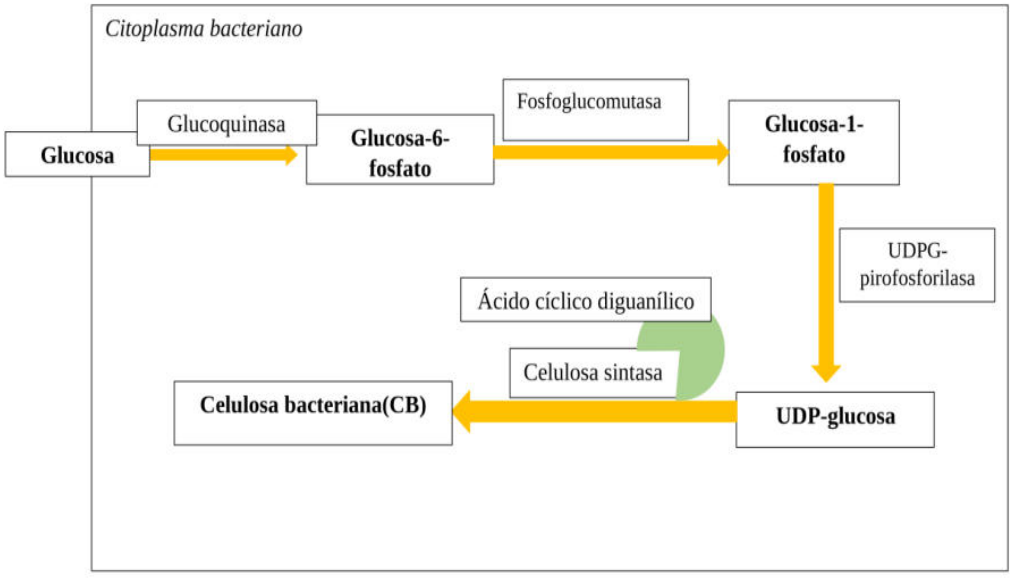


Figura 3: Sustratos y enzimas que intervienen en la síntesis de celulosa bacteriana. Esquema adaptado de Lee y col. (2013).

Factores que afectan la producción de celulosa en el sistema kombucha

Durante la fermentación del té en el sistema kombucha, los factores que afectan la producción de la celulosa bacteriana son: el tipo de sustrato, la temperatura, el pH, la

concentración de oxígeno disuelto, la relación superficie/volumen del recipiente empleado y la agitación o estanqueidad del cultivo (Villareal-Soto y col., 2018). Estas variables se desarrollan a continuación.

a) Sustrato

Semjonovs y col. (2016) analizaron el efecto del sustrato sobre la producción de celulosa bacteriana. A partir de un aislamiento inicial de las bacterias presentes en cultivos de kombucha, obtuvieron dos cepas bacterianas, *Komagataeibacter rhaeticus* P1463 y *K. hansenii B22,* que posteriormente cultivaron en medio Hestrin–Schramm (HS) conteniendo 20 o 40 g/L de glucosa o fructosa con el objetivo de analizar la producción de celulosa. En el medio de mayor concentración de glucosa (40 g/L) se incrementó la síntesis de ácido glucónico, lo cual derivó en un descenso de pH y una disminución en la producción de celulosa bacteriana. Por otra parte, comparando las concentraciones de fructosa, resultó que la cantidad de celulosa bacteriana producida fue levemente mayor para la concentración más elevada. Por otra parte, la cepa *K. rhaeticus P1463* produjo más celulosa que la cepa de *K. hansenii B22* bajo similares condiciones de cultivo. Los mismos autores compararon la producción de celulosa bacteriana de *K. rhaeticus* P1463 y *K. hansenii B22* con la de cepas de referencia *(K. xylinus DSM 46604* y *K. hansenii DSM 5602)* en función de la utilización de diferentes fuentes carbonadas (glucosa, fructosa, sacarosa, galactosa, manitol y ribosa). En base a los resultados concluyeron que la producción de celulosa bacteriana es dependiente de la concentración inicial del sustrato, de la identidad del mismo y de la cepa empleada (Velasco-Bedran y López - Isunza, 2007).

b) Temperatura

En un estudio realizado por Lončar y col. (2006), los autores observaron que la temperatura tenía incidencia sobre la cinética de producción de celulosa. Cuando se compararon las temperaturas de fermentación de 22 °C y 30 °C, el consumo de azúcares y la acidificación parecieron ser más rápidos a 30 °C durante los primeros 10 días. A su vez, en un trabajo realizado por Neffe-Skocińska y col. (2017) se determinó que en cultivos fermentados a 25 °C se favorecía la actividad de levaduras cuyos metabolitos son a su vez sustratos de bacterias ácido acéticas presentes al inicio del proceso. De Fillipis y col. (2018), también analizaron la fermentación de la kombucha a dos temperaturas utilizando dos especies del género *Komagataeibacter sp.* Mientras que *K. saccharivorans* se vio favorecida para su crecimiento a temperaturas altas (30 °C), *K. xylinus* produjo mayor cantidad de celulosa bacteriana a 20 °C. En dicho estudio se pudo observar,

además, que las muestras fermentadas a mayor temperatura mostraron ser más diversas, promoviendo el crecimiento de varios Firmicutes *(Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus)* y Actinobacteria *(Propionibacterium, Corynebacterium*), aunque su abundancia fue siempre menor al 2 % y disminuyó a medida que avanzaba la fermentación.

c) Tiempo de fermentación

El tiempo de fermentación de la kombucha es de entre 7 y 60 días (Chu & Chen, 2006). Tiempos largos de fermentación generan un ambiente que resulta beneficioso para algunas especies y perjudicial para otras. Por ejemplo, Chen y Liu (2000) determinaron que el valor de pH final del líquido, después de 30 días de fermentación, fue cercano a 2,5, mucho más bajo que el pH para un crecimiento óptimo de las levaduras (pH 5,4 - 6,3). A su vez, los autores concluyeron que la acumulación de dióxido de carbono, generado por la fermentación alcohólica de las levaduras, provocó la separación del *biofilm* de celulosa del líquido bloqueando el pasaje de nutrientes desde el líquido hacia la superficie inferior del *biofilm* y el de oxígeno en sentido inverso. Esto último, con el paso del tiempo de fermentación, crea un ambiente anaeróbico y pobre en nutrientes, que perjudica la supervivencia de los microorganismos y la producción del polisacárido.

d) pH y ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos dominantes en la kombucha son el ácido acético, el ácido glucónico y el glucurónico (Chakravorty y col., 2016; De Fillipis y col., 2018). Sin embargo, se han detectado otros ácidos tales como el ácido láctico, el ácido cítrico (Jayabalan y col., 2007), el ácido tartárico y el málico (Srihari y Satyanarayana, 2012). La producción de estos compuestos genera un descenso en el pH del medio. En un trabajo realizado por Chakravorty y col. (2016), en el que analizaron variables fisicoquímicas, biológicas y moleculares de la kombucha, describieron la evolución de la acidez del cultivo durante una fermentación de 21 días. El pH inicial previo a la fermentación fue de aproximadamente 5,03 y disminuyó abruptamente a 2,28 después de 7 días de fermentación. Posteriormente, el descenso del pH no fue significativo, alcanzando un valor de 1,88 al día 21 de la fermentación. Es en este medio ácido donde se establece una condición favorable para este ecosistema (May y col., 2019), dado que contribuye a seleccionar los microorganismos que lo toleran. Levaduras ácido tolerantes como *Dekkera* y *Brettanomyces* son aptas para sobrevivir y reproducirse aún en estas condiciones dañinas para otros géneros (Steensels y col., 2015). Por su parte, las bacterias

ácido acéticas, como *Komagataeibacter sp.* son altamente tolerantes al ácido (Trček y col., 2015). La capacidad de la comunidad biológica presente en la kombucha de generar y adaptarse al medio ácido constituye un beneficio para evitar la contaminación de microorganismos competidores, incluyendo aquellos que son patógenos (Sreeramulu y col., 2000). Que el cultivo se mantenga libre de contaminación externa es un factor clave para la producción de celulosa bacteriana. La producción de ácidos orgánicos y la consecuente disminución del pH generan condiciones favorables para el desarrollo de las bacterias ácido acéticas, microorganismos responsables de la producción de celulosa y del incremento de biomasa del biofilm (May y col., 2019).

f) Disponibilidad de oxígeno, cultivos estáticos y en agitación

La celulosa bacteriana se produce típicamente en cultivos estáticos. Sin embargo, el crecimiento de bacterias productoras y la síntesis de celulosa son lentos en dichas condiciones, incluso en el medio más favorable. Cuando la producción se realiza a partir de cepas aisladas, los períodos de cultivo varían de 10 días a 6 semanas, dependiendo de la cepa utilizada. Para reducir el período de cultivo, se puede utilizar la agitación, ya que un tiempo típico de cultivo de 3 a 4 semanas en condiciones estáticas, se puede reducir a solo 24 días en condiciones de agitación (Dudman, 1959; Lee y col., 2013).

Schramm y Hestrin (1954), analizaron la fermentación de un medio con glucosa utilizando una cepa productora de celulosa, *Komagataeibacter xylinus,* en condiciones estáticas y en agitación. Advirtieron que, debido a la transferencia de oxígeno a todo el volumen, la síntesis de celulosa no ocurriría solo en la superficie observándose la formación de "cuerpos macroscópicos" del polímero en un tamaño de hasta 10 mm de diámetro y con forma esférica, articulada o estrellada. Esto fue confirmado más recientemente, en 2004, por Chávez-Pacheco y col. (Figura 4).

Con respecto a la zona aeróbica de crecimiento, en una experiencia realizada por Hornung y col. (2006), la película de celulosa aumentó su espesor de 2 a 3 cm en un tiempo de 2 a 4 semanas en cultivos estáticos. Al realizar mediciones de concentración de oxígeno para estos cultivos, encontraron que había una zona superior aeróbica de un espesor de 800 a 1000 µm, determinando además que solo las células que están en esta zona son capaces de producir celulosa, ya que más abajo prevalecen condiciones anaeróbicas.

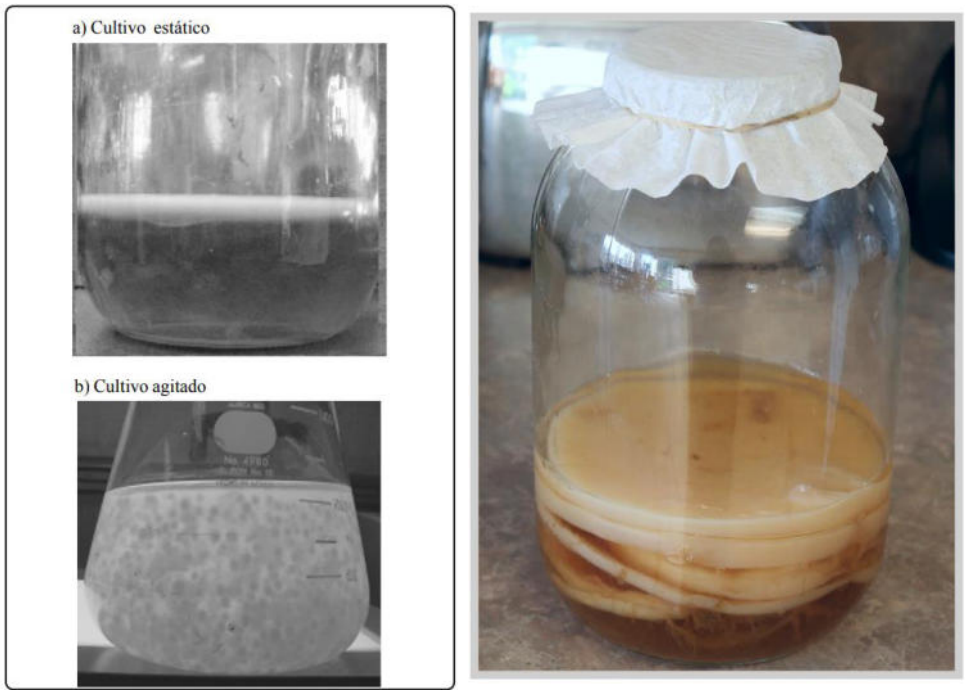


Figura 4: Imágenes de producción de celulosa en cultivos estáticos y agitados (Chávez-Pacheco y col., 2004). Izquierda superior y derecha: *Biofilms* en la superficie del líquido en cultivos estáticos. Izquierda abajo: Celulosa en forma de gránulos, *pellets* o amorfa en los cultivos desarrollados en agitación.

Actualmente se sabe que en cultivos en agitación se pueden obtener *pellets* de celulosa o aglomeraciones amorfas de las fibras. Estos cultivos pueden realizarse por lotes o en continuo, en reactores de tanque agitado o *airlift*, con el fin de escalar el proceso a nivel industrial; sin embargo, se ha detectado baja productividad, lo que estaría relacionado con el hecho de que la agitación favorece el crecimiento de células no productoras de polímero que consumen el sustrato, denominadas celulosa (-). Esto último, podría deberse a mutaciones que lesionan la maquinaria enzimática encargada de la polimerización de la glucosa (Kim y col., 2007).

g) Relación superficie/volumen de fermentación

Debido a que la disponibilidad de oxígeno en los cultivos impacta sobre la producción de celulosa, la relación superficie/volumen constituye un factor que influye en el rendimiento de producción. Goh y col. (2012) encontraron que la producción del *biofilm* aumentaba con una intensificación del área y disminuía con una mayor profundidad del recipiente de cultivo. El dióxido de carbono generado quedaría atrapado en el líquido, sin poder atravesar la película y terminaría acumulándose en las zonas más profundas. Por su parte, Caicedo y col. (2001), en un trabajo donde analizaron factores para el escalado del

proceso de producción de celulosa por fermentación estática, estudiaron el efecto de la relación área/volumen. Concluyeron que, a medida que se amplía el área, se incrementa la cantidad de celulosa producida y que es necesaria una altura mínima para el desarrollo de la película, lo cual evidencia un efecto de la transferencia de oxígeno sobre el proceso.

De acuerdo a lo descripto antes, múltiples factores determinan la producción de celulosa bacteriana en el sistema kombucha. Por otra parte, en la medida que se estudian y reconocen sus propiedades benéficas, aumenta el consumo de la bebida fermentada y en función de ello, se vuelve interesante pensar en la utilización de los *biofilms* remanentes de la producción de la bebida. Por tales motivos, resulta necesario estudiar la producción de estos *biofilms*, conocer su composición y analizar la producción del polímero a partir de cepas aisladas de este sistema.

Objetivos del trabajo

Objetivos generales:

- Que la estudiante adquiera habilidades para desenvolverse en el laboratorio, en el análisis y discusión de resultados y en la comunicación científica de los mismos.
- Caracterizar la producción de celulosa bacteriana a partir del sistema kombucha y a partir de cepas aisladas del mismo.

Objetivos específicos:

- Relevar en bibliografía la producción de celulosa a partir de kombucha o de cepas aisladas a partir de dicho sistema.
- Caracterizar la producción de celulosa bacteriana a partir de discos de kombucha de procedencia local.
- Aislar e identificar cepas productoras de celulosa presentes en sistemas de kombucha de procedencia local.

