



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

Estudio de los compuestos volátiles responsables del aroma de diferentes kombuchas

Study of the volatile compounds responsible for the aroma of different kombuchas

Autor/es

Pablo Martínez Cortés

Director/es

Ana María Escudero Carra
Eva Tejedor Calvo

Facultad de Veterinaria

2024-2025

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. La kombucha, origen y proceso productivo	4
1.2. Kombucha elaborada a partir de sustratos alternativos	5
1.3. La importancia de las setas en la alimentación	5
1.4. El mercado de la kombucha	6
1.5. Aromas y técnicas usadas para su análisis	7
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS	10
3.1. Muestras	10
3.2. Patrones, reactivos y pequeño instrumental de laboratorio	10
3.3. Disoluciones	11
3.4. Análisis de aromas por cromatografía de gases (GC-FID)-Olfatometría	11
3.5. Identificación de compuestos mediante inyección de extracto líquido en cromatógrafo de gases con espectrometría de masas (GC-MS)	14
3.6. Análisis de compuestos volátiles mayoritarios	14
3.7. Análisis estadístico	16
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
4.1. Jerarquización mediante olfatometría de los compuestos responsables del aroma de 3 kombuchas experimentales	17
4.2. Reproducibilidad del análisis de compuestos volátiles mayoritarios en kombuchas comerciales	19
4.3. Seguimiento de los compuestos volátiles mayoritarios de kombuchas experimentales a lo largo de la fermentación	20
4.4. Cuantificación de volátiles en kombuchas comerciales y comparación con kombuchas experimentales	27
5. CONCLUSIONES	28
6. VALORACIÓN PERSONAL	29
7. BIBLIOGRAFÍA	30
ANEXO 1	33

RESUMEN

En la actualidad, el consumo de bebidas saludables, como la kombucha, ha experimentado un aumento considerable. Debido a esto, se ha experimentado con otros sustratos diferentes al té, como las setas, para producir estas bebidas con distintas propiedades. El objetivo principal de este trabajo fin de grado ha sido caracterizar químicamente el aroma de diferentes kombuchas elaboradas a partir de diversas setas. Para ello se utilizaron varias metodologías: microextracción en fase sólida seguida de cromatografía de gases-olfatometría para jerarquizar las zonas de olor, identificación de compuestos mediante inyección de extracto líquido en cromatógrafo de gases con espectrometría de masas y cuantificación de los compuestos mayoritarios del aroma mediante cromatografía de gases y detección de ionización de llama. Se han detectado 25 zonas de olor, 7 de ellas sin identificar el compuesto responsable y de las identificadas, siendo la familia de los ésteres la más abundante. Se han cuantificado 28 volátiles presentes en 6 kombuchas experimentales a lo largo de la fermentación, en 6 puntos desde 0 hasta 21 días. Destacan la presencia de varios ácidos, alcoholes y lactonas, aunque también se han detectado ésteres y cetonas. La familia química con mayor representación han sido los ácidos, siendo el ácido acético el volátil mayoritario en alguna kombucha. En cambio, en otras kombuchas ha sido la acetoína. La base del aroma de estas muestras está formada por compuestos de origen fermentativo, siendo los ésteres los que más diferencian entre muestras.

ABSTRACT

Currently, the consumption of healthy beverages, such as kombucha, has experienced a considerable increase. Because of this, attempts have been made to find alternative substrates other than tea, such as mushrooms, to produce these beverages. The main objective of this thesis has been to chemically characterize the aroma of different kombuchas made from various mushrooms. For that, several methodologies were used: solid-phase microextraction followed by gas chromatography-olfactometry to rank the odor zones, identification of compounds by injecting liquid extract into a gas chromatograph with mass spectrometry, and quantification of the major aroma compounds by gas chromatography and flame ionization detection. Twenty-five odor zones were detected, seven of which were not assigned to an identified compound, and among the identified, the ester family was the main detected. Twenty-eight volatiles were quantified in six experimental kombuchas throughout fermentation, at six points from 0 to 21 days. The presence of several acids, alcohols, and lactones stands out, although esters and ketones have also been detected. The chemical family with the highest levels was acids, with acetic acid being the main volatile in some kombuchas. In other kombuchas, the most present

volatile was acetoin. The basis of the aroma of these samples is formed by compounds of fermentative origin, with esters being the most discriminating compounds between samples.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La kombucha, origen y proceso productivo

Los productos fermentados han acompañado a la humanidad desde sus orígenes. Prueba de ello son las múltiples variantes de bebidas fermentadas desarrolladas alrededor del mundo, como por ejemplo la cerveza, el vino, el hidromiel y la kombucha. En el caso de la kombucha la hipótesis más aceptada para su origen es que surgió en el noroeste de China, en la región de Manchuria, siendo conocidas sus propiedades desintoxicantes desde los orígenes de la bebida.

Esta bebida se prepara de forma tradicional a partir de té verde y/o negro, azúcar y un conjunto de bacterias y levaduras responsables de la fermentación, denominado “SCOBY”, por sus siglas en inglés (*Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeasts* o cultivo simbiótico de bacterias y levaduras, en español). Este cultivo se encuentra en una masa viscosa y está formado por: bacterias ácido-lácticas (BAL), bacterias ácido-acéticas (BAA) y levaduras de distintos géneros, como *Saccharomyces*, *Debaryomyces* y *Kluyveromyces* (Gaggia et al., 2018). La composición de estos *scooby* es variable y depende del inóculo utilizado, además de las condiciones de almacenamiento y fermentación. Es esta combinación de microorganismos, la responsable de producir tres tipos de fermentación: alcohólica, láctica y acética. Estas fermentaciones ocurren de forma espontánea y rápida debido al elevado número de microorganismos presentes en el *scooby* (Coton et al., 2017).

La composición química de una kombucha está influenciada por múltiples factores, siendo los más importantes: el sustrato utilizado y su concentración, el *scooby* empleado, el tiempo y la temperatura a la que se produce la fermentación y el pH del proceso. Cualquier cambio sobre estos parámetros influirá en la calidad del producto final, a nivel nutricional y sensorial (Emiljanowicz y Malinowska-Panczyk, 2019). Durante la fermentación se producen cambios en estos parámetros, siendo el más evidente el descenso en la cantidad de azúcar, sustrato principal de los microorganismos del *scooby*. Otros cambios notables, serían la producción de alcohol y ácido acético fruto de las fermentaciones alcohólica y acética. Las proteínas solubles y los compuestos fenólicos también pueden variar a lo largo de la fermentación, debido a la acción microbiana y al pH cambiante del medio (May et al., 2019).

La fermentación de la kombucha tiene lugar a unos 25 °C, y en un período comprendido entre los 7 y los 14 días. Tras la fermentación, se debe filtrar el producto para eliminar el *scooby* antes de ponerse a la venta. Para la comercialización de la kombucha, el pH debe estar comprendido entre 2,5 y 4,2 con el fin de evitar el crecimiento de otros microorganismos y la pérdida de calidad del producto (Ferreira de Miranda et al., 2022). También debe ser controlado el contenido en

alcohol, ya que, según la legislación vigente, las bebidas con un contenido mayor de 1,2% en volumen de alcohol son consideradas como bebidas alcohólicas (Reglamento nº 1169/2011 del Parlamento Europeo).

1.2. Kombucha elaborada a partir de sustratos alternativos

Como ya se ha comentado anteriormente, el sustrato tradicional para la fermentación de las kombuchas es el té. Sin embargo, en los últimos años se ha estudiado el uso de distintos sustratos para la elaboración de kombuchas, por ejemplo: frutas (de las Nieves Siles-Sánchez et al., 2024), café (Bueno et al., 2021), lácteos (Al-Dulaimi et al., 2018) y trufas (Morales et al., 2024). Las kombuchas resultantes de la fermentación de estos productos serán diferentes desde el punto de vista sensorial y con respecto a la concentración de moléculas bioactivas. Se estudia la reducción de los tiempos de fermentación y la mejora de la seguridad de las kombuchas desde el punto de vista microbiológico. También se ha evaluado el uso de aditivos regularmente usados en el té, como la canela, incrementando la actividad antioxidante y antimicrobiana (Emiljanowicz & Malinowska-Panczyk, 2019; Jingqian et al., 2023).

En el caso de este trabajo fin de grado se investigarán los compuestos volátiles responsables del aroma de diferentes kombuchas producidas utilizando como sustrato setas de consumo habitual en España.

1.3. La importancia de las setas en la alimentación

La especie humana ha consumido setas desde los albores de la civilización, cuando la población era cazadora-recolectora. Las setas son una fuente de alimentación sencilla de encontrar en la naturaleza a nivel mundial y proporcionaban nutrientes esenciales para aquellas primeras comunidades. Estos alimentos son ricos en proteínas, vitaminas, minerales (como el potasio) y aminoácidos esenciales; conteniendo también una ínfima cantidad de grasas y proporcionando poca energía (Cheung, 2010).