Modalidad de desarrollo del trabajo

Debido al aislamiento y restricción de ingreso a los institutos por la pandemia a causa de la COVID-19, este trabajo final se llevó a cabo en una primera etapa de aproximación teórica, luego una etapa experimental básica en el domicilio de la estudiante y finalmente una etapa experimental en los laboratorios de investigación que originalmente se habían propuesto para su desarrollo.

Materiales y métodos

Biofilms de kombucha

Los *biofilms* de kombucha (y el líquido proveniente de una fermentación anterior) fueron cedidos por productores locales de bebida de la ciudad de La Plata que efectúan el proceso de modo artesanal. Los *biofilms* se mantuvieron en té, a temperatura ambiente y al abrigo de la luz. Se reactivaron en té azucarado estéril, como se describe en el apartado siguiente, y se emplearon luego de un ciclo de activación.

Generación de nuevos *biofilms*

Para la generación de un nuevo *biofilm* de kombucha se preparó té negro, para lo cual se colocaron 400 mL de agua en un recipiente, se agregaron 80 gramos de azúcar y se dispusieron 6 gramos de té en el mismo. Se llevó al fuego, dejando hervir aproximadamente 15 minutos y posteriormente se dejó enfriar la infusión.
En un frasco limpio de vidrio de aproximadamente 6 cm de diámetro se colocó una pieza de 2 cm x 2 cm de un *biofilm* proveniente de un cultivo previo. Seguidamente, se colocaron 200 mL de la infusión de té antes preparada a temperatura ambiente y, con ayuda de una pipeta, se agregaron 10 mL del cultivo en el que estaba el *biofilm* empleado. En la boca del frasco se colocó una gasa con el fin de permitir la entrada de aire para generar las condiciones aeróbicas, pero evitando el ingreso de partículas que pudieran contaminar el cultivo.

Fermentación de kombucha en condiciones estáticas y en agitación

Para esta etapa se preparó un litro de té negro azucarado del mismo modo que se describió anteriormente (200 gramos de azúcar/L y 15 g de té/L).
El disco obtenido en la primera fermentación fue cortado en 4 piezas de 2 x 2 cm, colocando cada una de las mismas en frascos de vidrio limpios de 6 cm de diámetro. A cada frasco se agregaron 200 mL de té azucarado y 10 mL del cultivo iniciador obtenido de la primera fermentación. Previamente, al té azucarado y al cultivo iniciador se les midió el pH, los grados Brix (empleando refractómetro), la temperatura y la densidad. Una vez que se habían incorporado las piezas de *biofilm* al té, los frascos se incubaron de forma estática y en aireación, dos en cada condición. La agitación se generó mediante

inyector de aire en el frasco a un flujo de 240 L/h. Todos los frascos fueron cubiertos con una gasa para evitar el ingreso de partículas y permitir la aerobiosis.

Durante la fermentación, que transcurrió aproximadamente durante 60 días, se evaluó el pH, el índice de refracción, la densidad, el contenido de etanol y la presencia de ácido acético; y finalmente se determinó la composición de los discos (humedad, cenizas, proteínas e hidratos de carbono totales).

Mediciones de pH, refractometría y densidad del líquido fermentado

Para evaluar el pH se utilizaron tiras reactivas de pH de 0 a 14, de un punto (pH 0-14 Merck, Alemania) (Figura 5).

La evaluación de los grados Brix en el líquido de los cultivos se efectuó con un refractómetro ATC modelo: 0-32 °Brix. Este instrumento permite medir la refracción de la luz en soluciones azucaradas, y los resultados brindan una medida estimada de los azúcares en la solución en °Brix. Un (1) °Brix equivale a la presencia de 1 gramo de azúcar en 100 gramos de solución. Para su utilización se efectuó una calibración inicial del cero con agua destilada (se colocaron 1 o 2 gotas sobre la zona del prisma y en caso de no observar el valor de 0 °Brix en el lente se corrigió a dicho valor girando el tornillo de ajuste). Una vez realizado el ajuste con agua destilada se evaluaron las muestras colocando 1 o 2 gotas sobre el prisma previamente limpio (Figura 5).

La densidad de las soluciones se evaluó mediante un densímetro de vidrio. Este instrumento consiste en un bulbo en un extremo y un vástago en el otro, con una escala de lectura en g/cm^3. La medida está basada en la flotación del instrumento debida al equilibrio entre las fuerzas peso y empuje, esta última dependiente de la densidad del líquido. Para llevar a cabo las medidas se colocaron aproximadamente 250 mL de líquido a evaluar en una probeta y se introdujo el densímetro girándolo hasta que flotó sin tocar las paredes de la probeta (Figura 5).

Figura 5: Instrumentos utilizados para el análisis de variables fisicoquímicas de manera domiciliaria. Tiras reactivas de pH (1), densímetro de vidrio y probeta (2), y refractómetro con cada una de sus partes detalladas (3) y la escala de medida en °Brix amplificada (4).

Determinación de la concentración de etanol en el líquido fermentado mediante cromatografía gaseosa

La concentración de etanol en el medio líquido de los cultivos, estáticos o en agitación, se determinó mediante cromatografía gaseosa empleando la técnica de inyección líquida. Para realizar una separación mediante cromatografía de gases, se inyecta una pequeña cantidad de muestra en una corriente de un gas inerte a elevada temperatura. Esta corriente de gas atraviesa una columna cromatográfica que separa los componentes de la mezcla por medio de un mecanismo de partición. Los componentes separados, emergen de la columna y son identificados en función del tiempo de retención de cada uno de ellos en relación al mismo parámetro de patrones conocidos. Por otra parte, la señal emitida por

el mecanismo de detección se relaciona con la cantidad de cada uno de los componentes. Las gráficas obtenidas a partir de la evaluación se denominan cromatogramas.

Para la evaluación de las muestras del presente trabajo se utilizó un cromatógrafo gaseoso Modelo 7890A (Agilent Technologies, USA) empleando una columna HP PLOT Q con el inyector en modo Split 10:1. Se estableció una temperatura de ingreso de 175 °C, presión de corrida de 29,04 psi y el horno en una isoterma a 185 °C. Se empleó un detector de ionización de llama (FID) a 250 °C. El equipo se estabilizó durante 60 min previo a la evaluación y el tiempo total de las corridas fue de 5 min. Se realizaron inyecciones de 1µl y 0.4 µl de muestra.

A partir de soluciones estándar de etanol 5 y 10 % v/v se prepararon diluciones para realizar la calibración. Se utilizaron concentraciones de etanol de 0; 0,5; 2,5; 5,0 y 7,5 % v/v. En todas las soluciones se incluyó isopropanol 1 % v/v, como patrón interno. Tanto las mediciones de los puntos de la curva de calibración como de las muestras de kombucha se realizaron por duplicado.

A partir de los cromatogramas obtenidos para cada una de las concentraciones de etanol de la curva de calibración, se extrajo el área bajo las curvas correspondientes a etanol e isopropanol. Para identificar cada uno de ellos se tuvo en cuenta el tiempo de retención: 0,755 minutos para etanol y 1,032 minutos para el isopropanol. Posteriormente, se calculó la relación de áreas de etanol e isopropanol y a partir de esos valores se realizó la gráfica de esa relación en función de la concentración de etanol en cada uno de los puntos. Los puntos experimentales fueron ajustados a una recta y, a partir de la ecuación correspondiente y la relación de áreas, se obtuvo la concentración de etanol en las muestras.

Determinación del contenido de ácido acético en el líquido fermentado mediante cromatografía gaseosa

El contenido de ácido acético se evaluó mediante inyección líquida por cromatografía gaseosa, de acuerdo con el fundamento descripto en el apartado anterior.

Para la evaluación del contenido de ácido acético se utilizó un cromatógrafo gaseoso Modelo 7890A (Agilent Technologies, USA) empleando una columna DB23 Q con el inyector en modo Split 25:1. Se estableció una temperatura de ingreso de 250 °C, presión de corrida de 20.31 psi y el horno en una Rampa de Temperatura de 100 °C 0 min, aumentando 8 °C por min hasta 200 °C durante 3 min. Se empleó un detector de ionización de llama (FID) a 250 °C. El equipo se estabilizó durante 60 min previo a la

evaluación y el tiempo total de las corridas fue de 5 min. Se realizaron inyecciones de 1µl de muestra.

Para la curva de calibración se utilizaron soluciones estándar de ácido acético (Sigma, USA), en concentraciones comprendidas entre los puntos 0 y 150 mM.

Determinación de la composición del *biofilm* de kombucha

a) Cenizas totales

Para conocer el contenido de minerales o componentes inorgánicos en las muestras de los biofilms, se determinaron las cenizas, producto de la incineración completa de las mismas.

Se rotularon y pesaron en balanza analítica (± 0,0001 g) cápsulas de porcelana previamente calcinadas en mufla. En dichas cápsulas se colocaron las muestras de *biofilms* de kombucha y se pesaron nuevamente para conocer el peso de las muestras de partida. Las muestras se evaporaron hasta sequedad sobre tela metálica en mechero a fuego suave y posteriormente a fuego fuerte hasta residuo carbonoso, evitando proyecciones que producen error por pérdida de muestra. Las cápsulas fueron luego colocadas en mufla a 550 °C hasta observar cenizas blancas. Las muestras en las que se observaron residuos carbonosos fueron enfriadas hasta temperatura ambiente, humedecidas con agua destilada y se disgregó el residuo con varilla de vidrio para reiniciar el proceso. Esto se repitió hasta obtener cenizas blancas en todas las muestras. Las mismas se enfriaron en desecador hasta temperatura ambiente para ser pesadas. Se realizó finalmente el cálculo para obtener el porcentaje de cenizas. Las determinaciones se efectuaron por duplicado.

$$\% \text{ cenizas} = \frac{[(\text{peso de la cápsula conteniendo las cenizas}) - (\text{peso de la cápsula vacía})]}{(\text{peso de la cápsula conteniendo la muestra} - \text{peso de la cápsula vacía})} \times 100$$

b) Determinación de humedad mediante el método indirecto

El método se basa en la evaluación de la pérdida del agua de la muestra al ser colocada en estufa a 100 ± 5 °C, quedando el residuo sólido (componentes no volátiles del alimento: lípidos, carbohidratos, proteínas y minerales). Es aplicable a muestras que no

sufren ninguna transformación durante el secado térmico ni que contengan en su composición compuestos volátiles.

Para la determinación se pesaron placas de Petri y en ellas se colocaron muestras de *biofilms.* Se repitió la pesada de las placas para poder conocer la cantidad de muestra de partida y se colocaron en estufa a 105 °C durante dos horas. Se extrajeron las placas y colocaron en desecador y cuando alcanzaron la temperatura ambiente fueron pesadas. Luego las placas se colocaron nuevamente en estufa y se repitió la operación hasta obtener dos pesadas consecutivas iguales. El contenido de agua se calculó como se indica en la siguiente ecuación.

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{[(\text{peso de la muestra húmeda}) - (\text{peso muestra seca})] \times 100}{(\text{peso de muestra húmeda})}$$

c) Determinación de proteínas por el método de Kjeldahl

Para la evaluación del contenido de proteínas en las muestras se utilizó el método de Kjeldahl que se basa en la determinación del nitrógeno total tras digerir la materia orgánica con ácido sulfúrico y referir luego dicho contenido a proteínas mediante el empleo de un factor de conversión (1 g de nitrógeno cada 6,25 g de proteínas en este trabajo).

Las muestras fueron sometidas a una digestión en H_2SO_4 concentrado que, en presencia de sulfato cúprico (catalizador de la reacción), y de sulfato potásico, eleva su punto de ebullición, deshidrata, proporciona el medio ácido, actúa como un agente oxidante reduciéndose a dióxido de azufre (SO_2) y genera una atmósfera reductora que convierte todo el nitrógeno de la muestra en amoníaco (NH_3) que queda retenido como amonio (NH_4^+). A continuación, el amonio retenido se libera en forma de NH_3 por tratamiento alcalino con NaOH, el cual se transporta con ayuda de una destilación en corriente de vapor de agua a un recipiente conteniendo ácido bórico (H_3BO_3) 4 % p/v e indicador de Mortimer (combinación de los indicadores ácido-base: rojo de metilo y verde de bromocresol), cuyo punto de viraje se encuentra en pH 5,1. Finalmente se realiza una titulación del amoníaco con una solución valorada de H_2SO_4. Paralelamente a las muestras se procesó un blanco, en el cual se emplearon los mismos reactivos sin muestra.

Reactivos utilizados:

- H_2SO_4 concentrado (98 %)
- Catalizador: K_2SO_4 anhidro + $CuSO_4.5H_2O$ (relación 10:1)
- NaOH 40 %
- Solución H_3BO_3 4 %
- Solución H_2SO_4 0,10 N
- Indicador Mortimer: 0,016 % rojo de metilo, 0,08 3% verde de Bromocresol en etanol.

Digestión

En esta etapa se emplearon balones en los que se colocaron las muestra de *biofilm,* catalizador (sulfato de sodio más sulfato de cobre, 10:1), plato poroso y 20 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. Paralelamente, se hizo el blanco. Se preparó el dispositivo con la trampa de gases y los balones se expusieron al fuego de mecheros bajo campana de seguridad hasta que la mezcla de reacción resultó transparente y con una coloración verde azulada. Una vez frío, se procedió a agregar 200 mL de agua destilada a cada balón, bajo canilla, evitando que los mismos se sobrecalentaran.

Neutralización y destilación

A la solución obtenida se incorporaron 72 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 40 % p/v, cada balón se conectó al destilador con el dispositivo refrigerante y se inició el calentamiento a ebullición y paralelamente, la recolección del destilado en Erlenmeyer conteniendo 30 mL de ácido bórico (H_3BO_4) 4 % y 5 gotas del Indicador de Mortimer (color rojizo). Se destilaron aproximadamente 200 mL de líquido y el indicador viró al color azul.

Titulación

Finalmente se realizó la valoración hasta viraje del indicador del NH_3 generado a partir de las muestras, utilizando H_2SO_4 0,1042 N.

Cálculos

$$\text{Proteína total \%} = (V_{muestra} - V_{blanco}) \times N_{ácido} \times 0{,}014 \times F \times 100 / \text{g de muestra}$$

V: volumen valorado en la titulación
N: Normalidad del ácido
0,014 = gramos de nitrógeno contenidos en un miliequivalente
F: factor de conversión para la muestra, en este caso 6,25

d) Determinación de azúcares totales por el método de la antrona

Esta técnica permite cuantificar carbohidratos. En presencia de ácido sulfúrico concentrado, los hidratos de carbono son hidrolizados si eso es posible, luego deshidratados a furfurales (o hidroxi-metil-furfurales) los cuales condensan con antrona (10-ceto 9,10-dihidroantraceno) dando un complejo azul verdoso. La intensidad del color es cuantificada mediante medición de la absorbancia a 620 nm. El valor resultante se compara con los obtenidos a partir de soluciones de glucosa de concentración conocida con las cuales se construye una curva estándar. El rango de sensibilidad del método es de 50 a 500 µg/mL.