Aparte de los beneficios nutricionales, estos hongos proporcionan una gran cantidad de compuestos con impacto en la salud del consumidor. Se conocen funciones antitumorales, inmunomoduladoras, antioxidantes, reguladoras del colesterol, antidiabéticas, hepatoprotectoras y antibacterianas (Roncero-Ramos y Delgado-Andrade, 2017).

En los montes españoles y en el mercado existen 6 especies fácilmente localizables: champiñón común (*Agaricus bisporus*), seta de ostra (*Pleurotus ostreatus*), seta de cardo (*Pleurotus eryngii*), níscolo (*Lactarius deliciosus*), rebozuelo (*Cantharellus cibarius*) y boletus (*Boletus edulis*) (Figura 1).



Figura 1. Especies de setas utilizadas como sustrato para la elaboración de las kombuchas del estudio: A) Champiñón común; B) Seta de ostra; C) Seta de cardo, D) Níscalo; E) Rebozuelo; F) Boletus.

1.4. El mercado de la kombucha

El consumidor actual se preocupa por su salud y comprende a la perfección la relación entre dieta y salud. Es en este contexto en el que la kombucha se sitúa como una bebida saludable sin alcohol, disparando su popularidad debido a las propiedades asociadas a su consumo. Esta tendencia de consumo en auge también ha provocado el aumento de la investigación acerca de las propiedades funcionales de la kombucha en estudios *in vitro* y en animales, siendo estudiados los efectos positivos en el sistema inmunitario (propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, etc.). La apreciación sensorial por parte del consumidor también es importante, por lo que es el tema de este trabajo.

Concretamente en el mercado español, el aumento en las ventas y consumo de la kombucha ha sido exponencial. Entre los años 2020 y 2022, el sector de la kombucha pasó de facturar 3,1 millones de euros a facturar 21,1 millones de euros. Si nos centramos en la producción en litros, pasó de los 445.000 litros en 2020 a más de 2,8 millones de litros en 2022. En porcentaje, entre estos dos años estudiados el mercado de la kombucha creció un 574%. Las regiones de España con mayor cantidad de ventas de kombucha en el año 2022 fueron: Cataluña (5,3 millones de euros), Comunidad de Madrid (3,3 millones de euros) y Andalucía (2,3 millones de euros) (Prodeca, 2023). En los próximos años, se prevé que esta bebida se posicione en el mercado como un producto de valor añadido con un alto potencial de crecimiento en el sector de alimentos y bebidas.

1.5. Aromas y técnicas usadas para su análisis

Las características sensoriales de un producto están marcadas por percepciones sensoriales desde el punto de vista visual, olfativo, gustativo y táctil. Hay que destacar que todos estos procesos perceptuales están relacionados con especies químicas. Por eso, el olor de las kombuchas será el resultado directo de la presencia de moléculas volátiles con propiedades aromáticas (odorantes). Las diferentes familias de compuestos químicos que están presentes simultáneamente con aromas diversos influirán en la percepción final. Entre las familias químicas presentes, destacan alcoholes, ácidos, ésteres, aldehídos, terpenos, cetonas, fenoles, etc.

Puesto que todos los compuestos responsables del aroma deben ser volátiles, la técnica más adecuada para separar las moléculas activas del olor, del resto de moléculas es la cromatografía de gases-olfatometría (GC-O) (Ferreira, López y Cacho, 2000). Esta técnica hace uso de la nariz humana como detector para los compuestos que se eluyen de la columna cromatográfica.

La GC-O es el método analítico más apropiado para la determinación de los constituyentes individuales al aroma total de un producto, en este caso, la kombucha. Esta técnica cuenta con dos detectores simultáneos: portal olfativo y detector de ionización de llama (FID). Estos dos detectores nos posibilitan relacionar la señal provocada en el detector FID por el compuesto responsable del aroma con el descriptor sensorial del aroma de ese compuesto detectado por el juez mediante su olfato, siempre que el compuesto aromático esté por encima del umbral de detección del detector FID y de la nariz humana.

En resumen, aúna el análisis instrumental con el análisis sensorial, los compuestos responsables de cada zona de olor se pueden identificar según estos niveles:

1. Coincidencia de los índices de retención del compuesto, utilizando dos columnas de diferentes polaridades (polar y apolar), con los índices de retención reportados en bases de datos (listas de índices de retención de compuestos en columnas de polaridad lo más similar posible a la usada en nuestro estudio).
2. Similitud del olor (del patrón o descrito en bases de datos) del compuesto con índice de retención similar con el olor descrito por el juez en la olfatometría.
3. Obtención del espectro de masas en la zona de estudio mediante inyección en cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) y su similitud a espectros de masas de las bibliotecas.

La forma de introducir las muestras en los cromatógrafos de gases va a marcar el tipo de resultados que obtengamos en el análisis de aroma. Lo introducido en el cromatógrafo debe ser

lo más representativo posible del aroma de la muestra. Existen dos formas muy diferentes de trabajar las muestras en la química del aroma, introduciendo extractos líquidos en el cromatógrafo o el espacio de cabeza de las muestras (inyección de gases). En este trabajo hemos usado las 2 metodologías:

- Obtención de un extracto líquido a partir de una microextracción con diclorometano (Li et al., 2023). También se puede usar la extracción en fase sólida para obtener extractos líquidos en la química del aroma (Tokitomo et al., 2005).
- Microextracción en fase sólida (SPME) para recoger los volátiles del espacio de cabeza de las muestras. Dichos volátiles son retenidos en la fibra que es desorbida térmicamente en el inyector del cromatógrafo (Milheiro et al., 2023).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio es caracterizar el aroma de diferentes kombuchas elaboradas a partir de diversas setas comunes, relacionando los conocimientos adquiridos en el grado de ciencia y tecnología de los alimentos.

Los objetivos específicos fueron jerarquizar los volátiles más influyentes en el aroma de las kombuchas e identificarlos y cuantificarlos a lo largo de la fermentación.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Muestras

Las muestras utilizadas para este trabajo de fin de grado (TFG) fueron seis kombuchas experimentales producidas a partir de diferentes setas y tres kombuchas comerciales. Las kombuchas experimentales fueron sometidas a un proceso fermentativo de veintiún días para su producción, tomando muestras de las mismas los días cero, tres, siete, diez, catorce y veintiuno. Es por esto por lo que se analizaron 36 muestras de kombuchas experimentales, además de las tres kombuchas comerciales. La elaboración de las kombuchas experimentales se hizo en recipientes de 100 mL poniendo: 72 ml de agua a 80 °C, 5,6 gramos de azúcar blanco de caña y 0,960 gramos de las setas en polvo. Inicialmente se agitó enérgicamente hasta obtener una mezcla homogénea. Tras ello, se dejaron enfriar las muestras adicionando posteriormente el *scooby*. Una vez añadido, se dejaron fermentar durante 21 días en condiciones de aerobiosis, a temperatura ambiente y en oscuridad. Las muestras se codificaron de la siguiente manera según la seta utilizada: K-AB (*Agaricus bisporus*), K-PO (*Pleurotus ostreatus*), K-PE (*Pleurotus eryngii*), K-LD (*Lactarius deliciosus*), K-CC (*Cantharellus cibarius*) y K-BE (*Boletus edulis*). Estas kombuchas experimentales fueron elaboradas por el departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria de la Universidad Complutense de Madrid. Las kombuchas comerciales utilizadas fueron: Komvida organic de frutos rojos (etiquetada como KB1), Vitae kombucha 100% (etiquetada como KB2) y Onflow té verde (etiquetada como KB3).

3.2. Patrones, reactivos y pequeño instrumental de laboratorio

- Diclorometano (DCM) (Fisher Scientific, Reino Unido)
- Metanol (Fisher Scientific, Reino Unido)
- Agua MilliQ
- Centrífuga JP Selecta centro 8 – BL (JP Selecta, Barcelona, España)
- Agitador Promax 1020 (Heidolph, Schwabach, Alemania)
- Agitador con calefacción para viales (Markes International, Bridgend, Reino Unido)
- pHmetro micro pH 2002 (Crison, Alella, España)
- Patrones utilizados: hexanal, ácido propanoico, γ -nonalactona, γ -valerolactona (99%), ácido nonanoico, 3-octanol y γ -caprolactona proporcionado por Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EEUU. Diacetilo (97%), butirato de etilo (98%), alcohol isoamílico (98,5%), acetoína (96%), heptanoato de etilo (99%), lactato de etilo (98%), c-3-hexenol (98%), ácido isobutírico (99%), 4-metil-2-pentanol (99%), γ -butirolactona (99%), alcohol bencílico (99%), 2-isopropil-3-metoxipirazina (97%), 3-isopropil-2-metoxipirazina (99%), 3-octanol (99%), E-2-octenal (94%), y 1-octen-3-ol (98%) proporcionados por Aldrich.

Isobutanol (99%) proporcionado por Merck. Acetato de isoamilo (98%) proporcionado por Chemservice. 1-butanol (99,5%) y ácido acético (99,7%) proporcionados por Panreac. Octanoato de etilo (98%), ácido hexanoico (99,5%) y ácido decanoico (98%) proporcionados por PolyScience. Ácido isovaleriánico (98%) proporcionado por Lancaster. β -feniletanol (99%), ácido heptanoico (99%) y ácido octanoico (98%) proporcionados por Fluka.

3.3. Disoluciones

- Disolución de alcanos: C7-C35. Disolución de 1000 mg/L en hexano.
- Disolución de estándares para candidatos sin identificar en la olfatometría: 3-octanol (1399 mg/L), E-2-octenal (884 mg/L), 1-octen-3-ol (1000 mg/L), 2-isopropil-3-metoxipirazina (9.86 μ g/L), y 3-isopropil-2-metoxipirazina (0.21 μ g/L).
- Disoluciones de estándares internos: 139,24 mg/L de 4-metil-2-pentanol, 134,57 mg/L de heptanoato de etilo y 131,46 mg/L de ácido heptanoico.
- Disolución de kombucha sintética: Agua destilada con azúcar (20 g/L) acidificada a pH 3,3 con HCl al 3,7%.
- Disoluciones madre para dopar la kombucha sintética:
 - Disolución A: 13985 mg/L de hexanal, 14360,20 mg/L de ácido propanoico, 946,36 mg/L de γ -nonalactona, 1216,15 mg/L de lactato de etilo, 1128,75 mg/L γ -valerolactona, 370 mg/L de ácido nonanoico, 1399 mg/L de 3-octanol, 904,06 mg/L de γ -caprolactona y 1025,28 mg/L de ácido fenilacético en etanol.
 - Disolución B: 75 mg/L de diacetilo, 6,75 mg/L de butirato de etilo, 2030 mg/L de isobutanol, 79,5 mg/L de acetato de isoamilo, 66 mg/L de 1-butanol, 5375 mg/L de alcohol isoamílico, 1497,5 mg/L de acetoína, 6700 mg/L de lactato de etilo, 67,25 mg/L de 1-hexanol, 6,75 mg/L de c-3-hexenol, 43 mg/L de octanoato de etilo, 16000 mg/L de ácido acético, 81 mg/L de ácido isobutírico, 39,5 mg/L de ácido isovaleriánico, 67,5 mg/L de ácido hexanoico, 90,25 mg/L de alcohol bencílico, 2875 mg/L de β -feniletanol, 47,25 mg/L de ácido octanoico y 20,75 mg/L de ácido decanoico en etanol.

3.4. Análisis de aromas por cromatografía de gases (GC-FID)-Olfatometría

El análisis de GC-O, se llevó a cabo en tres muestras (kombuchas AB, PE, LD en el día 10 de fermentación). Para la extracción de compuestos, se utilizó SPME del espacio de cabeza, debido a la cantidad limitada de muestra disponible y a la presencia de estudios previos comparables con la misma técnica para analizar aromas. Se partió del trabajo de Tejedor-Calvo et al., (2021), y para ello, se utilizó una fibra de sílice fundida recubierta de 50/30 mm de

divinilbenzeno/carboxeno/polidimethylsiloxano (Supelco, Barcelona, España). Las muestras (2 mL de kombucha) se vertieron en un vial de 20 mL con septum. Estos viales fueron acondicionados en un agitador con posibilidad de calentamiento a 50 °C durante 10 minutos, realizando seguidamente una exposición de 20 minutos de la fibra al espacio de cabeza del vial a la misma temperatura.

Las fibras de SPME fueron analizadas en dos cromatógrafos GC-FID-O; uno equipado con columna polar (Figura 2 derecha) y otro equipado con columna apolar (Figura 2 izda).

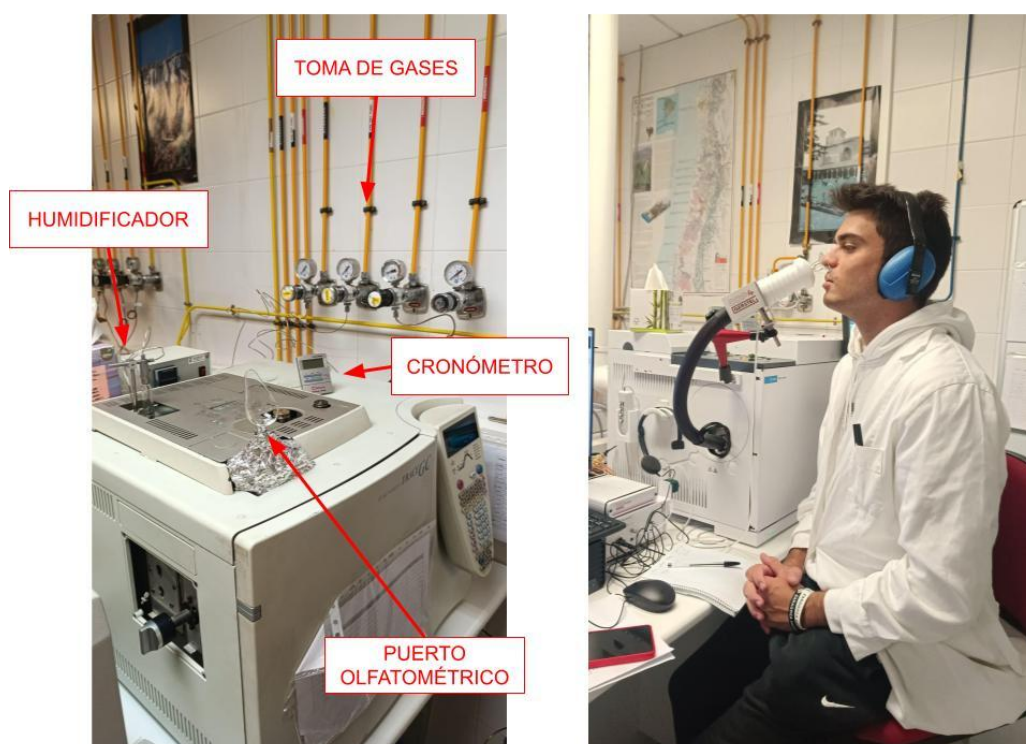


Figura 2. Izda; partes del cromatógrafo con salida olfatométrica y columna apolar. Dcha.; sesión de olfatometría en el cromatógrafo con salida olfatométrica y columna polar.

Las olfatometrías se llevaron a cabo por un panel de 6 jueces (1 hombre y 5 mujeres, con edades comprendidas entre los 21 y 55 años), miembros del grupo de investigación y con experiencia en análisis olfatométrico. Cada juez debía indicar el tiempo al que percibía algo, la descripción y la intensidad del olor en una escala de 5 puntos del 0 al 3, pudiendo usar valores intermedios. Para la jerarquización de las zonas de olor se usó la frecuencia modificada (% FM), calculada de acuerdo con (Dravnieks, 1985), usando la frecuencia de citación y la intensidad de cada zona olfativa con relación a la expresión siguiente.

$$FM\% = \sqrt{F\% \times I\%}$$

F%= Porcentaje de frecuencia de citación de un odorante, siendo el panel de 6 jueces, si lo detectan todos, entonces la frecuencia es del 100%.

I%= Intensidad media del odorante expresada como porcentaje del máximo de intensidad, si los 6 jueces lo detectan con una intensidad de 3, es del 100%.

Los compuestos responsables de las zonas de olor fueron identificados atendiendo a la descripción olfatométrica, índices de retención, datos de la literatura científica y el espectro de masas, siempre y cuando se dispone de todos estos datos.

El perfil olfatométrico de las diferentes muestras fue analizado inicialmente en el cromatógrafo Agilent 8890 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EEUU) equipado con un puerto olfatométrico ODP-4 (GERSTEL, Mülheim an der Ruhr, Alemania) y un FID. El equipo tenía una columna capilar ZB-Wax (Phenomenex, Torrance, California, EEUU) de 30 m, 0,32 mm d.i. y 0,5 µm de espesor de fase y una corriente de 3 mL/min con gas hidrógeno como gas portador. La temperatura del horno fue de 40 °C mantenida durante 5 minutos, posteriormente se aumentó a 100 °C a un ritmo de 4 °C min⁻¹, y finalmente hasta 220 °C a un ritmo de 6 °C min⁻¹, manteniendo la temperatura máxima 10 minutos. La detección fue realizada por un FID a 250 °C. Para la inyección y desorción de la fibra, esta se introdujo en el inyector con un liner especial de SPME a 250 °C durante 5 minutos.

Las muestras también se analizaron con un cromatógrafo GC Trace de ThermoQuest (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU) provisto con un FID) y una salida sniffing conectada al final de la columna mediante un divisor de flujo. La temperatura del horno fue de 40 °C mantenida durante 5 minutos, posteriormente se aumentó a 100 °C a un ritmo de 4 °C min⁻¹, y finalmente se subió a 220 °C a un ritmo de 6 °C min⁻¹, manteniendo la temperatura máxima durante 10 minutos. La detección fue realizada por un FID a 250 °C. La columna fue una columna apolar DB-5MS (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EEUU) de 30 m de longitud x 0,32 mm de diámetro interno y 1 µm de espesor de fase. El gas portador fue hidrógeno, a una presión constante de 52 kPa. Para la inyección y desorción de la fibra, esta se introdujo en el inyector con un liner especial de SPME a 250 °C durante 5 minutos.