En muestras conteniendo celulosa, como las de este trabajo, se requiere una hidrólisis previa completa que se efectúa utilizando ácido clorhídrico (HCl) 3 M y temperatura, previo a la evaluación, para asegurar la reacción de todos los monómeros del polisacárido.

Reactivo de antrona

En un Erlenmeyer de 250 mL se preparó una solución empleando 34 mL de agua destilada, sobre los cuales se volcaron 66 mL de ácido sulfúrico concentrado agitando suavemente y enfriando externamente, en baño de agua hielo, debido a la característica exotérmica de la dilución del ácido. Luego, con la solución aún tibia, se incorporaron 50 mg del reactivo de antrona y se continuó la agitación para su disolución. El reactivo se conservó al abrigo de la luz a 4 °C por un período no mayor de 15 días antes de su utilización.

Hidrólisis previa

Una muestra de aproximadamente 1 g de cada *biofilm* fue pesada (±0,0001 g) y colocada en un balón. Se adicionaron 200 mL de agua destilada y 20 mL de HCl concentrado y se agregó plato poroso. Los balones se dispusieron sobre mantas de calentamiento eléctricas y se llevó a ebullición durante aproximadamente 3 horas. Cuando alcanzaron temperatura ambiente los productos de la reacción anterior se transfirieron a matraces de 500 mL completando hasta el aforo con agua destilada. Se homogeneizó y luego se procedió a filtrar, con ayuda de un embudo y papel de filtro, parte de la muestra para ser empleada en la reacción de antrona.

Determinación de antrona

Para esta etapa se asumió que el 30 % de la masa de los *biofilms*, al menos, correspondía a carbohidratos. A partir de ello se calculó la concentración mínima esperada en el filtrado obtenido de la solución hidrolizada y se prepararon las diluciones adecuadas para el rango

de sensibilidad de la metodología de antrona. A partir de glucosa se prepararon soluciones de concentraciones 0, 100, 200, 300, 400 y 500 µg/mL para la construcción de la curva de calibración (Tabla 3). Tanto las diluciones de las muestras como las soluciones de glucosa de concentración conocida se colocaron en tubos de vidrio (0,2 mL/tubo) y se adicionaron 2 mL del reactivo de antrona. Los tubos se taparon y se homogeneizaron por inversión. Colocados en gradilla se sometieron a un calentamiento en baño de agua a ebullición durante 15 minutos. Pasado dicho tiempo, la gradilla fue retirada y se enfrió a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente se leyó la absorbancia a 620 nm utilizando un espectrofotómetro.

Tabla 3: Elaboración de la curva de calibración a partir de una solución de glucosa 1 mg/mL.

Concentración (µg/mL)	**volumen de solución de glucosa (µL)**	**volumen de agua destilada (µL)**
0	0	1000
100	100	900
200	200	800
300	300	700
400	400	600
500	500	500

Aislamiento de bacterias productoras de celulosa

A partir de un cultivo de kombucha de 14 días de desarrollo se tomaron porciones de *biofilm* y líquido fermentado y se colocaron en un medio de enriquecimiento conteniendo 1% p/v de glucosa, 1% p/v etanol, 1% p/v manitol, 0,2 % p/v de extracto de levadura 0,2% p/v de peptona y 0,02 % p/v de sorbato de potasio. La preparación se incubó en estufa a 30 °C durante 7 días. Finalizado ese período se efectuaron estrías en placas conteniendo medio GEY-$CaCO_3$ agarizado (2 % p/v de glucosa, 5 % p/v etanol, 1% p/v de extracto de levadura, 0,3 % p/v de carbonato de calcio y 1,5 % p/v de agar) y las placas se incubaron en estufa a 30 °C hasta la observación del desarrollo de colonias. Se identificaron aquellas colonias que generaron un halo de disolución del carbonato de calcio (halo de disminución de opacidad del medio) y a partir de dichas colonias se realizaron 3 pasajes por colonia aislada mediante estrías en el mismo medio. Los microorganismos aislados fueron caracterizados como se describe a continuación y se

preservaron a -80 °C colocándolas en criotubos en suspensión preparada a partir de medio GEY líquido (2 % p/v de glucosa, 5 % p/v etanol, 1 % p/v de extracto de levadura) con 20 % v/v de glicerol estéril.

a) Coloración de Gram

Para efectuar la coloración se parte de soluciones de cristal violeta, 10 g/l en agua destilada, y safranina, dilución 1 en 10 en agua de la solución madre (25 g/l en etanol). Se emplea lugol como mordiente (10 g I_2 + 20 g KI en 1 litro de agua destilada) y una mezcla de etanol acetona como decolorante (etanol-acetona 4:1). Las soluciones se filtraron antes de su utilización. Se aplicó el protocolo de coloración que se detalla a continuación (Tabla 4).

Tabla 4: protocolo de la tinción de Gram

	Tiempo de exposición (s)
Cristal violeta	120
Lugol	30
Lugol	30
Lavar con agua	
Decolorante	10
Lavar con agua	
Safranina	120

b) Prueba de la Catalasa

La catalasa es una enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. La prueba se utiliza para comprobar la presencia de la enzima que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen el citocromo oxidasa.

En un portaobjetos se colocaron 2 gotas de agua oxigenada al 30 % v/v. Con ayuda de un ansa se tocó una colonia de reciente desarrollo del microorganismo a evaluar y se puso en contacto con el agua oxigenada. Se observó la aparición de burbujas en la mezcla (resultado positivo).

c) Prueba de la Oxidasa

Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que forma parte de la cadena de transporte de electrones en la respiración aeróbica, transfiriendo electrones al oxígeno, con la formación de agua. Por lo general, sólo se encuentra en los organismos aerobios, algunos anaerobios facultativos y, excepcionalmente, en algún microaerófilo, pero los anaerobios estrictos carecen de actividad oxidasa. El reactivo de la oxidasa más recomendado es la solución acuosa al 1 % de diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina (reactivo de Kovacs). Este reactivo tiñe las colonias oxidasa positivas de color lavanda que vira gradualmente a púrpura-negruzco intenso. Se agregaron 2-3 gotas de reactivo a las colonias y se observó si presentaban o no cambio de coloración.

d) Producción de celulosa en cultivo aislado

Para confirmar la producción de celulosa por parte de las cepas aisladas las mismas fueron cultivadas en medio GEY líquido estéril colocado en tubo de ensayo hasta la observación del *biofilm* en superficie.

Identificación de cepas aisladas productoras de celulosa

Las colonias seleccionadas como Gram positivas, catalasa positiva, oxidasa negativa y que produjeron *biofilm* al desarrollar en medio GEY líquido, fueron enviadas para su secuenciación a la empresa Macrogen (Seúl, Corea). Para la amplificación del material genético se utilizaron los *primers* que se detallan en la tabla 5. Las secuencias obtenidas fueron analizadas por comparación con la base de datos del *GenBank* para lo cual se utilizó el *software* BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Tabla 5: secuencia de *primers* utilizados para la identificación de las cepas aisladas

Sequencing Primer Name Primer Sequences	PCR Primer Name Primer Sequences
785F 5' (GGA TTA GAT ACC CTG GTA) 3'	27F 5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3
907R 5' (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) 3'	1492R 5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3'

Las cepas aisladas fueron preservadas en la colección de Bacterias del Laboratorio de Microbiología del CIDCA a -80 °C colocándolas en criotubos en suspensión preparada a partir de medio GEY líquido (2 % p/v de glucosa, 5 % p/v etanol, 1 % p/v de extracto de levadura) con 20 % v/v de glicerol estéril.

Resultados y discusión

Obtención de *biofilms* de kombucha

La kombucha es una bebida obtenida al fermentar té azucarado con un consorcio microbiano incluido en un *biofilm,* producido por los microorganismos que forman parte de dicha comunidad. El *biofilm,* habitualmente en forma de disco, flota en la superficie del cultivo y está constituido mayoritariamente por agua y celulosa. Con el objetivo de obtener *biofilms* formados recientemente, se partió de otros, cedidos por productores locales de la bebida de la ciudad de La Plata (Figura 6), y se desarrolló la fermentación en té negro azucarado tal como se detalla en materiales y métodos.

Figura 6: *Biofilms* de kombucha empleados para el inicio de las fermentaciones (izquierda) y piezas de *biofilms* utilizadas para generar las sucesivas fermentaciones (derecha).

Durante la fermentación pudo observarse la generación macroscópica del *biofilm*. Al quinto día se observó incipiente el nuevo *biofilm* en la superficie del medio de cultivo (té), con crecimiento irregular y proyecciones delgadas. Durante el proceso también pudo apreciarse la formación de varias láminas de matriz de difícil manipulación por su delgadez. El *biofilm* adquirió homogeneidad recién a partir del séptimo día de proceso (Figura 7).

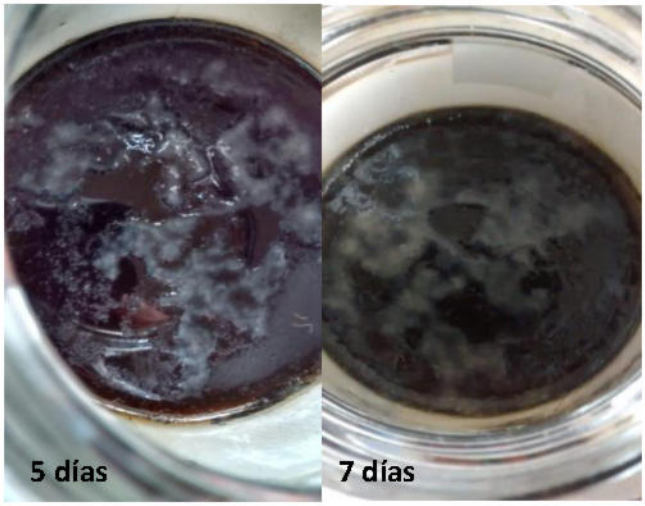


Figura 7: Inicio de la formación del disco de celulosa con crecimiento irregular en la superficie al quinto día de haber iniciado la fermentación (izquierda) y más homogéneo luego de 7 días (derecha).

A partir del décimo día de fermentación, el disco se apreció homogéneo en su totalidad cubriendo completamente la superficie del recipiente de cultivo y mostrando un espesor aceptable que permitió su manipulación (Figura 8).

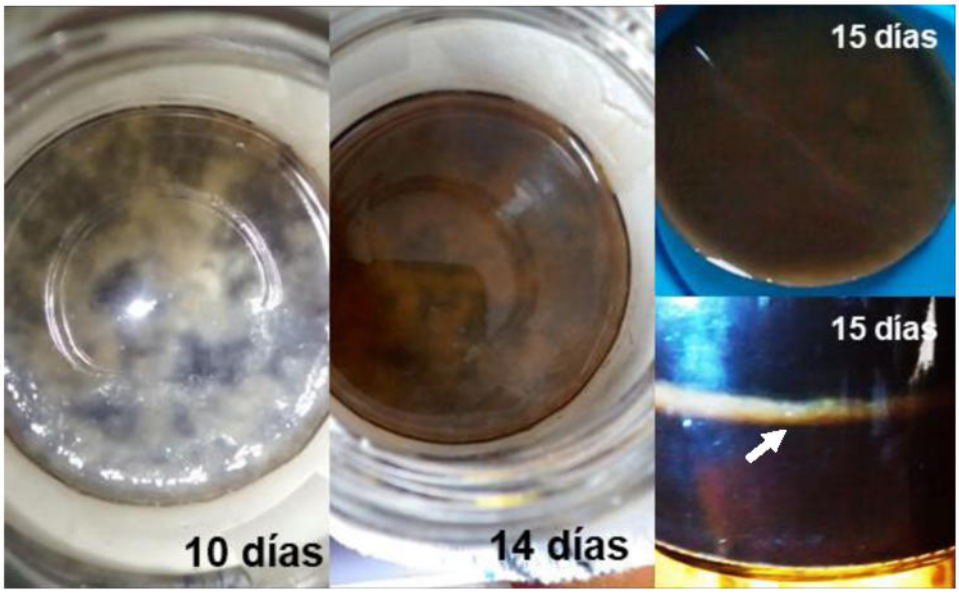


Figura 8: *Biofilm* de kombucha homogéneo completando la superficie del recipiente de cultivo y sin irregularidades luego de 10, 14 y 15 días de fermentación. Espesor señalado con una flecha luego de 15 días de fermentación.

Cultivos de kombucha estáticos y con aireación forzada

La producción de celulosa microbiana está afectada por la disponibilidad de oxígeno en los cultivos. Por ello, a partir de los discos obtenidos en la fermentación inicial, se procedió a analizar la obtención de *biofilms* cultivando la kombucha en dos condiciones de aireación diferentes. Se realizaron cultivos estáticos y cultivos agitados mediante aireación por burbujeo. Previo a la fermentación, y durante el proceso, en el líquido de cultivo se midieron periódicamente la temperatura, el pH, los grados Brix y la densidad. Asimismo, se evaluó el incremento de biomasa del film y su composición final.
En la Tabla 6 se presentan los valores de pH, el resultado de refractometría y la densidad del té azucarado empleado como sustrato de la fermentación y del cultivo iniciador (proveniente de la fermentación anterior).

Tabla 6: Variables fisicoquímicas del té negro azucarado y del cultivo iniciador empleado para iniciar la fermentación.

Variables fisicoquímicas	Té negro azucarado	Cultivo iniciador
pH	6	3
Reflectometría (° Brix)	21	22
Temperatura (°C)	12	10
Densidad (mg/ml)	1070	1090

Cuando se combinaron el té con el cultivo iniciador para generar el líquido en el que se realizó la fermentación se registró un valor de pH de 5.

Habitualmente, la bebida kombucha se obtiene mediante la fermentación en recipientes abiertos y sin agitación. En este trabajo se utilizó esta modalidad tradicional de cultivo para obtener *biofilms* y se la denominó cultivo estático. Para el desarrollo de la fermentación en cultivos estáticos, una pieza de un disco de kombucha de 2 g se colocó en un frasco de 500 ml y 5 cm de diámetro, incluyendo como se indicó antes té negro azucarado recientemente preparado adicionado en un 10 % del volumen de un cultivo previo. Los frascos fueron mantenidos a temperatura ambiente, aproximadamente a 20 °C, durante todo el período evaluado. En los frascos se observó el desarrollo de *biofilms* homogéneos que se ubicaron en la superficie del medio de cultivo. En la Figura 9 se muestran fotografías de los cultivos luego de 30 días de fermentación.

Figura 9: Desarrollo del *biofilm* de kombucha en cultivos estáticos luego de 30 días de fermentación.

Por otra parte, para favorecer una mayor disponibilidad de oxígeno y analizar la posibilidad de un mayor rendimiento en la producción del *biofilm* de kombucha, se realizó una modificación simple y fácil de implementar en los cultivos. Se utilizó un aireador que se hizo burbujear en el medio de fermentación como se muestra en la Figura 10. Estos cultivos se denominaron cultivos en agitación.