Para el cálculo de los índices de retención de cada zona de olor, se inyectó en el mismo programa cromatográfico que las fibras SPME, una disolución de una mezcla de alcanos. Los índices de retención lineales (IR) de las zonas olfativas se calculan teniendo en cuenta los tiempos de retención de los picos cromatográficos de los alcanos, su número de carbonos y el tiempo al que se huele en la olfatometría, según la fórmula:

$$IR = 100 \times \left[\frac{t_{Ri} - t_{Rz}}{t_{R(z+1)} - t_{Rz}} + z \right]$$

t_{Ri} = Tiempo de retención al que se ha detectado el odorante

t_{Rz} = Tiempo de retención del alcano anterior al odorante detectado

$t_{R(z+1)}$ = Tiempo de retención del alcano posterior, siendo z el número de carbonos del alcano anterior

3.5. Identificación de compuestos mediante inyección de extracto líquido en cromatógrafo de gases con espectrometría de masas (GC-MS)

Los análisis se realizaron con un cromatógrafo Agilent 8890 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EEUU) acoplado a un MS Agilent 5977C. La columna cromatográfica fue una ZB-WAX 45 (Phenomenex, Torrance, California, EEUU) de 33 m x 0,25 mm d.i., con un espesor de fase de 0,5 μ m. El gas portador era helio a un flujo de 1,25 mL min⁻¹.

La temperatura del inyector se mantuvo a 250 °C. La inyección fue de 2 μ L del extracto líquido obtenido en la sección 4.6, y en modo splitless (tiempo de splitless 1,5 min). El programa de temperaturas del horno comenzó con 5 minutos a 40 °C, aumentando hasta 65 °C con una rampa de 1 °C min⁻¹ y posteriormente hasta 120 °C a 4 °C min⁻¹, tras ello se aumentó la temperatura hasta 145 °C a 2 °C min⁻¹, alcanzando después 240 °C con una rampa de 4 °C min⁻¹. Esta temperatura se mantuvo durante 35 minutos. La fuente de ionización del MS se mantuvo a una temperatura de 230 °C. El intervalo de masas adquirido fue 40 - 250 m/z.

Al igual que en el GC-O, se inyectó una mezcla de alcanos en las mismas condiciones con las que se analizaron las muestras, para localizar las zonas a identificar según el índice de retención lineal. Las librerías usadas para buscar los espectros de masas y los índices de retención fueron NIST y Pherobase.

3.6. Análisis de compuestos volátiles mayoritarios

Para la determinación de compuestos volátiles mayoritarios se usó un método basado en una microextracción líquido-líquido (se usó una pequeña cantidad de DCM, como disolvente) de muestras previamente diluidas con salmuera y análisis del extracto mediante GC-FID (Ortega et al., 2021).

Primero, se atempera la disolución de estándares internos durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugan durante 10 minutos las muestras de kombucha utilizando tubos falcon de plástico y una centrífuga a 2500 r.p.m., para impedir que los sedimentos de estas interfieran en el método. Tras ello, se vierten las muestras de kombucha en un matraz de 5 mL de capacidad hasta aproximadamente la mitad. Y se adicionan 38 μ L de la

disolución de estándares internos mediante una microjeringa de 100 μL . La microjeringa para la adición de estándares internos deberá ser limpiada mínimo 5 veces antes y después de su uso con una disolución agua/etanol al 40%. Después, se enrasa el matraz de 5 mL con muestra de kombucha. Se pesan 4,1 g de sulfato amónico en un granatario con la ayuda de una zapatilla. La sal ya pesada se introduce en un tubo de fondo cónico de centrífuga de 10 mL. Después, se trasvasan las muestras de kombucha con estándar interno de los matraces de 5 mL a vasos de precipitado de 25 mL y de ahí se toman 2,7 mL con una pipeta desechable de 5 mL de capacidad con la ayuda de un pipeteador automático, vertiéndose en el mismo tubo en el que se había adicionado el sulfato amónico. A continuación, se pipetea 6,3 mL de agua MilliQ con una pipeta desechable de 10 mL con el pipeteador automático y se vierten en el mismo tubo con la muestra de kombucha y la sal. Se añade 250 μL de DCM al mismo tubo con una microjeringa y se cierra el tubo, asegurándose que queda el mismo bien cerrado.

Los tubos se agitan en un agitador horizontal Heidolph Promax 1020 a 90 r.p.m. durante 90 minutos. Una vez transcurridos, se introducen los tubos en una centrífuga a una velocidad de 2500 rpm durante 10 minutos. El sistema deberá estar correctamente equilibrado. Una vez concluida la centrifugación se procederá a tomar el extracto de DCM. Para ello se lavará una microjeringa con etanol y DCM, un mínimo de 10 veces con cada compuesto y en ese orden. Se retira con pipeta pasteur la fase acuosa de los tubos que contienen la muestra con el DCM, para facilitar la posterior extracción, y se procederá con mucho cuidado a recoger la fase orgánica (DCM) asegurándose de no extraer fase acuosa. El extracto se depositará en viales con inserto de 250 μL . Se lavará la microjeringa usada para la extracción un mínimo de 10 veces con metanol y DCM entre muestras, en ese orden. Finalmente, se etiquetan los viales con inserto resultantes de las extracciones y se almacenan en un congelador hasta su inyección en GC-FID para cuantificar.

Para el análisis de estos compuestos mayoritarios se usó un cromatógrafo Agilent 8890 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EEUU) y un PAL RSI 85 (CTC Analytics, Suiza). La temperatura del horno fue de 40 $^{\circ}\text{C}$ mantenida por 2,25 minutos, posteriormente se aumentó a 62 $^{\circ}\text{C}$ a un ritmo de 10,1 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, a continuación, hasta 90 $^{\circ}\text{C}$ a un ritmo de 2,4 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, después hasta 98 $^{\circ}\text{C}$ a un ritmo de 12,9 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ y hasta 124 $^{\circ}\text{C}$ a un ritmo de 2,4 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Finalmente se aumentó hasta 230 $^{\circ}\text{C}$ a un ritmo de 9,8 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, manteniendo la temperatura máxima 5 minutos. El inyector estaba a 250 $^{\circ}\text{C}$, split 1:20. La columna fue una columna apolar ZB-WAX (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EEUU) de 33 m de longitud x 0,25 mm de diámetro interno y 0,5 μm de espesor de fase. Se utilizó un detector FID a 300 $^{\circ}\text{C}$ con nitrógeno como gas portador.

La cuantificación se realizó usando áreas relativas a los estándares internos. Los compuestos diacetilo, butirato de etilo, isobutanol, hexanal, acetato de isoamilo, 1-butanol, acetoína, lactato de etilo, 1-hexanol, c-3-hexenol, 3-octanol, ácido acético, ácido isobutírico, ácido propanoico, γ -valerolactona, γ -caprolactona, ácido isovaleriano, ácido hexanoico, alcohol bencílico, β -feniletanol, γ -nonalactona y ácido fenilacético se cuantificaron usando el estándar interno 4-metil-2-pentanol; los compuestos ácido octanoico, ácido nonanoico y ácido decanoico usaron ácido heptanoico y el octanoato de etilo usó heptanoato de etilo como estándar interno. La calibración se realizó a través de factores de respuesta (FR) que se obtuvieron aplicando por triplicado la metodología descrita a la kombucha sintética dopada con una cantidad conocida de los patrones disponibles. Se utilizó la siguiente fórmula:

$$FR_i = \frac{\text{Concentración dopada } \left(\frac{mg}{L}\right) \text{ de } i}{\text{Área relativa de } i \text{ en kombucha sintética dopada}}$$

$$\text{Concentración de } i \text{ en la muestra } \left(\frac{mg}{L}\right) = FR_i \times \text{Área relativa de } i \text{ de la muestra}$$

FR_i= Factor de respuesta del compuesto i

3.7. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza de 2 factores, considerando como datos las áreas de los estándares internos; siendo los factores el día de análisis y la muestra analizada. El programa utilizado fue XLSTAT Software Estadístico para Excel.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente trabajo consiste principalmente en la identificación y jerarquización de los compuestos responsables de los aromas de kombuchas de setas y en la cuantificación de los mismos a lo largo de la fermentación de 6 kombuchas a partir de diferentes setas.

4.1. Jerarquización mediante olfatometría de los compuestos responsables del aroma de 3 kombuchas experimentales

Con la técnica GC-O se han detectado hasta 25 zonas de olor que caracterizan el aroma de 3 kombuchas experimentales en el día 10 de fermentación (Tabla 1). De las 25 zonas de olor, no conocemos el compuesto responsable de 7 de ellas.

Tabla 1. Zonas de olor encontradas en 3 kombuchas (AB, PE y LD) en el día 10 de fermentación: Índices de retención (IR) en columna polar y apolar, descriptor, posible identificación y frecuencia modificada (%).