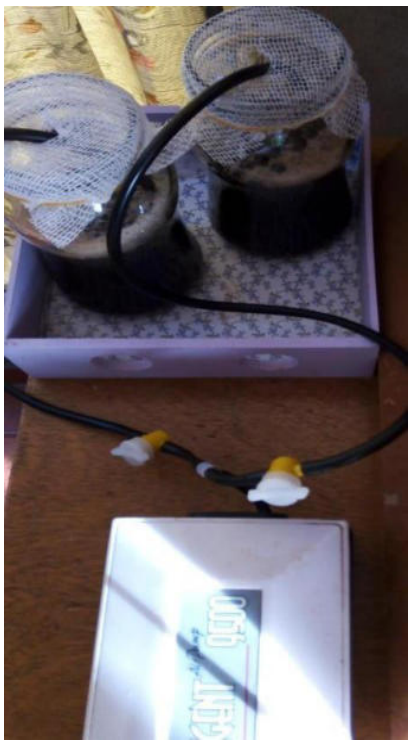


Figura 10: Cultivos de kombucha desarrollados con agitación por burbujeo.

A lo largo del proceso de fermentación en cultivos agitados se presentaron algunas dificultades en relación a la posibilidad de evaluar los *biofilms*. Las láminas obtenidas no presentaban la misma consistencia que las generadas en los cultivos estáticos,

dificultando su manipulación. La agitación también promovió la evaporación, con lo cual se afectaron algunos parámetros por concentración de los solutos presentes en el medio.

Densidad, Refractometría y pH de la bebida fermentada

Durante las fermentaciones, en los cultivos se evaluaron densidad, refractometría y pH en función del tiempo. Para relacionar los resultados de la evaluación con la concentración de sacarosa presente en los medios de cultivo, se efectuaron curvas de calibración midiendo tanto la densidad como los grados Brix, obtenidos en refractómetro, en soluciones té negro preparado con diferentes concentraciones de sacarosa. Los resultados y la linealización de los mismos se presentan en las Figuras 11 y 12 respectivamente.

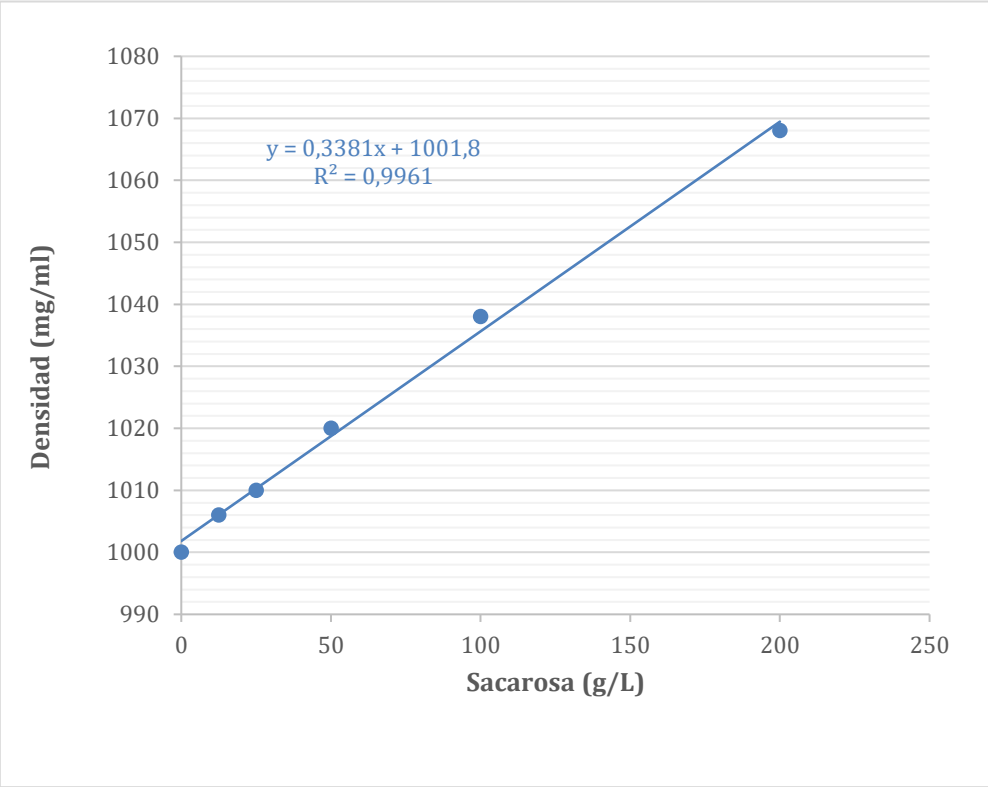


Figura 11: Densidad de soluciones de sacarosa en té en función de la concentración del disacárido y linealización de los datos experimentales.

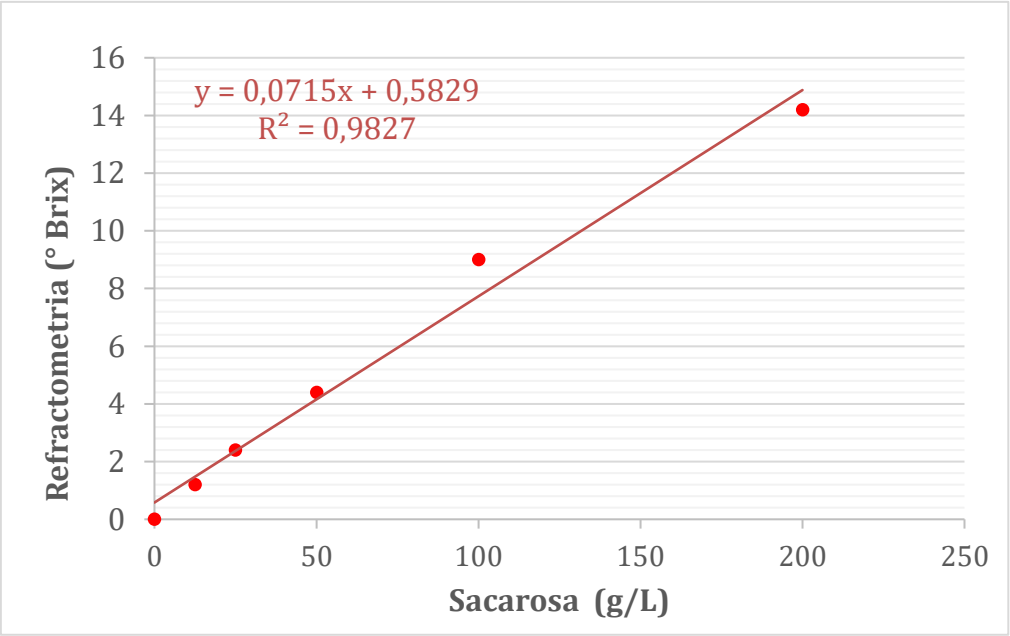


Figura 12: Refractometría (grados Brix) de soluciones de sacarosa en té en función de la concentración del disacárido y linealización de los datos experimentales.

De acuerdo a lo esperado, se observó que la densidad y los grados Brix de las soluciones de sacarosa en té, presentaron un comportamiento lineal como función de la concentración.

En la Figura 13 se presentan los resultados de refractometría correspondientes a los cultivos estáticos y con agitación, obtenidos en función del tiempo de fermentación.

La refractometría es la medida, en grados Brix, del índice de refracción de la luz en una solución y se vincula al contenido de sólidos presente en la misma. Un grado Brix equivale a 1 g de sacarosa cada 100 g. de solución.

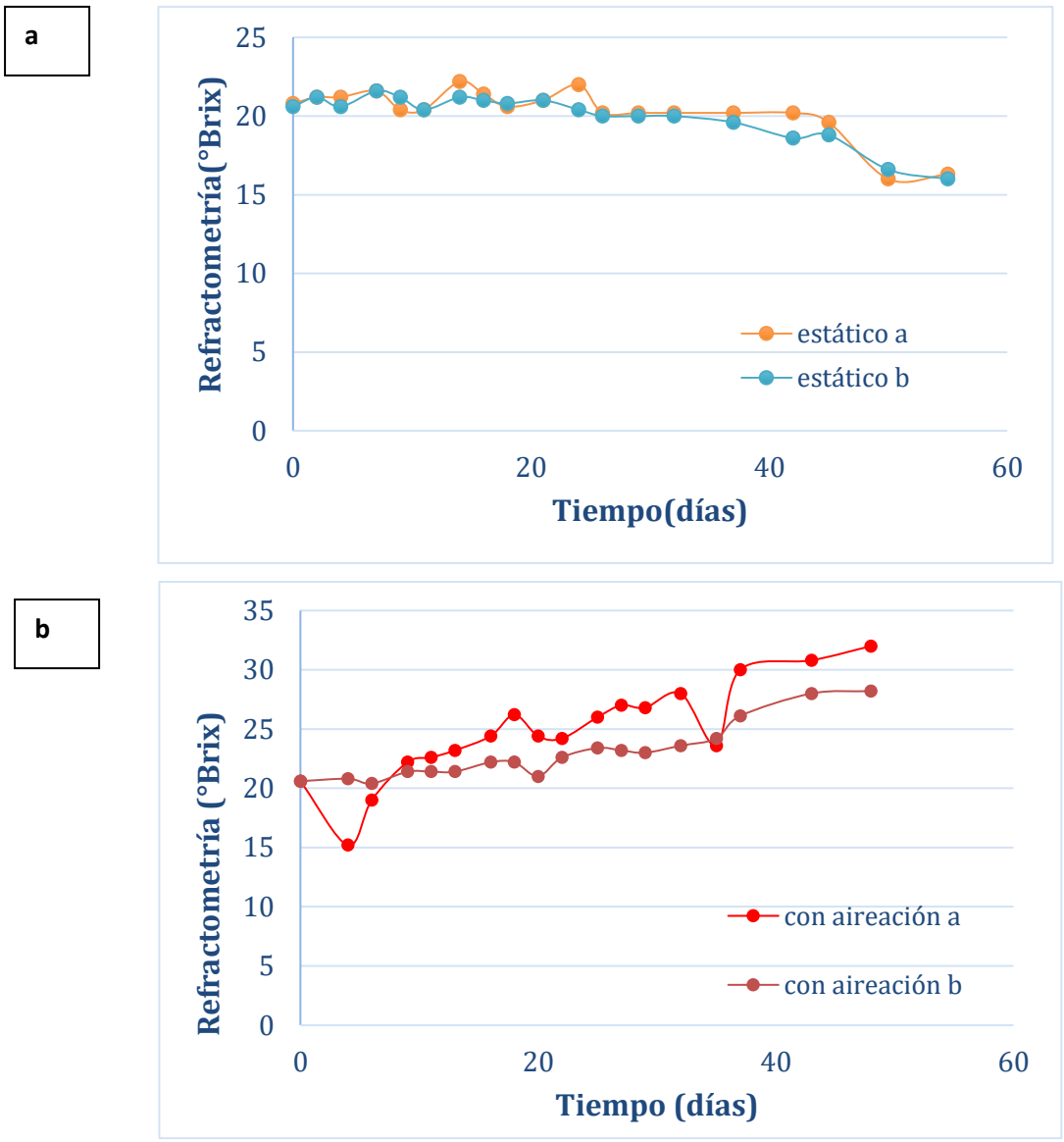


Figura 13: Refractometría (grados Brix) de cultivos estáticos (a) o en agitación (b) en función del tiempo de fermentación en días.

En los cultivos estáticos, la refractometría inició con valores cercanos a los 20 °Brix, acorde a la concentración inicial de sacarosa en medio de cultivo, y a lo largo de la fermentación se mantuvo prácticamente constante durante los primeros 30 días, para luego descender hasta 16 °Brix, al finalizar el período evaluado (Figura 13a). Este descenso de 4 °Brix concuerda con resultados previos (Jakubczyk y col., 2020). Estos autores evaluaron el sistema kombucha mediante refractometría a temperaturas de fermentación de 28 °C e indicaron descensos de 2,5 ° Brix (transición de 10 °Brix a 7,5 °Brix) luego de 14 días. El descenso indicaría la reducción de sacarosa en el medio como consecuencia de la fermentación. Durante los primeros 25 días de cultivo, en cuales la refractrometría se observó estable, la producción de metabolitos compensaría el

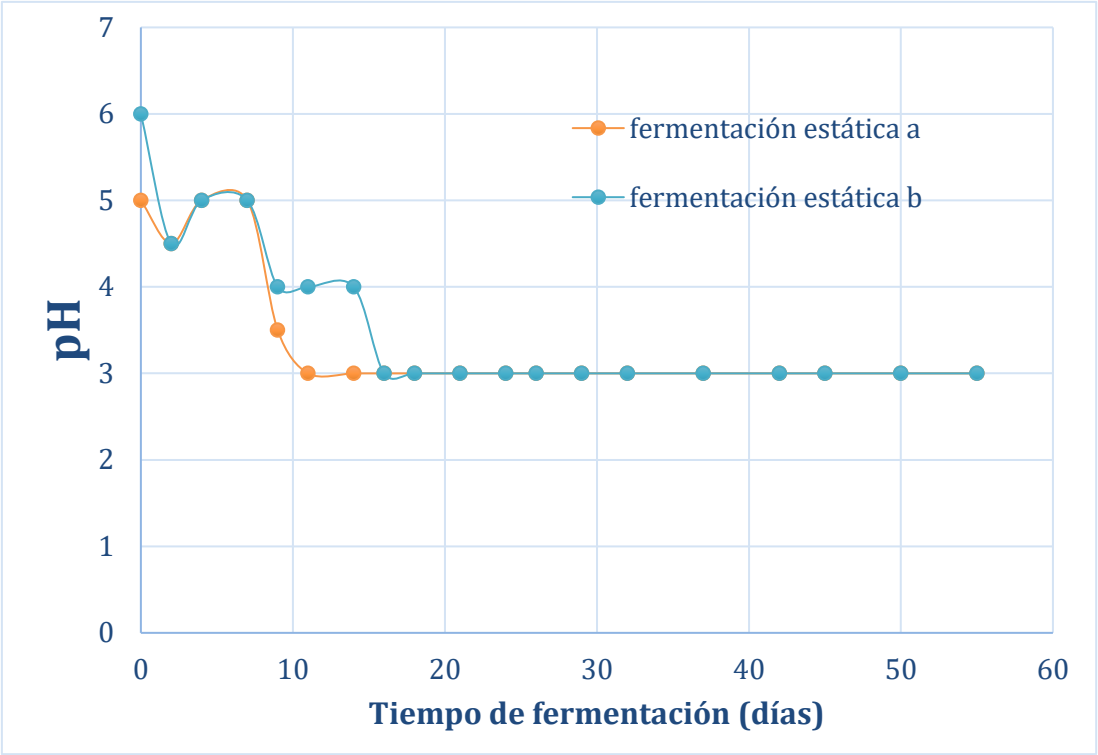
descenso de la medida de grados Brix generado por el descenso de sacarosa. Sin embargo, en etapas más avanzadas, después de 40 días, la generación (y evaporación) de moléculas volátiles no llega a compensar dicho descenso y en consecuencia se observa una disminución en las medidas de los grados Brix (Figura 13a)

Cuando los cultivos se realizaron en agitación, no se observó el mismo comportamiento (Figura 13b). La curva inicia como en los cultivos estáticos en 20 ° Brix y luego asciende incluso a valores que superan las posibilidades de medición del instrumento empleado. El movimiento de líquido provocado por la aireación promueve la pérdida de volumen por evaporación generado la concentración de la sacarosa y del resto de los solutos, interfiriendo en el resultado.

Se tomaron medidas de la densidad de los cultivos en condiciones estáticas y en agitación, al inicio y al final de la fermentación (las medidas en tiempos intermedios no pudieron tomarse dada la difícil manipulación de los *biofilms* en formación). La densidad inicial de los cultivos fue de 1080 ± 2 g/L, similar a la máxima medida de densidad de la Figura 11, ya que representa la densidad de un té azucarado conteniendo 200 g/L de sacarosa (sustrato que se utiliza para iniciar la fermentación). Si bien se esperaba que la densidad del té fermentado durante 60 días fuese menor (debido al consumo de la sacarosa por parte del consorcio de microrganismos presentes en el sistema kombucha), las medidas de densidad obtenidas al final de la fermentación fueron muy similares o incluso mayores, encontrando una densidad de 1072 ± 2 g/L para los cultivos estáticos y 1110 ± 2 g/L para los cultivos en agitación. La disminución de la densidad reportada en la bibliografía también es de valores bajos y similares a los hallados en este trabajo experimental: una disminución de 4 a 6 g/L para cultivos de kombucha en té verde o negro (Coton y col., 2017).

La densidad es una medida que permite estimar el consumo de azúcares y la producción de metabolitos como por ejemplo el etanol. Pero al no ser una medida directa, los valores incluyen también otros componentes que puedan estar en el líquido. De acuerdo a esto, es probable que las mediciones realizadas con el densímetro no reflejen solamente el consumo de sacarosa, habiendo otros metabolitos que estarían interfiriendo en las mediciones. Estos resultados están en concordancia con los valores de refractometría discutidos anteriormente.

Durante la fermentación, también se evaluó el pH en ambas condiciones de cultivo (Figura 14). Se observó un descenso del pH durante los primeros 15 días de evaluación. A partir del día 20 este parámetro se mantuvo estable en el valor de 3, sin mostrar diferencias significativas entre los cultivos estáticos y aquellos con aireación.



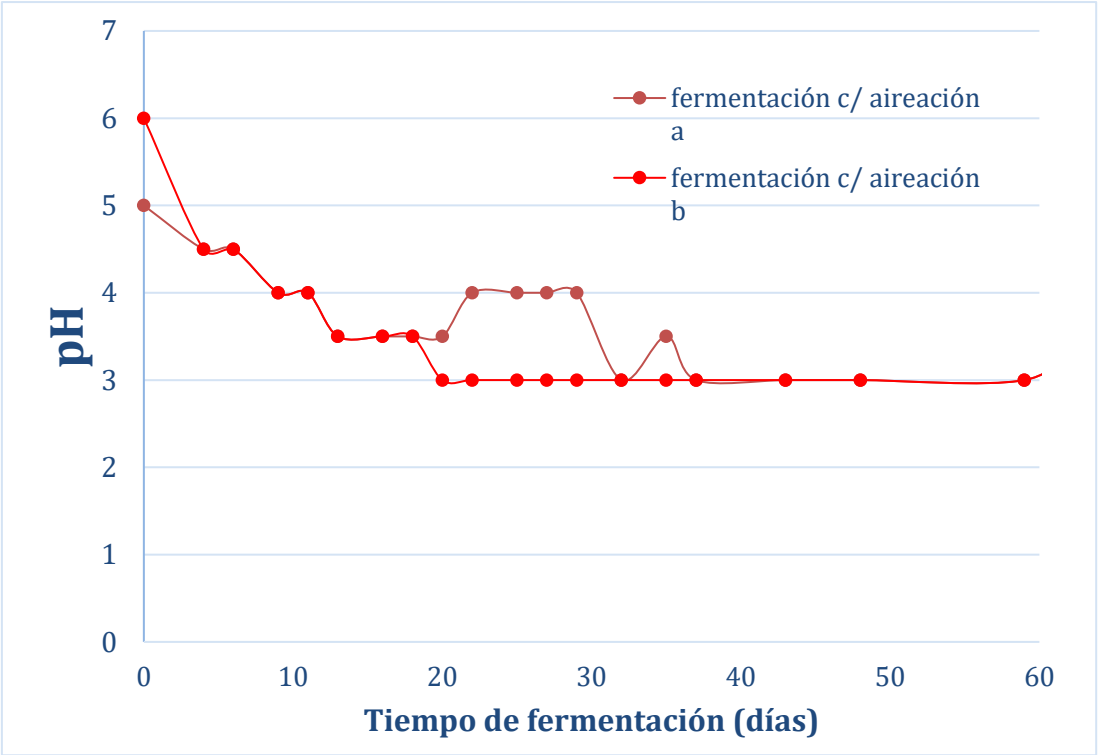


Figura 14: pH del medio líquido, en función del tiempo de fermentación (en días), correspondiente a los cultivos estáticos (a) y con aireación forzada (b).

El descenso de pH de los cultivos se debe a la generación de ácidos, entre los que se destaca el ácido acético. Este ácido que se produce como consecuencia de la fermentación acética (oxidación del etanol producido por las levaduras por parte de las acetobacterias) es el principal compuesto responsable de las características organolépticas de la bebida kombucha.

La presencia de ácido acético en los cultivos se confirmó mediante la evaluación por cromatografía gaseosa. En la Figura 15 se puede observar la curva de calibración realizada para cuantificar el contenido de ácido acético mediante esta metodología.

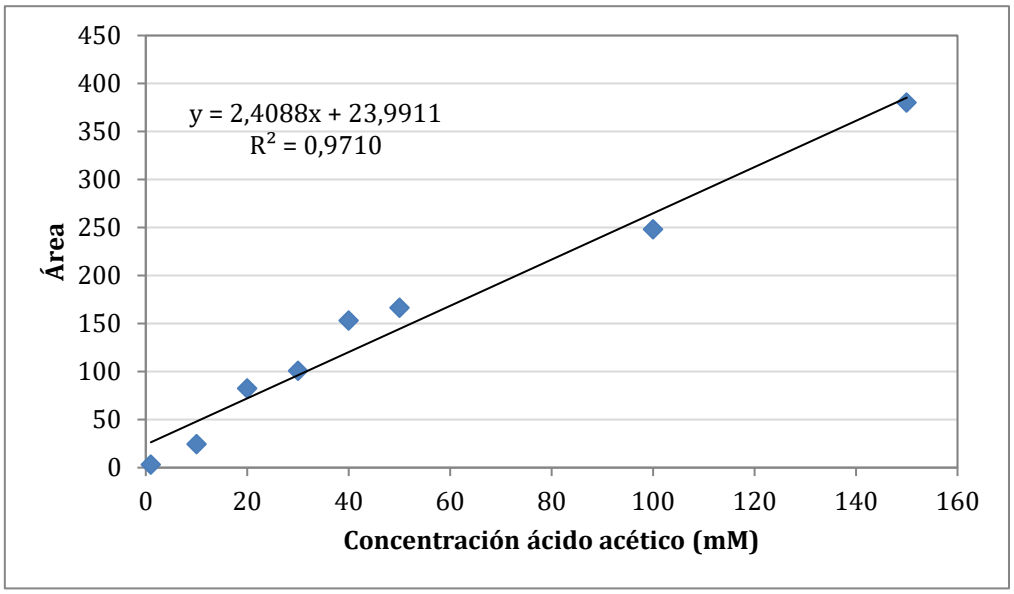


Figura 15: Curva de calibración de áreas de picos correspondientes a soluciones de ácido acético en función de la concentración (mM) de las mismas.

Los cromatogramas obtenidos luego de analizar las muestras presentaron un pico coincidente con el tiempo de retención del patrón de ácido acético utilizado (2.12 minutos). Para los cultivos estáticos (60 días de fermentación), el área bajo la curva (380 ± 20) se correspondió con una concentración de ácido acético de 150 mM. Estos valores están en concordancia con los hallados por otros autores (Chen y Liu, 2000; Jayabalan y col., 2014), quienes además hallaron que las máximas concentraciones de ácido acético se encuentran a los 30 días de fermentación, y que luego disminuyen, probablemente por el metabolismo bacteriano para la síntesis de ácidos glucónico y glucurónico (Villareal-Soto y col., 2018).

En los cultivos con agitación, los resultados correspondientes a la evaluación de ácido acético fueron hasta 10 veces mayores que los encontrados en los cultivos estáticos (áreas de pico 3439 ± 212), excediendo los valores de la curva de calibración. Estos valores tan elevados pueden deberse al incremento en la concentración del ácido, producto de la evaporación por el mismo tratamiento (aireación por burbujeo), o a una mayor actividad de las bacterias acido acéticas, aerobias, en condiciones de agitación.

Cabe destacar la presencia de picos adicionales en los cromatogramas, que podrían deberse a otros ácidos orgánicos presentes como glucónico, glucurónico, cítrico, L-láctico, málico, tartárico, malónico, oxálico, succínico, pirúvico (Jayabalan y col., 2014)

para los cuales no se corrieron los patrones para su identificación. La producción de estos ácidos en el medio, caracteriza la bioquímica de los microorganismos que participan en la generación de la bebida kombucha y contribuye al efecto protector frente a la posible contaminación ambiental de los cultivos.

Contenido de etanol en la bebida fermentada

Luego de transcurrido el tiempo de fermentación de 60 días se procedió a analizar la composición química de los *biofilms* obtenidos y el contenido de etanol de la bebida.
La determinación del contenido de etanol en los medios de fermentación de los cultivos estáticos y en agitación se realizó por cromatografía gaseosa. Inicialmente se realizó una calibración, utilizando soluciones de concentración conocida de etanol. En función de los resultados de evaluación de dichas soluciones (Tabla 7) y el ajuste a una ecuación lineal de los mismos se construyó la curva de calibración que se presenta en la Figura 16.

Tabla 7: Concentraciones de etanol, áreas de los picos correspondientes a etanol e isopropanol (estándar interno), y relación de áreas a partir de las cuales se obtuvo la curva de calibración para la cuantificación mediante cromatografía gaseosa.

Etanol (% v/v)	**Área correspondiente al pico de etanol (unidades arbitrarias)**	**Área correspondiente al pico de isopropanol (unidades arbitrarias)**	**Relación de áreas etanol/ isopropanol**
0	0	6,02	0
0	0	8,05	0
0,5	780,93	32,07	24,35
0,5	856,23	19,95	42,92
2,5	4755,85	26,04	182,64
2,5	4561,75	15,595	292,61
5	9834,67	20,34	483,51
5	8463,51	16,63	508,93
7,5	$1,06 \times 10^{4}$	19,6	540,82

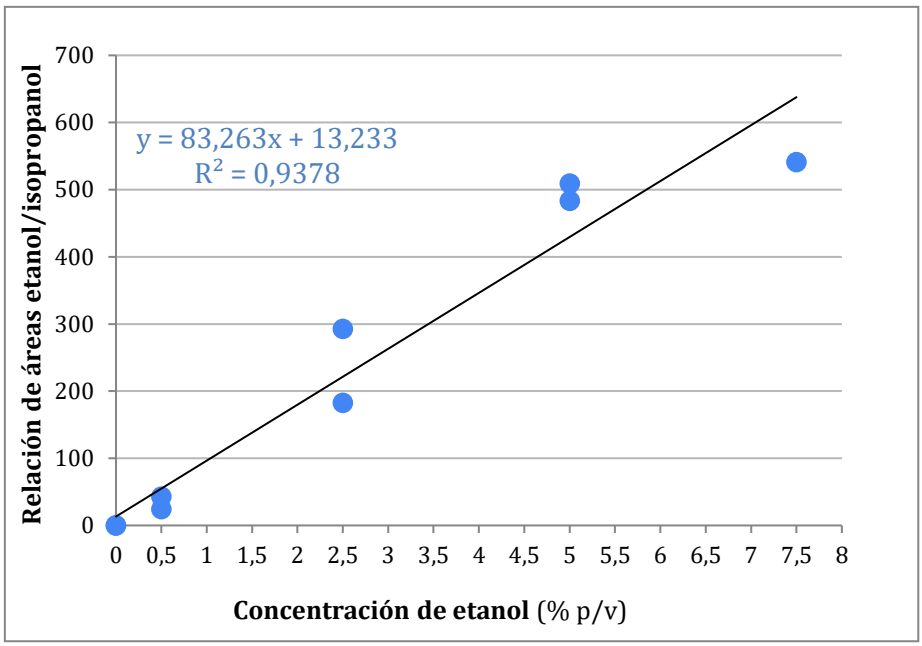


Figura 16: Curva de calibración de etanol obtenida a partir de la evaluación de la relación de áreas correspondientes a los picos obtenidos para etanol e isopropanol mediante cromatografía gaseosa.

A partir de los valores correspondientes a la relación de áreas de los picos de etanol e isopropanol, empleando la ecuación de la curva de calibración, se calculó el contenido de etanol (% v/v) en cada una de las muestras evaluadas. En el medio de fermentación correspondiente a los cultivos estáticos el contenido de etanol encontrado fue de 0,16 ± 0,08 % p/v mientras que en los cultivos con agitación el valor fue de 0,01 ± 0,01 % p/v. Los valores muestran una muy baja concentración de etanol en ambos medios de cultivo, incluso despreciable en los medios provenientes de cultivos en agitación. Los valores son bajos en relación a lo hallado en bibliografía (Jakubczyc y col., 2020). Sin embargo, se han evaluado períodos de fermentación muy largos y dado que las sucesivas fermentaciones del sistema kombucha oxidan el etanol convirtiéndolo en ácidos es posible que esa sea la causa de la escasa presencia del alcohol. Entre los ácidos producidos, el acético es el principal representante de dicha fermentación secundaria y su presencia ha sido evidenciada en los cultivos mediante el análisis cromatográfico.

Producción de *biofilms* en cultivos estáticos o con aireación forzada

El modo de cultivo afectó las características de los *biofilms* formados. En el medio de cultivo estático se observó un hidrogel de celulosa que adoptó la forma de la superficie del recipiente, adquiriendo el aspecto de disco como se esperaba (Figura 17a), de acuerdo a lo descripto por otros autores (Jayabalan y col., 2014, Villareal-Soto y col., 2018; Kim y Adhikari, 2020). Por otra parte, cuando el desarrollo se efectuó en medio de cultivo con aireación, la formación del *biofilm* resultó diferente, adquiriendo un aspecto amorfo o presentándose en agrupaciones (Figura 17b), de acuerdo con lo descripto por Schramm y Hestrin (1954) en relación a la morfología y también lo informado por Hornung y col. (2006).