IR polar (DB- WAX)	IR apolar (DB-5)	Descriptor	Compuesto	FM(%)		
				AB	PE	LD
1044	760	Fresa-nata, dulce	Butirato de etilo ^a	-	38	-
1061	840	Fresa, dulce	2-metilbutirato de etilo ^a	19	-	47
1076	840	Dulce, fresa, especia	3-metilbutirato de etilo ^a	-	33	31
1132	852	Plátano	Acetato de isoamilo ^b	41	24	-
1202	734	Chocolate negro, humedad, graso	n.i.	22	-	50
1224	830	Queso, rancio	Alcohol isoamílico ^a	66	46	31
1359	1090	Hongo, verde, humedad	2-nonanona ^b	-	31	-
1398	905	Fruta acida, pis de gato, humedad	4-mercapto-4-metil-2- pentanona ^a	31	-	-
1440	976	Hongo, humedad	n.i.	25	48	48
1449	1080	Madera, chocolate, verde, tierra	n.i.	59	29	45
1458	-	Húmedo, frutal, floral	n.i.	31	-	-
1496	703	Ácido, vinagre	Ácido propanoico ^a	45	53	-
1504	-	Amargo, verde, verdura cocida, tierra, tostado	n.i.	19	51	31
1711	875	Pies, queso, graso	Ácido isovaleriánico ^a	83	51	53
1840	1384	Floral, especia	β-damascenona ^b	41	19	-
1890	1098	Medicina, especiado	Guaiaicol ^b	22	43	-
1939	1116	Floral, rosas	β-feniletanol ^a	78	66	49
2032	1074	Caramelo, algodón azúcar, dulce	Furaneol ^a	31	31	24
2055	1046	Caramelo, algodón azúcar, dulce	Pantolactona ^b	22	46	-
2065	1290	Especia, estiércol, establo	4-etilguaiaicol ^a	24	24	33
2206	1167	Estiércol, cuero	4-etilfenol ^a	82	68	51
2251	-	Cuero, plástico, goma, ahumado	n.i.	-	-	33
2613	-	Picante, ahumado	n.i.	33	-	-
2618	1240	Miel, dulce	Ácido fenilacético ^a	26	22	49

n.i., compuesto no identificado

^a, identificación basada en índice de retención en DB-WAX y DB5 y descripción olfatométrica contrastada con literatura.

^b, identificación basada en la similaridad en índices de retención en DB-WAX y DB5, descripción de olor y espectros de masas.

En la tabla 1 se han incluido los índices de retención lineales calculados gracias a los alcanos. Dichos datos sirvieron para iniciar la búsqueda de los posibles responsables de las zonas de olor. Los índices de retención se calcularon tanto en columna polar como en una columna apolar. En una columna cromatográfica es relativamente sencillo la coelución de diferentes compuestos, pero que esa coelución se repita en columnas de fase estacionaria con distinta polaridad es prácticamente imposible. Esa es la razón por la que la coincidencia de los 2 índices con los recogidos en las bases de datos nos sirve para identificar compuestos responsables de zonas de olor. También se usaron los índices en columna polar para buscar los espectros de masas tras inyectar los extractos de mayoritarios en el sistema GC-MS. Una vez identificado el espectro de masas presente en la zona de olor se considera una identificación segura.

Aunque se haya detectado una zona de olor, no significa que aparezca claramente un pico en el cromatograma GC-O. De hecho, en la siguiente figura se pueden ver las diferentes zonas de olor, algunas sin compuesto responsable y algunas sin pico:

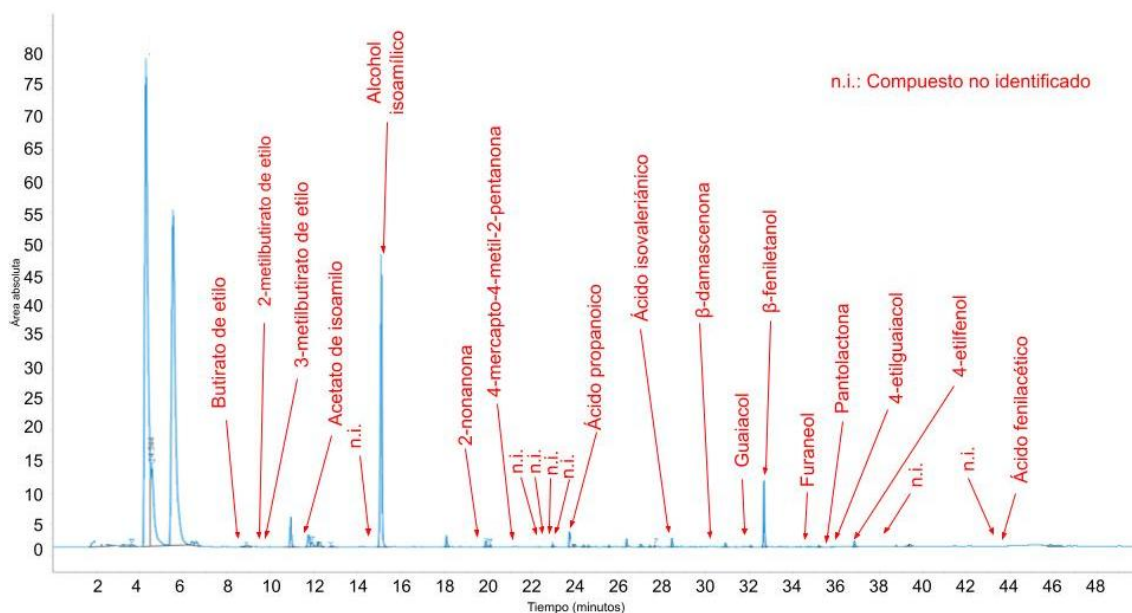


Figura 3. Cromatograma GC-FID de la muestra K-AB en el día 10 de fermentación obtenido a la vez que la olfatometría en columna polar. Señalados los nombres de los compuestos responsables de las zonas de olor.

La jerarquía de los compuestos se llevó a cabo en función de las frecuencias modificadas (FM). Las zonas de olor con FM más alta son más relevantes para el aroma de la kombucha. Los odorantes con FM igual o inferior a 25% en las 3 muestras se consideraron “ruido” y no aparecen en la tabla 1, aunque sí que se muestran valores inferiores a 25 cuando la misma zona de olor se ha detectado en otra muestra por encima del 25%..

Se pueden observar compuestos presentes en las 3 kombuchas como son el alcohol isoamílico, ácido isovaleriano, β -feniletanol, furaneol, 4-etilguaicol, 4-etilfenol, ácido fenilacético, y dos compuestos no identificados. Se podrían considerar compuestos constitutivos de la base del aroma de kombuchas de setas. Respecto a las 2 zonas sin caracterizar, todavía no se ha conseguido identificar el compuesto responsable del aroma de las mismas. Varios candidatos se han probado para confirmar el compuesto con índice 1440 en columna polar. Entre ellos, 3-octanol, E-2-octenal, y 1-octen-3-ol. Sin embargo, los índices obtenidos han sido 1414, 1453 y 1472 respectivamente. Por otro lado, el compuesto con índice 1449 en columna polar, se cree que es una pirazina, debido a sus propiedades aromáticas a tierra y humedad, aunque los candidatos preseleccionados como responsables, han obtenido IR distintos: 2-isopropil-3-metoxipirazina un índice de 1456 y 3-isopropil-2-metoxipirazina 1454. Algunos compuestos, como el β -feniletanol, 4-etilfenol y ácido isovaleriano tienen una FM por encima del 50% para todas las muestras; por lo que serían los más importantes para el aroma de las kombuchas de setas.

También se puede señalar en la tabla 1 que la familia química más representada, los 4 ésteres existentes (butirato de etilo, 2-metilbutirato de etilo, 3-metilbutirato de etilo y acetato de isoamilo) aparecen en dos o incluso en solo una de las muestras, por lo que parecen característicos de alguno de los sustratos, ya que es la única diferencia entre las 3 muestras.

4.2. Reproducibilidad del análisis de compuestos volátiles mayoritarios en kombuchas comerciales

Antes de comenzar el análisis cuantitativo de las 36 muestras de kombucha experimental se realizó un estudio de reproducibilidad para saber la precisión del método puesto a punto para vino (Ortega et al., 2001), aplicado a kombuchas. Para ello, se analizaron 3 kombuchas comerciales (KB1, KB2 y KB3) por triplicado en 2 días diferentes, a las cuales se les había añadido estándares internos, siguiendo el protocolo de análisis. Tras integrar las áreas de los estándares internos se realizó un análisis de varianza de 2 factores (día y muestra).

Los resultados aparecen en la tabla 2 y puede observarse como no hay diferencias significativas dependiendo del día para ninguno de los 3 estándares internos, ocurriendo lo mismo dependiendo de la muestra. Sin embargo, la interacción día por muestra es significativa ($p=0,030$) para el ácido heptanoico.

Tabla 2. Valores de p obtenidos en el análisis de varianza de las señales de los estándares internos, considerando 2 factores (día y muestra). Ensayo de reproducibilidad: 3 muestras de kombuchas comerciales diferentes analizadas por triplicado 2 días diferentes

	4-metil-2-pentanol	Heptanoato de etilo	Ácido heptanoico
DIA	0,808	0,704	0,351
MUESTRA	0,194	0,078	0,181
DIA*MUESTRA	0,410	0,104	0,030

La significatividad del factor día por muestra en los datos de ácido heptanoico puede ser debida a imprecisiones muy bajas en las réplicas, que hace que se detecten significatividades con variaciones muy pequeñas (Figura 4). Como se observa en la figura, las barras de errores son pequeñas. Esto provoca la detección de diferencias estadísticamente significativas, aunque los datos no sean muy diferentes. Podemos concluir que el método es reproducible pese a que el análisis de varianza detecte que el día 1 el área de estándar interno ácido heptanoico es mayor en la muestra KB1, mientras que en el segundo día la señal mayor es en KB2, de ahí la significatividad día por muestra. Estas variaciones pueden ser debidas a imprecisiones en el volumen de inyección, ya que en este apartado se ha trabajado con áreas absolutas. El método utiliza áreas relativas a los estándares internos.

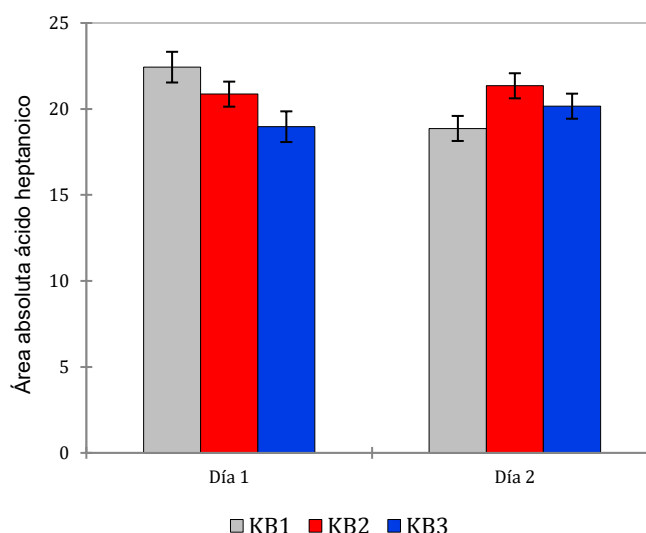


Figura 4. Medias del área absoluta de ácido heptanoico para cada una de las kombuchas comerciales, los 2 días de análisis.

4.3. Seguimiento de los compuestos volátiles mayoritarios de kombuchas experimentales a lo largo de la fermentación

En la figura 5 se puede ver el cromatograma GC-FID de la muestra AB a los 10 días de fermentación, tras aplicarle la microextracción líquido-líquido con DCM. Es reseñable que el

perfil es diferente al observado en la figura 3, por tratarse de un tratamiento de muestra diferente. El de la figura 3 es un análisis del espacio de cabeza de la kombucha y el de la figura 5 es una inyección de un extracto de la kombucha.

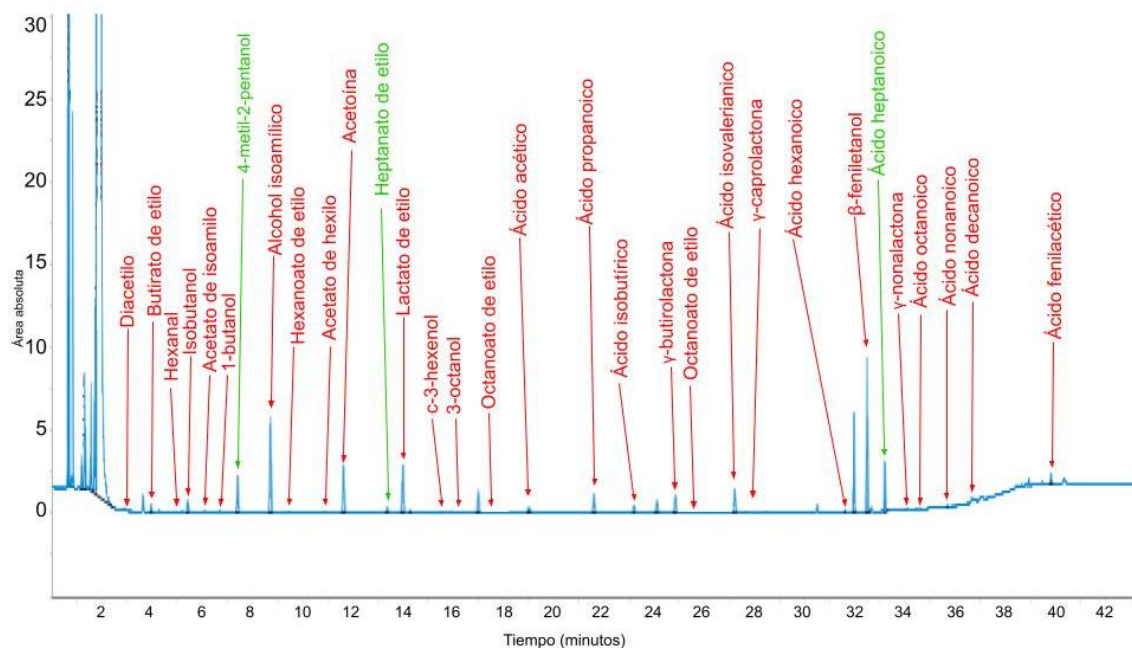


Figura 5. Cromatograma GC-FID de compuestos volátiles mayoritarios (en rojo) de la muestra K-AB en el día 10 de fermentación. En verde aparecen señalados los estándares internos.

Se han detectado 28 compuestos volátiles en las kombuchas elaboradas con setas a lo largo de la fermentación. Los datos cuantitativos de las 3 kombuchas a las que se les ha hecho olfatometría aparecen en las tablas 3, 4 y 5. Los datos de las otras 3 kombuchas aparecen en el anexo (Tablas A1, A2, y A3).

En la muestra AB (tabla 3) los compuestos de mayor concentración tanto al principio como al final de la fermentación son la acetoína y el ácido acético, aunque las cantidades en los dos puntos es muy diferente se incrementan en 4 órdenes de magnitud. Otros compuestos aparecen de forma significativa en el día 7 de fermentación como el alcohol isoamílico, ácido isovaleriano y el lactato de etilo.

En la tabla 4 aparecen los datos de la muestra PE. Como la AB, también presenta acetoína (56,93 mg/L) y γ-valerolactona (16,57 mg/L) en concentraciones mayores que otros compuestos al principio de la fermentación y estas aumentan a lo largo de la misma. En esta muestra destaca las bajas concentraciones de compuestos fermentativos como el alcohol isoamílico, ácido acético (no aparece) y β-feniletanol.

Tabla 3. Concentración (mg/L) de los compuestos volátiles mayoritarios del aroma de la kombucha AB (*Agaricus bisporus*) a lo largo de los días de fermentación. Límites de detección (mg/L) de los compuestos con la metodología usada.

Días	LD*	0	3	7	10	14	21
Diacetilo	0,005	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Butirato de etilo	0,004	0,70	0,73	0,67	1,80	0,73	0,69
Hexanal	0,081	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	1,43
Isobutanol	0,010	<LD	<LD	4,02	6,62	2,80	1,01
Acetato de isoamilo	0,005	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
1-butanol	0,005	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Alcohol isoamílico	0,013	<LD	<LD	215,28	300,86	122,35	56,49
Acetoína	0,109	60,08	88,19	67,30	185,44	1379,79	1853,20
Lactato de etilo	0,008	<LD	<LD	61,72	532,93	510,08	427,40
1-hexanol	0,010	<LD	<LD	0,48	0,34	0,18	<LD
c-3-hexenol	0,005	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
3-octanol	0,037	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Octanoato de etilo	0,010	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Ácido acético	1,522	<LD	<LD	<LD	6415,59	25236,85	18672,90
Ácido propanoico	0,050	<LD	<LD	16,47	102,39	279,19	666,20
Ácido isobutírico	0,024	<LD	<LD	10,82	39,01	60,96	122,50
γ -valerolactona	0,040	19,52	28,19	42,02	71,82	141,88	214,63
γ -butirolactona	0,017	3,09	4,57	6,86	22,05	46,00	83,45
γ -caprolactona	0,036	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Ácido isovalerianico	0,001	<LD	<LD	13,99	32,28	77,95	123,17
Ácido hexanoico	0,008	0,17	0,19	<LD	0,51	1,49	2,40
Alcohol bencílico	0,004	4,82	7,00	12,95	15,49	15,73	13,65
β -feniletanol	0,004	0,11	0,20	9,08	21,65	28,46	26,57
γ -nonalactona	0,031	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Ácido octanoico	0,005	0,08	0,05	0,14	<LD	0,18	0,4
Ácido nonanoico	0,101	6,60	2,71	7,15	3,83	<LD	0,97
Ácido decanoico	0,004	0,26	0,13	0,23	<LD	<LD	<LD
Ácido fenilacético	0,021	<LD	<LD	26,83	45,15	214,60	574,18

*LD = Límite de detección, concentración necesaria para obtener una señal tres veces el ruido de fondo.