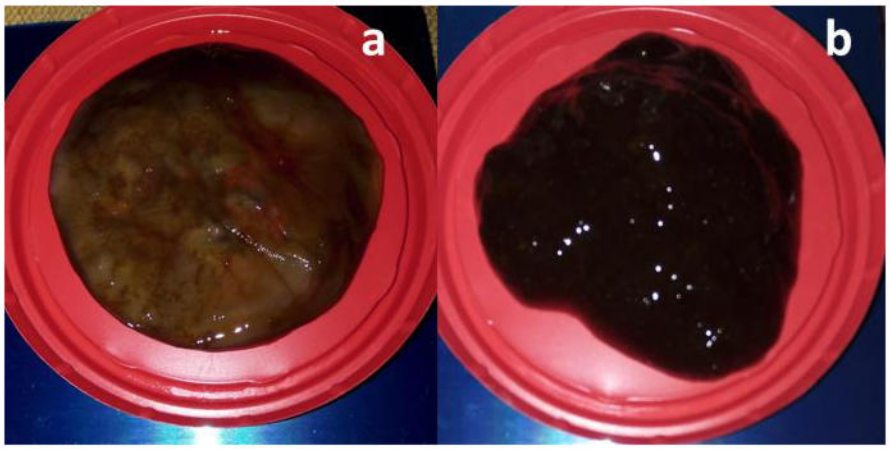


Figura 17: Fotografías de los *biofilms* de kombucha obtenidos en cultivos estáticos (izquierda) o con aireación (derecha).

Además de observar el aspecto, se analizó el aumento de masa de los *biofilms* (Figura 18). Luego de 60 días, en los cultivos estáticos, la masa de los *biofilms* triplicó la masa original. Cuando se empleó aireación, la producción de masa de *biofilm* fue considerablemente mayor, resultando casi 10 veces la masa original transcurrido igual período de fermentación. Asimismo, se pudo observar gran heterogeneidad en la producción de *biofilms* en los cultivos en los que se utilizó aireación.

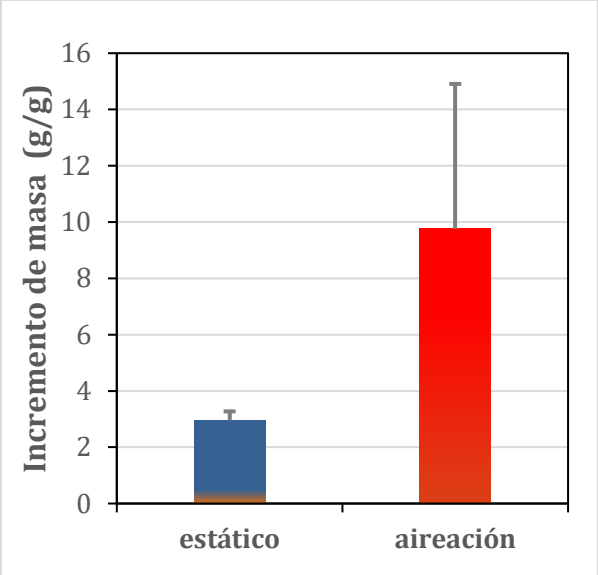


Figura 18: Incremento de masa de *biofims* de kombucha luego de 60 días de cultivo cuando la fermentación se realizó en medios estáticos (azul) o con aireación (rojo).

Análisis de la composición química de los biofilms

Como se indicó anteriormente concluido el período de fermentación se analizó la composición de los *biofilms* formados durante tal proceso.

a) Humedad

Se determinó la humedad de los discos mediante el método indirecto, colocando la muestra en estufa para provocar la salida de agua hasta peso constante (Figura 19).

Figura 19: *Biofilms* de kombucha secados hasta peso constante en estufa a 105 °C durante la determinación de humedad. Muestras provenientes de cultivos en agitación (izquierda) y de cultivos estáticos (derecha).

Se analizaron los *biofilms* obtenidos a partir de cultivos estáticos o en agitación luego de 60 días de fermentación. Los resultados se presentan en la Figura 20.

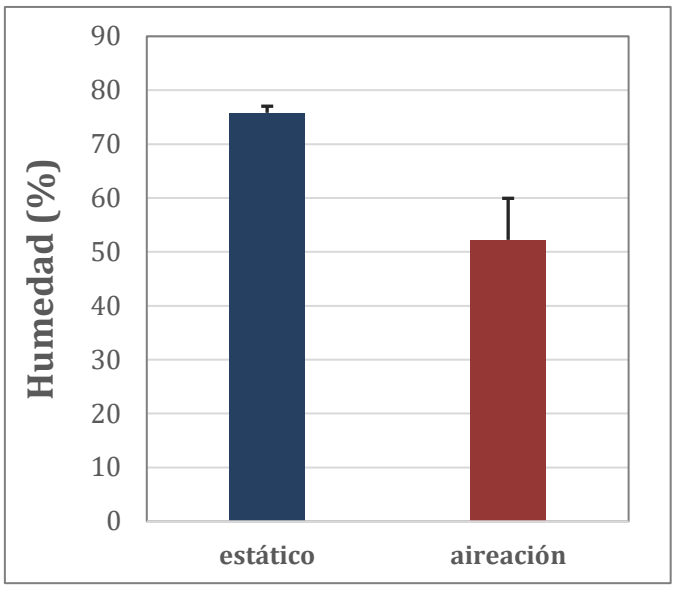


Figura 20: Humedad de los *biofilms* de kombucha provenientes de cultivos estáticos (azul) y de cultivos en agitación (naranja).

El contenido de agua de los *biofilms* (humedad) provenientes de cultivos estáticos resultó de 75,80 ± 1,23 % p/p, siendo este valor mayor al descripto en la bibliografía (Lescano Jimenez, 2015) pero en concordancia con la variación que podría observarse en la capacidad de la celulosa, principal constituyente de la matriz de los discos, de retener gran cantidad de agua y darle la característica de un hidrogel.

Cuando se analizaron las matrices provenientes de los cultivos sometidos a agitación mediante aireación se obtuvo un valor de contenido de agua menor (52,23 ± 7,71 % p/p), coincidiendo este valor con los registros bibliográficos (Lescano Jimenez, 2015). Sin embargo, las muestras provenientes de los cultivos en agitación estaban impregnadas en una mayor concentración de sacarosa, producto de la evaporación del medio. Aunque las matrices fueron lavadas, no se pudo garantizar que la presencia del disacárido no interfiera con la eliminación de la totalidad de agua. En el momento de la evaluación no fue posible contar con una estufa de secado con bomba para efectuar vacío, trabajar a menores temperaturas y asegurar la salida completa de agua de las muestras; pudiendo existir errores por defecto.

b) ***Determinación de cenizas***

Se evaluaron las cenizas, producto de la calcinación de las muestras de *biofilms* provenientes de ambas formas de cultivo, estático y en agitación. En la Figura 21 se pueden observar las cápsulas de porcelana conteniendo las muestras durante el proceso de obtención de las cenizas.

Figura 21: Muestras de *biofilms* de celulosa incineradas en mechero para luego ser llevadas a la mufla durante la determinación de cenizas.

A partir de las masas de las cenizas obtenidas y las de las muestras de partida se calculó el porcentaje de cenizas de los *biofilms* producidos en cada una de las formas de cultivo evaluadas. Los valores correspondientes a los *biofilms* provenientes de cultivos estáticos o con aireación resultaron 0,31 ± 0,08 % p/p y 0,23 ± 0,07 % p/p respectivamente, coincidiendo con lo descripto por otros autores (Lescano Jimenez, 2015).

c) Determinación de proteínas en los biofilms por el método de Kjeldahl

El empleo del método de Kjeldahl permitió determinar el contenido de proteínas de los *biofilms* a partir de una digestión ácida de las muestras (Figura 22), una posterior neutralización en medio básico y destilación en ácido bórico con un indicador de pH (Figura 23) y, finalmente, una titulación con ácido sulfúrico (Figura 24).

Figura 22: Etapa de digestión de muestras y control o blanco, durante la determinación de proteínas mediante el método de Kjeldahl. Se puede apreciar el humo blanco (SO_2) y la carbonización en los balones de la izquierda y en el de la derecha la finalización de la digestión con el color verde- azulado.

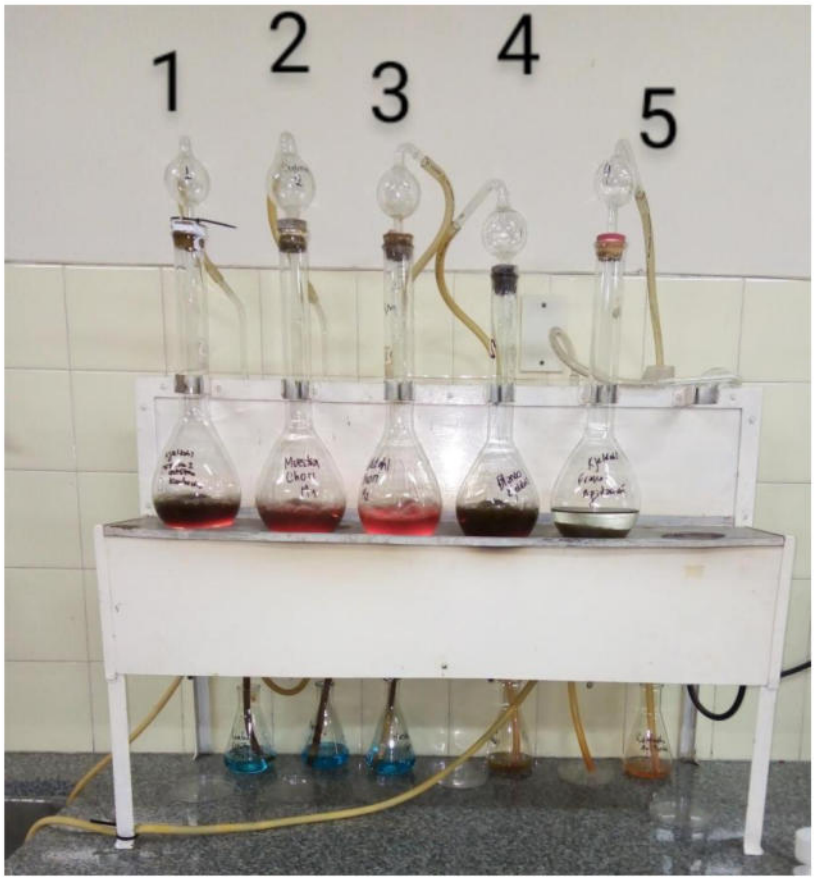


Figura 23: Etapa de destilación durante la determinación de proteínas mediante el método de Kjeldahl. En algunos balones se puede observar la presencia de precipitados durante el proceso. En la parte inferior del equipo se puede ver el destilado recolectado en Erlenmeyers, que en algunos casos ya produjo el viraje del indicador de rojo a azul.

Figura 24: Aspecto de los Erlenmeyers en los que se recolectó el amoníaco destilado, antes (derecha-coloración azul) o una vez concluida la titulación (izquierda- coloración rojiza); durante la tercera etapa de determinación de proteínas por el método de Kjeldahl.

De acuerdo a los resultados el contenido de proteínas de los *biofilms* provenientes de cultivos estáticos resultó de 0,47 ± 0,15 % mientras que el valor correspondiente a las matrices obtenidas en cultivos con agitación de 0,89 ± 0,38 %. Estos valores son menores a los descriptos por otros autores (Jayabalan y col. 2010; Lescano Jimenez, 2015).

*d) **Determinación de hidratos de carbono en los biofilms***

Para determinar el contenido de hidratos de carbono presentes en los *biofilms* provenientes de cultivos estáticos o con agitación se empleó el método de la antrona. Se procedió primeramente a lavar las matrices obtenidas en agua destilada y efectuar una hidrólisis. Aunque la metodología utilizada provoca la hidrólisis durante la misma determinación por llevarse a cabo en medio ácido concentrado y con un tratamiento térmico, la presencia de celulosa en el material a evaluar obliga a realizar una hidrólisis previa en HCl 3 M que asegura la completa determinación del polisacárido.

La curva de calibración se efectuó a partir de soluciones de glucosa de concentración conocida que se procesaron simultáneamente con las muestras (Tabla 8). A partir de los resultados de la aplicación de la metodología a dichas soluciones se obtuvo la curva de calibración que se presenta en la Figura 25.

Tabla 8: Absorbancia de las soluciones de glucosa correspondientes a la elaboración de la curva de calibración en la determinación de hidratos de carbono mediante el método de la antrona.

Concentración (µg/mL)	Absorbancia (620 nm)
0	0,096
0	0,069
100	0,163
100	0,197
200	0,213
200	0,244
300	0,366
300	0,358
400	0,436
400	0,441
500	0,552
500	0,592

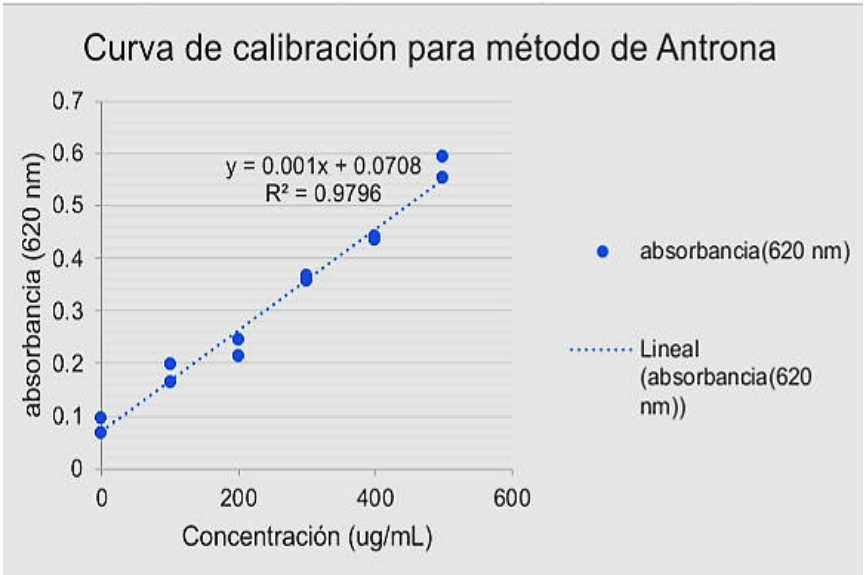


Figura 25: Curva de calibración (absorbancia vs concentración) obtenida a partir de la aplicación de la metodología de antrona a soluciones de concentración conocida de glucosa.

El contenido de hidratos de carbono totales de los *biofilms* obtenidos a partir de cultivos estáticos o en agitación resultó de 28.,6 ± 2,10 % p/p y 32,44 ± 1,21 % p/p, respectivamente, sin diferencias significativas entre ellos y coincidente con los valores hallados en bibliografía (Lescano Jimenez,2015).

A partir de los resultados para el contenido de agua, cenizas, proteínas e hidratos de carbono (Tabla 9), se estimó, por diferencia, el contenido lipídico de los biofilms. De acuerdo a los resultados, la cantidad presente es extremadamente baja, coincidiendo con la determinación de Jayabalan y col. (2010) y Lescano Jiménez (2015).

Tabla 9: Composición (humedad; cenizas; contenido de proteínas e hidratos de carbono) de *biofilms* de kombucha obtenidos a partir de la fermentación en medio de cultivo estático o con aireación.