Tabla 4. Concentración (mg/L) de los compuestos volátiles mayoritarios del aroma de la kombucha PE (*Pleurotus eryngii*) a lo largo de los días de fermentación.

Días	0	3	7	10	14	21
Diacetilo	<LD	<LD	<LD	<LD	0,90	2,94
Butirato de etilo	0,76	0,72	0,55	0,71	0,60	0,68
Hexanal	6,93	4,26	2,46	5,05	4,32	<LD
Isobutanol	<LD	<LD	0,84	1,01	0,64	0,53
Acetato de isoamilo	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
1-butanol	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Alcohol isoamílico	<LD	<LD	46,78	38,60	16,14	9,72
Acetoína	56,93	72,59	288,37	327,56	1392,70	8299,30
Lactato de etilo	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	36,60
1-hexanol	<LD	<LD	0,17	0,14	<LD	<LD
c-3-hexenol	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
3-octanol	<LD	0,84	1,32	1,89	1,13	0,75
Octanoato de etilo	<LD	0,85	<LD	<LD	<LD	<LD
Ácido acético	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Ácido propanoico	<LD	<LD	<LD	7,27	31,73	57,19
Ácido isobutírico	<LD	<LD	<LD	12,73	31,07	79,85
γ -valerolactona	16,57	22,13	31,22	41,24	63,97	107,21
γ -butirolactona	3,05	3,72	4,46	6,07	10,43	29,14
γ -caprolactona	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Ácido isovalerianico	1,09	1,65	3,37	10,70	16,69	30,22
Ácido hexanoico	1,08	1,43	2,08	2,90	3,09	4,05
Alcohol bencílico	<LD	<LD	0,13	0,14	0,15	0,23
β -feniletanol	<LD	0,12	0,54	1,01	1,47	1,08
γ -nonalactona	<LD	<LD	<LD	1,51	4,87	3,27
Ácido octanoico	0,18	0,30	0,30	0,49	0,57	0,46
Ácido nonanoico	2,61	7,19	2,50	3,81	3,02	2,14
Ácido decanoico	<LD	1,04	0,06	0,12	4,77	<LD
Ácido fenilacético	<LD	3,99	4,66	13,19	21,78	50,28

LD = Límite de detección, concentración necesaria para obtener una señal tres veces el ruido de fondo.

Tabla 5. Concentración (mg/L) de los compuestos volátiles mayoritarios del aroma de la kombucha LD (*Lactarius deliciosus*) a lo largo de los días de fermentación.

Días	0	3	7*	10	14	21
Diacetilo	<LD	<LD	-	<LD	<LD	<LD
Butirato de etilo	0,64	0,73	-	0,48	0,81	0,80
Hexanal	9,93	<LD	-	<LD	<LD	<LD
Isobutanol	<LD	<LD	-	9,48	13,61	8,17
Acetato de isoamilo	<LD	<LD	-	0,21	0,21	0,16
1-butanol	<LD	<LD	-	0,23	0,35	0,25
Alcohol isoamílico	1,44	1,51	-	359,43	419,30	239,20
Acetoína	58,16	103,65	-	155,74	141,61	926,82
Lactato de etilo	<LD	<LD	-	421,00	2081,31	2677,41
1-hexanol	0,07	0,23	-	0,10	1,23	0,29
c-3-hexenol	<LD	0,21	-	0,06	<LD	<LD
3-octanol	<LD	<LD	-	<LD	<LD	<LD
Octanoato de etilo	<LD	<LD	-	<LD	<LD	<LD
Ácido acético	<LD	<LD	-	28371,31	6076,71	42343,32
Ácido propanoico	<LD	<LD	-	15,64	25,41	73,01
Ácido isobutírico	<LD	<LD	-	13,66	10,70	20,29
γ-valerolactona	<LD	<LD	-	24,48	152,94	233,78
γ-butirolactona	<LD	<LD	-	8,14	28,11	53,99
γ-caprolactona	<LD	<LD	-	<LD	66,03	223,21
Ácido isovalerianico	<LD	<LD	-	17,19	8,21	20,36
Ácido hexanoico	2,34	2,46	-	7,28	0,86	1,42
Alcohol bencílico	0,06	0,08	-	0,17	0,53	0,63
β-feniletanol	0,10	0,19	-	19,11	32,03	36,09
γ-nonolactona	<LD	<LD	-	16,77	11,32	21,80
Ácido octanoico	0,48	0,35	-	0,21	1,02	1,17
Ácido nonanoico	2,91	3,01	-	<LD	1,73	2,06
Ácido decanoico	11,15	5,30	-	0,06	0,66	0,88
Ácido fenilacético	2,71	5,86	-	26,07	68,50	141,30

LD = Límite de detección, concentración necesaria para obtener una señal tres veces el ruido de fondo.

*No aparecen los resultados de esta muestra porque hubo problemas de emulsión en la extracción con DCM.

Los datos de la muestra LD aparecen en la tabla 5. Podemos observar la misma tendencia con relación a la acetoina estando presente al principio de la fermentación y aumentando su concentración a lo largo de esta. En cambio, observamos que la γ -valerolactona no se encuentra en esta muestra al principio de la fermentación. Finalmente encontramos una gran cantidad de ácido acético al final de la fermentación, al igual que ocurría en la muestra AB. Cabe destacar también la elevada cantidad de lactato de etilo detectada, mayor que en las muestras AB y PE. Esto último sucede también para la γ -caprolactona y la γ -nonanolactona.

A la vista de los resultados de cuantificación de los compuestos a lo largo de las fermentaciones, observamos que existen compuestos volátiles con diferentes comportamientos:

- presentes desde el día 0, por lo tanto, el origen puede deberse al sustrato, o al *scooby*.
- van apareciendo a lo largo de la fermentación alcohólica, maloláctica o acética, por lo tanto, producidos por el *scooby*. Ejemplos: ácido fenilacético (Figura 6) y acetoina (Figura 7).
- que se generan a lo largo de la fermentación dependiendo del sustrato. Es posible que la producción dependa del tipo de seta.

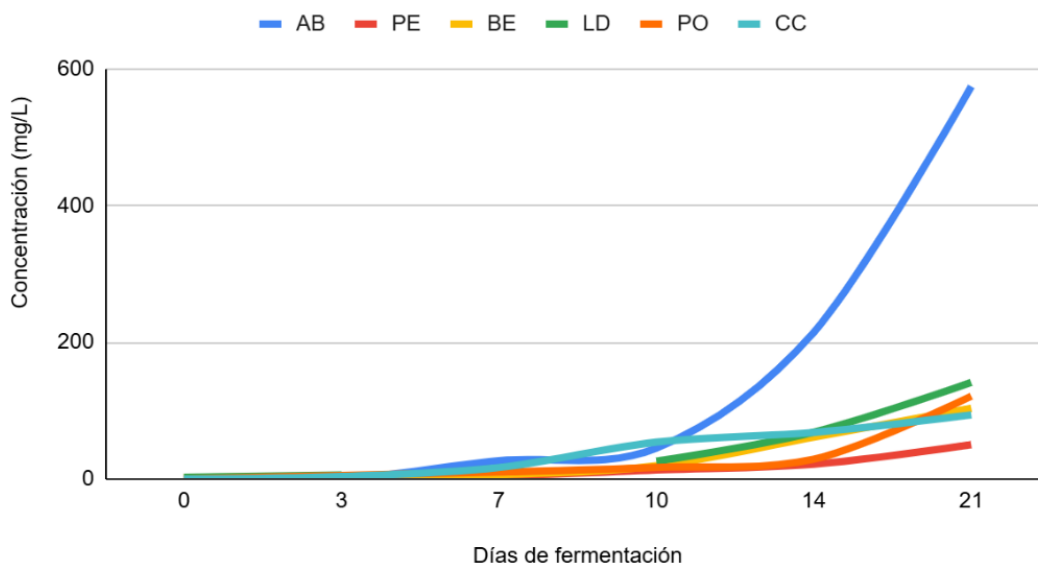


Figura 6. Evolución de la concentración de ácido fenilacético en las 6 kombuchas a lo largo de la fermentación.

Como podemos observar en la figura 6, el ácido fenilacético aumenta ligeramente durante la fermentación de la mayoría de las muestras. Sin embargo, se da una mayor producción de este compuesto tras 10 días de fermentación de la kombucha AB, procedente de champiñón común, en comparación con el resto de las muestras. Este ácido es el responsable de olores similares a la miel, olores dulces y agradables.