Modo de cultivo	Contenido de macrocomponentes (% p/p)			
	Humedad	**Cenizas**	**Proteínas**	**Hidratos de carbono totales**
estático	75,8 ± 1,23	0,31 ± 0,08	0,47 ± 0,15	28.,6 ± 2,10
aireación	52,23 ± 7,71	0,23 ± 0,07	0,89 ± 0,38	32,44 ± 1,21

Aislamiento de cepas productoras de celulosa

Con el objetivo de aislar cepas productoras de celulosa se partió de un cultivo de kombucha de 14 días. Se inoculó medio de enriquecimiento (conteniendo glucosa, etanol, manitol, extracto de levadura, peptona y sorbato de potasio) con fragmentos de *biofilm* o con medio de cultivo. Luego de incubar los tubos durante 7 días, se realizaron estrías en medio sólido GEY-$CaCO_3$. Cuando se observó desarrollo, se procedió a picar con ansa las colonias que mostraban un halo de disolución del carbonato (sin opacidad) y se realizaron nuevas estrías en placas de medio GEY agarizado (Figura 25). Se conservaron 7 aislamientos que se denominaron Ka 1 a 7. Algunos de los aislamientos resultaron ser levaduras.

A partir de las colonias aisladas se realizaron la coloración de Gram y las pruebas de catalasa y oxidasa, preservando aquellos aislamientos que resultaron Gram variables, catalasa positiva, oxidasa negativa (Figura 26).

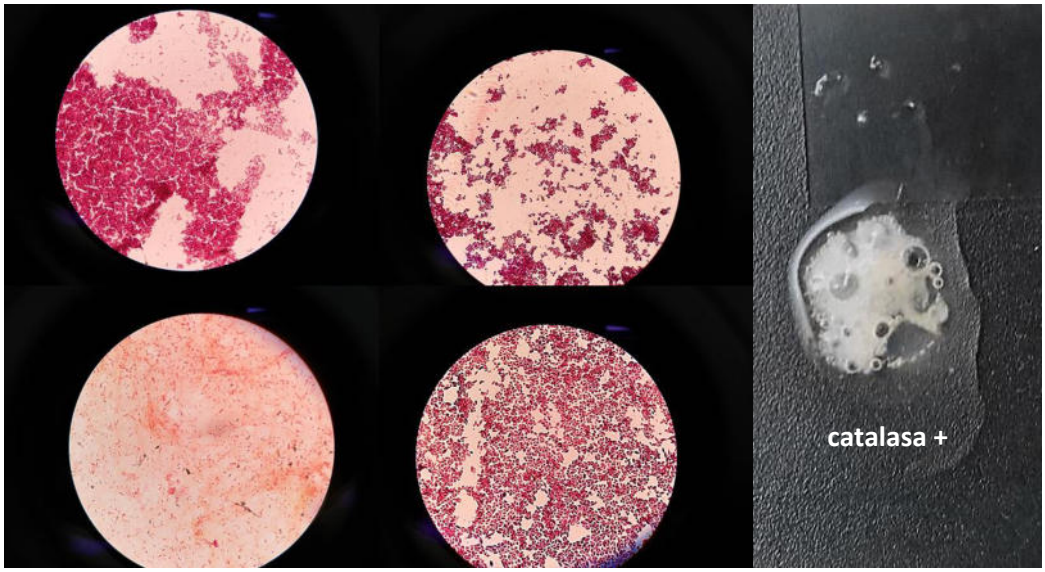


Figura 26: Micrografías correspondientes a la tinción de Gram de microorganismos aislados.

Se evaluó la producción de *biofilm* a partir de las cepas aisladas en tubo, en medio de cultivo GEY líquido, la cual se observó como un tapón de *biofilm* en la superficie (Figura 27).

Figura 27: Imagen del tapón de *biofilm* formado durante el crecimiento del aislado Ka5 en medio GEY líquido.

Los aislamientos denominados Ka4 y Ka5, cuyas características morfológicas y bioquímicas resultaron compatibles con la de bacterias ácido acéticas, y que además produjeron el *biofilm* en la superficie del tubo de ensayo cuando desarrollaron a partir de colonia aislada en medio líquido, fueron enviados para su secuenciación e identificación a la empresa Macrogen.

Identificación de cepas productoras de celulosa

De los aislamientos enviados para su secuenciación e identificación (Ka4 y Ka5) solo a uno de ellos pudo extraérsele ADN y secuenciarlo. Los resultados de secuenciación empleando el segmento presentado y la contrastación de dichas secuencias con bancos de datos genéticas indicaron que el microorganismo corresponde con un 99 % de homología a la especie *Komagataeibacter intermedius*. En la Figura 28 se muestra el dendrograma de similitud obtenido, donde la cepa aislada Ka5 se corresponde con la cepa de referencia *Komagataeibacter intermedius*.

Sequencing Primer Name Secuences	PCR Primer Name Secuences
785F 5' (GGA TTA GAT ACC CTG GTA) 3'	27F 5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3
907R 5' (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) 3'	1492R 5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct.(%)
NR_026435.1	Komagataeibacter intermedius	1481	15	1430	95	2610	0.0	1415/1416	99

Kingdom	Family	Genus	Species
Bacteria	Acetobacteraceae	Komagataeibacter	Komagataeibacter intermedius

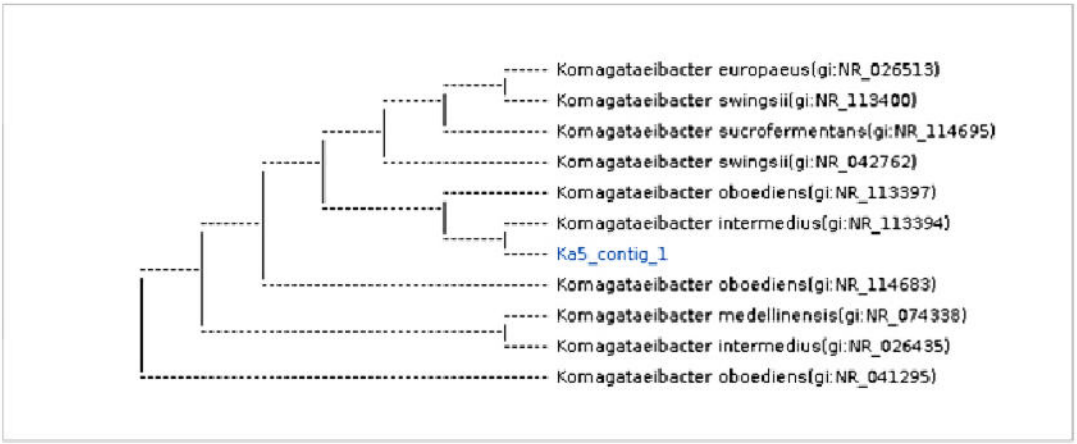


Figura 28: Secuencia de amplificación empleada y dendrograma de similitud obtenido para la secuencia proveniente de la cepa aislada Ka5 y su correspondencia con la cepa de referencia *Komagataeibacter intermedius*.

Conclusiones

En base a lo expuesto en el trabajo se puede concluir que:

- ✓ El sistema kombucha es un sistema adecuado para la obtención de celulosa bacteriana.
- ✓ Las condiciones de cultivo pueden modificarse de modo de maximizar la producción de celulosa.
- ✓ Se pudieron aislar bacterias productoras de celulosa capaces de sintetizar este polisacárido en cultivos aislados.
- ✓ Una de las cepas aisladas pudo identificarse y fue incorporada a la colección del laboratorio donde se realizaron las tareas experimentales, para continuar la investigación respecto a su producción de polisacárido y potencial empleo.

Referencias bibliográficas

- Bielecki, S., Krystynowicz, A., Turkiewicz, M., & Kalinowska, H. (2005). Bacterial cellulose. Capitulo 2 en: Polysaccharides and polyamides in the food industry: properties, production, and patents. Editores: Steinbüchel, A.; Rhee, S. , Editorial: Willey (Weinheim, Alemania). pp 31-84.

- Caicedo, L. A., Da França, F. P., & Lopez, L. (2001). Factores para el escalado del proceso de producción de celulosa por fermentación estática. *Revista Colombiana de Química*, *30* (2), 155-162.

- Carreño Pineda, L. D., Caicedo Mesa, L. A., & Martínez Riascos, C. A. (2012). Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión. *Ingeniería y ciencia*, *8* (16), 307-335.

- Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D., & Gachhui, R. (2016). Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International journal of food microbiology*, *220*, 63-72.

- Chávez-Pacheco, J. L., Yee, S. M., Zentella, M. C., & Marván, E. E. (2004). Celulosa bacteriana en *Gluconacetobacter xylinum*: biosíntesis y aplicaciones. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, *7*(1), 18-25.

- Chen, C., & Liu, B. Y. (2000). Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *Journal of applied microbiology*, *89*(5), 834-839.

- Chu, S. C., & Chen, C. (2006). Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chemistry*, *98*(3), 502-507.

- Coton, M., Pawtowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloumme-Labarthe, L., Fall, A., Daube, G., & Coton, E. (2017). Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. FEMS Microbiology Ecology, 93 (5).

- De Filippis, F., Troise, A. D., Vitaglione, P., & Ercolini, D. (2018). Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. *Food microbiology*, *73*, 11-16.

- Dos Santos, R. A. C., Berretta, A. A., Barud, H. D. S., Ribeiro, S. J. L., González-García, L. N., Zucchi, T. D., & Riaño-Pachón, D. M. (2015). Draft genome sequence of Komagataeibacter intermedius strain AF2, a producer of cellulose, isolated from Kombucha tea. *Genome Announcements*, *3*(6), e01404-15.

- Gromet, Z., Schramm, M., & Hestrin, S. (1957). Synthesis of cellulose by Acetobacter xylinum. 4. Enzyme systems present in a crude extract of glucose-grown cells. *Biochemical Journal*, *67*(4), 679.

- Hornung, M., Ludwig, M., Gerrard, A. M., & Schmauder, H. P. (2006). Optimizing the production of bacterial cellulose in surface culture: Evaluation of substrate mass transfer influences on the bioreaction (Part 1). *Engineering in Life Sciences*, *6*(6), 537-545.

- Jakubczyk, K. J. P., Piotrowska, G., & Janda, K. (2020). Characteristics and biochemical composition of kombucha–fermented tea. Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu, 26(2), 94-96.

- Jayabalan, R., Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., & Sathishkumar, M. (2014). A review on kombucha tea—microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, *13*(4), 538-550.

- Jayabalan, R., Malini, K., Sathishkumar, M., Swaminathan, K., & Yun, S. E. (2010). Biochemical characteristics of tea fungus produced during kombucha fermentation. *Food Science and Biotechnology*, 19(3), 843-847.

- Jayabalan, R., Marimuthu, S., & Swaminathan, K. (2007). Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*, *102*(1), 392-398.

- Keshk, S. M., & Sameshima, K. (2005). Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production. *African Journal of Biotechnology*, *4*(6), 478-482.

- Kim, Y. J., Kim, J. N., Wee, Y. J., Park, D. H., & Ryu, H. W. (2007). Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter sp*. PKY5 in a rotary biofilm contactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology,* 137(1), 529-537.

- Kim, J., & Adhikari, K. (2020). Current trends in kombucha: Marketing perspectives and the need for improved sensory research. *Beverages, 6*(1), 15.

- Lee, K. R., Jo, K., Ra, K. S., Suh, H. J., & Hong, K. B. (2021). Kombucha fermentation using commercial kombucha pellicle and culture broth as starter. *Food Science and Technology*.

- Lee, K. Y., Buldum, G., Mantalaris, A., & Bismarck, A. (2014). More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. *Macromolecular bioscience*, *14*(1), 10-32.

- Lescano Jiménez, A. D. (2015). Características Físico-Químicas y Capacidad Antioxidante De "Kombucha". Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional de Trujillo, Perú. https://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/8783

- Lončar, E., Djurić, M., Malbaša, R., Kolarov, L. J., & Klašnja, M. (2006). Influence of working conditions upon kombucha conducted fermentation of black tea. *Food and Bioproducts Processing*, *84*(3), 186-192.

- Machado, R. T., Gutierrez, J., Tercjak, A., Trovatti, E., Uahib, F. G., de Padua Moreno, G., & Barud, H. S. (2016). Komagataeibacter rhaeticus as an alternative bacteria for cellulose production. *Carbohydrate polymers*, *152*, 841-849.

- May, A., Narayanan, S., Alcock, J., Varsani, A., Maley, C., & Aktipis, A. (2019). Kombucha: a novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem. *PeerJ*, *7*, e7565.

- Neffe-Skocińska, K., Sionek, B., Ścibisz, I., & Kołożyn-Krajewska, D. (2017). Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. *Cyta-journal of food*, *15*(4), 601-607.

- Schramm, M., & Hestrin, S. (1954). Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of Acetobacter xylinum. *Microbiology*, *11*(1), 123-129.

- Semjonovs, P., Ruklisha, M., Paegle, L., Saka, M., Treimane, R., Skute, M., & Cleenwerck, I. (2017). Cellulose synthesis by *Komagataeibacter rhaeticus* strain P 1463 isolated from Kombucha. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *101*(3), 1003-1012.

- Sreeramulu, G., Zhu, Y., & Knol, W. (2000). Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(6), 2589-2594.

- Srihari, T., & Satyanarayana, U. (2012). Changes in free radical scavenging activity of kombucha during fermentation. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, *4*(11), 1978.

- Steensels, J., Daenen, L., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H., & Verstrepen, K. J. (2015). Brettanomyces yeasts—From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *International journal of food microbiology*, *206*, 24-38.

- Trček, J., Mira, N. P., & Jarboe, L. R. (2015). Adaptation and tolerance of bacteria against acetic acid. *Applied microbiology and biotechnology*, *99*(15), 6215-6229.

- Velasco-Bedran H, Lopez-Isunza F (2007) The unified metabolism of *Gluconacetobacter entanii* in continuous and batch processes. Proc Biochem 42:1180–1190

- Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J. P., & Taillandier, P. (2018). Understanding kombucha tea fermentation: a review. *Journal of food science*, *83*(3), 580-588.

- Watawana, M. I., Jayawardena, N., Gunawardhana, C. B., & Waisundara, V. Y. (2016). Enhancement of the antioxidant and starch hydrolase inhibitory activities of king coconut water (Cocos nucifera var. aurantiaca) by fermentation with kombucha 'tea fungus'. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(2), 490-498.

- Weinhouse, H., & Benziman, M. (1974). Regulation of hexose phosphate metabolism in Acetobacter xylinum. *Biochemical Journal*, *138*(3), 537-542.

- Yamada, Y., Yukphan, P., Vu, H. T. L., Muramatsu, Y., Ochaikul, D., Tanasupawat, S., & Nakagawa, Y. (2012). Description of Komagataeibacter gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae). *The Journal of general and applied microbiology*, *58*(5), 397-404.

Apéndice

Contaminaciones

La obtención de *biofilms* de kombucha se realizó en las condiciones indicadas en materiales y métodos. Si bien la producción de ácidos orgánicos por parte de este sistema, sumado a su bajo pH previene el desarrollo de contaminaciones, en algunos casos hongos ambientales pueden contaminar los cultivos. En la Figura se muestra un caso de contaminación por mohos observado durante el desarrollo del presente trabajo.

Figura 29: *Biofilm* de kombucha que presentó desarrollo de mohos al inicio de la fermentación por lo cual los cultivos fueron descartados.

Registro experimental de parámetros fisicoquímicos durante la fermentación correspondientes a los cultivos estáticos o con aireación forzada.

Tabla 10: Valores de parámetros fisicoquímicos del medio de cultivo inicial fermentación del sistema kombucha y del cultivo iniciador utilizado apra la generación de un nuevo cultivo.

Variable fisicoquímica	*Té negro azucarado*	*Cultivo iniciador*
pH	6	3
Refractometría (° Brix)	21	22
Temperatura (°C)	20°C	20°C
Densidad (mg/mL)	No evaluada	1090

<u>Registro experimental de las variables durante el desarrollo de los cultivos estáticos o con aireación forzada</u>

Cultivos estáticos:

	Día 4(previo a la contaminación)				Día 6(previo a la contaminación)				Día 0(nuevo cultivo)			
	pH	°B	T°	D	pH	°B	T°	D	pH	°B	T°	D
Frasco 1	4,5	19,8	12°C	N/M	4,5	20	14,5°C	N/M	5*	20,8*	16°C	1080
Frasco 2	4,5	18,8	11°C	N/M	5	21	15°C	N/M	6*	20,6*	16°C	1080

	Día 2				Día 4				Día 7			
	pH	°B	T°	D	pH	°B	T°	D	pH	°B	T°	D
Frasco 1	4,5	21,2	14°C	N/M	5	21,2	11°C	N/M	5	21,6	15°C	N/M
Frasco 2	4,5	21,2	14°C	N/M	5	20,6	11°C	N/M	5	21,6	15°C	N/M

	Día 9				Día 11			
	pH	°B	T°	D	pH	°B	T°	D
Frasco 1	3,5	20,4	17°C	N/M	3	20,4	17°C	N/M
Frasco 2	4	21,2	17°C	N/M	4	20,4	17°C	N/M

	Día 14				Día 16				Día 18			
	pH	°B	T°	D	pH	°B	T°	D	pH	°B	T°	D
Frasco 1	3	22,2	12°C		3	21,4	14°C		3	20,6	14°C	
Frasco 2	4	21,2	12°C		3	21	14°C		3	21,8	14°C	

	Día 21				Día 24				Día 26			
	pH	°B	T°	D	pH	°B	T°	D	pH	°B	T°	D
Frasco 1	3	21	14°C		3	22	15°C		3	20,1	17°C	
Frasco 2	3	21	14°C		3	20,2	15°C		3	20	17°C	

	Día 29				Día 32				Día 37			
	pH	°B	T°	D	pH	°B	T°	D	pH	°B	T°	D
Frasco 1	3	20,1	13°C		3	20,2	12°C		3	20,2	16°C	1080
Frasco 2	3	20	13°C		3	20	12°C		3	19,6	16°C	1074

	Día 42				Día 45				Día 50			
	pH	°B	T°	D	pH	°B	T°	D	pH	°B	T°	D
Frasco 1	3	20,2	12°C	1080	3	19,6	13,5°C	1074	3	16	17°C	1076
Frasco 2	3	18,6	12°C	1072	3	18,8	13,5°C	1072	3	16,6	17°C	1070

	Día 55			
	pH	°B	T°	D
Frasco 1	3	16,3	16°C	1072
Frasco 2	3	16	16°C	1070

Cultivos en agitación:

	Día 4				Día 6				Día 9			
	pH	°B	T°	D	pH	°B	T°	D	pH	°B	T°	D
Frasco 3	4,5	15,2	12°C	1080	4,5	19	15°C	N/M	4	22,2	14°C	N/M
Frasco 4	4,5	20,8	12°C	1080	4,5	20,4	15°C	N/M	4	21,4	14°C	N/M

	Día 11				Día 13				Día 16			
	pH	°B	T°	D	pH	°B	T°	D	pH	°B	T°	D
Frasco 3	4	22,6	16°C	N/M	3,5	23,2	11°C	N/M	3,5	24,4	12°C	N/M
Frasco 4	4	21,4	16°C	N/M	3,5	21,4	11°C	N/M	3,5	22,2	12°C	N/M

	Día 18				Día 20				Día 22			
	pH	°B	T°	D	pH	°B	T°	D	pH	°B	T°	D
Frasco 3	3,5	26,2	14°C	N/M	3,5	24,4	15°C	N/M	4	24,2	16°C	N/M
Frasco 4	3,5	22,2	14°C	N/M	3	21	16°C	N/M	3	22,6	17°C	N/M

	Día 25				Día 27				Día 29			
	pH	°B	T°	D	pH	°B	T°	D	pH	°B	T°	D
Frasco 3	4	26	15°C	N/M	4	27	14°C	N/M	4	26,8	13°C	N/M
Frasco 4	3	23,4	15°C	N/M	3	23,2	13,1°C	N/M	3	23	13°C	N/M

	Día 32				Día 35				Día 37			
	pH	°B	T°	D	pH	°B	T°	D	pH	°B	T°	D
Frasco 3	3	28	12°C	N/M	3,5	29	14°C	N/M	3	30	15°C	-
Frasco 4	3	23,6	12°C	N/M	3	24,2	14°C	N/M	3	26,1	15°C	-

	Día 43				Día 48			
	pH	°B	T°	D	pH	°B	T°	D
Frasco 3	3	30,8	11,5°C		3	>32	15°C	N/M
Frasco 4	3	28	11,5°C		3	28,2	15°C	N/M

	Día 59				Día 64			
	pH	°B	T°	D	pH	°B	T°	D
Frasco 3	4	>32	13°C	-	3,5	>32	16°C	N/M
Frasco 4	3	-	13°C	-	3	30	16°C	N/M

	Día 69			
	pH	°B	T°	D
Frasco 3	3,5	>32	15°C	1110
Frasco 4	3	31,4	16°C	1110

Referencias:
°B = grados Brix, medida de refractometría
D= densidad
N/M = dato no medido
*Medida inicial del nuevo cultivo estático

Registro del Incremento de masa de los biofilms:

En todos los cultivos se partió de una masa de biofilm de 2 g

Frasco 1: estático

A) 9,20 gramos día 37
B) 8,75 gramos d42
C) 8,78 gramos d45
D) 8,69 gramos d50
E) 8,36 gramos d55

Frasco 2: estático

A) 6,86 gramos – día 37
B) 6,97 gramos 42
C) 7,17 gramos d45
D) 7,25 gramos d50
E) 7,45 gramos d55

Frasco 3: aireación – día 60
28,80 gramos
Frasco 4: aireación – día 60
14,23 gramos

*Nota: la masa de los cultivos en aireación pudo registrarse al último día debido a la dificultad de la manipulación de la celulosa amorfa.

Resultados de la determinación del contenido de etanol en los medios de cultivo

Tabla 11: Datos de las áreas y relación de áreas de cada una de las muestras líquidas de los cultivos estáticos y en agitación obtenidos de la cromatografía gaseosa.

Muestras analizadas de kombucha	Área de etanol (unidades arbitrarias)	Área isopropanol (unidades arbitrarias)	Relación de áreas etanol/ isopropanol
Frasco 1, estático	1015,97	75,26	13,49
Frasco 1, estático (duplicado)	1152,87	51,49	22,39
Frasco 2, estático	1315,97	38,79	33,92
Frasco 2, estático (duplicado)	1086,95	47,39	22,94
Frasco 3, en agitación	48,65	17,10	2,84
Frasco 3, en agitación (duplicado)	47,65	8,58	5,55
Frasco 4, en agitación	58,86	12,75	4,62
Frasco 4, en agitación (duplicado)	44,54	14,41	3,09

Tabla 12: Contenido de etanol en cada una de las muestras analizadas obtenido a partir de la utilización la relación de áreas correspondientes a picos de etanol e isopropanol y la curva de calibración.

Muestra	Concentración de etanol (% v/v)
Muestra de frasco 1	0,00309
Muestra de frasco 1- duplicado	0,11
Muestra de frasco 2	0,25
Muestra de frasco 2- duplicado	0,12
Muestra de frasco 3	0,01
Muestra de frasco 3-duplicado	0,00
Muestra de frasco 4	0,02
Muestra de frasco 4 - duplicado	0,01

Composición de los biofilms

Determinación de contenido de agua (Humedad)

Tabla 13: Datos de los pesos obtenidos en la determinación de humedad y valores correspondientes a cada una de las muestras.

	Peso de caja de Petri + muestra húmeda	**Peso de caja de Petri + muestra seca**	**Peso de muestra húmeda**	**Pérdida de agua de la muestra**	**Humedad (% p/p)**
Muestra de frasco 1, A (estático)	53,3416 g	52,8654 g	0,6409 g	0,4762 g	74,302 %
Muestra de frasco 1, B (Estático)	20,9882 g	20,6281 g	0,4746 g	0,3601 g	75,874 %
Muestra de frasco 2A (estático)	19,1025 g	18,6763 g	0,5629 g	0,4262 g	75,715 %
Muestra de frasco 2B (estático)	13,319 g	12,8386 g	0,6219 g	0,4804 g	77,247 %
Muestra de frasco 3A (agitación)	15,3379 g	14, 3634 g	2, 0698 g	0,9745 g	47,082 %
Muestra de frasco 3B (agitación)	19,5472 g	18,7893 g	1, 7160 g	0,7579 g	44,162 %
Muestra de frasco 4A (agitación)	21,4884 g	19,4500 g	3, 5150 g	2,0384 g	57, 991 %
Muestra de frasco 4B (agitación)	23,1579 g	22,0387 g	1,8768 g	1,1192 g	59,633 %

Determinación del contenido de cenizas

Tabla 14: Datos experimentales de los pesos obtenidos en la determinación de cenizas y el porcentaje final de las mismas para cada una de las muestras.

	Peso de cápsula vacía	Peso de muestra	Peso de cápsula con muestra luego de la mufla	Porcentaje de cenizas
Muestra de frasco 1 - estático	29,0356 g	0,3835 g	29,0370 g	0,365 %
Muestra de frasco 2- estático	25,4821 g	0,6487 g	25,4837 g	0,247 %
Muestra de frasco 3- agitación	26, 9493 g	1,1579 g	26,9513 g	0,173 %
Muestra de frasco 4- agitación	28, 8302 g	0,7913 g	28,8324 g	0,278 %

Cálculos para determinar el porcentaje de hidratos de carbono de cada muestra

Tabla 15: Valores de absorbancia en la en la metodología de la antrona efectuada sobre las muestras previamente hidrolizadas o sus diluciones, de discos de kombucha obtenidos en diferentes condiciones de cultivo.

Muestras	**Absorbancia (620 nm)**
Muestra estática (medida directa)	0,829
Muestra estática (medida directa duplicado)	0,912
Muestra estática 1/10	0,117
Muestra estática 1/10 duplicado	0,153
Muestra de cultivo en agitación (medida directa)	0,830
Muestra de cultivo en agitación (medida directa duplicado)	0,835
Muestra de cultivo en agitación 1/10	0,152
Muestra de cultivo en agitación (1/10	0,168

Tabla 16: Concentraciones en µg/mL de azúcares totales para cada una de las muestras de biofilms de kombucha y sus duplicados, y el promedio de las mismas.

Muestra estática (medida directa)	758,1 µg/mL	Promedio de concentración de muestras estáticas por medida directa: 799, 65 µg/mL
Muestra estática (medida directa duplicado)	841,2 µg/mL	
Muestra estática 1/10	46,2 µg/mL	Promedio de concentración de muestras estáticas 1/10: 64,2 µg/mL
Muestra estática 1/10 duplicado	82,2 µg/mL	
Muestra de cultivo en agitación (medida directa)	759,2 µg/mL	Promedio de concentración para muestras de cultivo en agitación por medida directa: 761,7 µg/mL
Muestra de cultivo en agitación (medida directa duplicado)	764,2 µg/mL	
Muestra de cultivo en agitación 1/10	81,2 µg/mL	Promedio de concentración para muestras de cultivo en agitación 1/10: 89,2 µg/mL
Muestra de cultivo en agitación (1/10 duplicado)	97,2 µg/mL	

Ejemplos de esquema de cálculo para muestras provenientes de cultivo estático diluidas 1/10:

Promedio de concentración: 64,2 µg/mL (se multiplica por 10 ya que se diluyó al décimo) -------> 642 µg/mL
Entonces:
En 1mL de solución de hidrólisis ----------642 µg de azúcares totales
500 ml de solución de hidrólisis----------x= 321000ug de azúcares totales
Si se tiene en cuenta que: 1ug= 1x10-6g entonces hay 0,321 gramos en la solución. Por lo tanto:
1,4 gramos de muestra de kombucha (medio estático) ----------0,321 g azúcares
100 gramos ----------x= 22,9g de azúcares

Ejemplos de esquema de cálculo para muestras provenientes de cultivo en agitación diluidas 1/10:

Promedio de concentración: 89,2 µg/ mL (se multiplica por 10) ---->892ug/mL
1mL de solución de hidrólisis---------892 µg de azúcares totales
500 mL de solución de hidrólisis-----x=446000ug, lo que equivale a 0,446 gramos
1,2 gramos de muestra de cultivo en agitación----------0,446 gramos de azúcares
100 gramos ----------x= 37,2 gramos de azúcares

Cálculos de la cuantificación de proteínas:

Volumen valorado en titulación de la muestra de frasco 1(estática) media: 2,1 mL
Volumen valorado de titulación de la muestra de frasco 3(agitación) media: 2,8 mL
Volumen valorado del blanco: 0,6 mL

Ácido sulfúrico 0,1042 N diluido al medio (0,0521 N)

Blanco(B):

0,05 equivalentes----------1000 mL de sc de H_2SO_4

$3x10^{-5}$ eq. = X ----------0,6 mL de H_2SO_4 gastados de bureta

Muestra estática(ME):

0,05 equivalentes ---------- 1000 mL de sc. de H_2SO_4

$1,05x\ 10^{-4}$ equiv= X.----------2,1 mL de H_2SO_4 gastados de bureta

ME-B= $7,5x10^{-5}$ equivalentes

1 eq. ----------14 g de Nitrógeno

$7,5x10^{-5}$----------X= $1,05x\ 10^{-3}$ g de Nitrógeno

1g de Nitrógeno----------6,25 g de proteínas

1,05x10-3g de N----------X= 6,5625x10-3 g de proteínas

1,3821 g de muestra estática----------$6,5625x10^{-3}$ g de proteínas

100 g de muestra estática----------X= 0,47 g de proteínas

Muestra en agitación (MA)

0,05 equivalentes----------1000mL de sc. de H2SO4

$1,4x10^{-4}$ eq.=X ----------2,8 mL de H2SO4 gastados de bureta

MA-B= $1,05x10^{-4}$ equivalentes

1eq.----------14 g de Nitrógeno

$1,05x10^{-4}$ eq.---------- x= $1,47x10^{-3}$ g de Nitrógeno

1g de N----------6,25g de proteínas

1,47x10-3 g de N ---------x= 9,1875x10-3 g de proteínas

1,0261 g de muestra de Kombucha en agitación----------9,1875x10-3 g de proteínas

100 g de muestra de Kombucha en agitación----------X= 0,89 g de proteínas