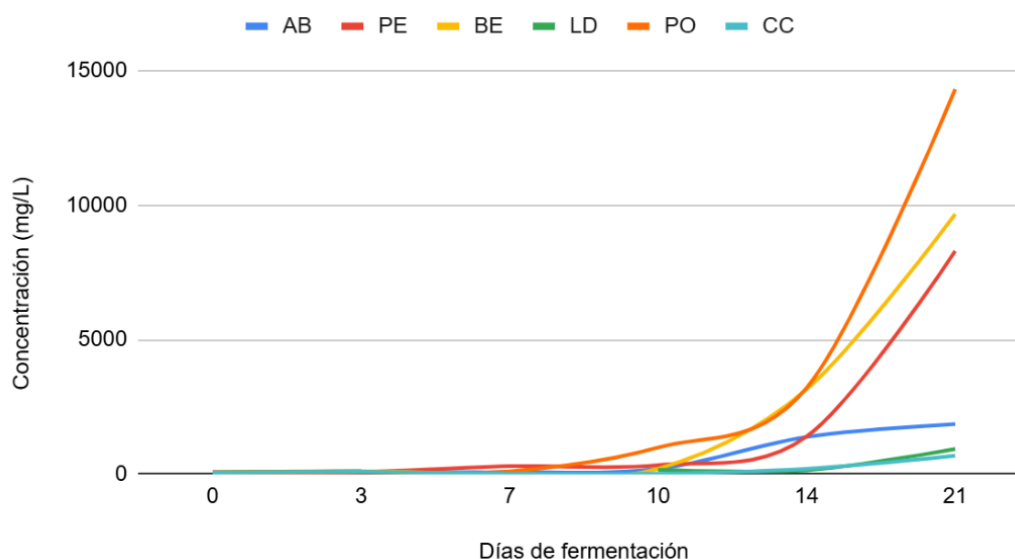


Figura 7. Evolución de la concentración de acetoína en las 6 kombuchas a lo largo de la fermentación.

Los compuestos volátiles con mayor concentración en las kombuchas en los últimos días de fermentación son el ácido acético y la acetoína. En la figura 7 aparece la evolución de la acetoína en las 6 kombuchas a lo largo de la fermentación. En el día 21 las kombuchas PO (seta de ostra), BE (boletus) y PE (seta de cardo) tienen una concentración superior respecto a las muestras AB (champiñón común), LD (níscolo) y CC (rebozuelo). Este compuesto, aún estando a una concentración muy alta (cientos de mg/L en las muestras de día 10 analizadas mediante olfatometría) no aparece como detectado en la tabla 1 debido a que tiene un umbral de olfacción muy elevado. Sin embargo, otros compuestos presentes en mucha menor concentración en las kombuchas sí aparecen como identificados mediante el análisis sensorial olfatométrico realizado en las kombuchas AB, PE y LD; como el butirato de etilo (Figura 8).

Existen compuestos que aparecen solo en algunas kombuchas, los últimos días de la fermentación y en bajas concentraciones. Un ejemplo de este caso es el diacetilo, relacionado con olores lácticos desagradables en cerveza (Xu et al., 2024). Este compuesto junto con el lactato de etilo y acetoína se asocia con aromas no deseados en las kombuchas (Rajendran et al., 2023). Esta es una de las razones por la que duración óptima de las fermentaciones de las kombuchas son 10 días. Otros parámetros físico-químicos, como el pH, también relacionados con el contenido de ácidos, determinan el tiempo óptimo de fermentación.

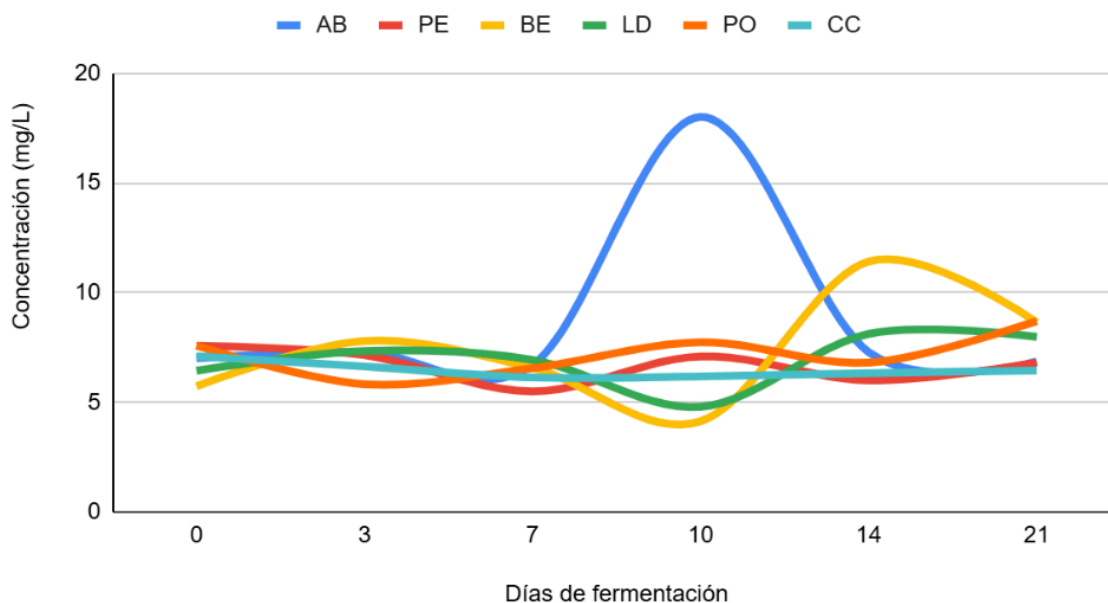


Figura 8. Evolución de la concentración de butirato de etilo en las 6 kombuchas a lo largo de la fermentación.

Otros compuestos, como el butirato de etilo, se mantienen constantes durante el proceso fermentativo, como puede verse en la figura 8. Este compuesto, se encuentra en todas las muestras al principio de la fermentación alrededor de 7 mg/L y se mantiene en la mayoría de las muestras en el intervalo 5-10 mg/L. Pese a la presencia de una mayor concentración de compuesto en la kombucha AB en el día 10 y en la kombucha BE en el día 14, el aumento se podría considerar ligero, ya que en su máximo no llega a alcanzar los 20 mg/L. Debido a que aparece en el principio de la fermentación y se mantiene, podemos concluir que es un compuesto presente en todas las especies de setas y el avance de la fermentación por los diferentes microorganismos del *scooby* no tiene ningún impacto en el butirato de etilo.

4.4. Cuantificación de volátiles en kombuchas comerciales y comparación con kombuchas experimentales

La metodología para cuantificar los volátiles mayoritarios se aplicó a kombuchas comerciales dos días diferentes por triplicado, para realizar el estudio de reproducibilidad de los estándares internos, aunque también se han procesado los volátiles presentes en las mismas. A la vista de los datos contenidos en la tabla A4, podemos decir que existen grandes diferencias entre las kombuchas comerciales y las experimentales. En las kombuchas comerciales no se encuentra acetoína, ni tampoco γ -valerolactona, γ -caprolactona ni γ -nonalactona. Tampoco se encuentra diacetilo en ninguna de las muestras. Sin embargo, sí que se encuentran la mayoría de los compuestos fermentativos (ésteres, alcoholes y ácidos) encontrados en las kombuchas experimentales. Las diferencias encontradas pueden ser debidas a los tratamientos aplicados a las kombuchas comerciales durante su proceso productivo.

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente trabajo han sido las siguientes:

- El análisis olfatométrico de 3 kombuchas experimentales procedentes de diferentes setas indica que el aroma de las mismas está formado por 25 zonas de olor, de las cuales el 72% se ha localizado el compuesto responsable de las mismas. Dichos compuestos pertenecen a diferentes familias químicas, principalmente ésteres.
- La base del aroma de estas muestras está formada por β -feniletanol, 4-etilfenol y ácido isovaleriánico, los cuales son compuestos fermentativos. Sin embargo, los 4 ésteres encontrados han resultado discriminantes entre las muestras.
- La cuantificación de los volátiles mayoritarios a lo largo de la fermentación de 6 kombuchas experimentales revela la existencia de 28 compuestos cuya evolución sigue patrones diferentes. La mayoría de ellos apenas están presentes el día 0 y su concentración aumenta con la fermentación. Los más abundantes son los de origen fermentativo como la acetoína, lactato de etilo y ácido acético.

CONCLUSIONS

The conclusions of this study are:

- Olfactometric analysis of three experimental kombuchas from different mushrooms indicates that their aroma consists of 25 odor zones, and 72% of them have been identified as responsible compounds. These compounds belong to different chemical families, mainly esters.
- The basis of the aroma of these samples is composed by β -phenylethanol, 4-ethylphenol, and isovaleric acid, which are fermentative compounds. However, the four esters found have proved to be discriminating compounds between the samples.
- The quantification of the major volatiles throughout the fermentation of six experimental kombuchas reveals the presence of 28 compounds whose evolution follows different patterns. Most of them are barely present on day 0 and their concentration increases with fermentation. The main compounds are those of fermentative origin, such as acetoin, ethyl lactate, and acetic acid.

6. VALORACIÓN PERSONAL

La realización de este trabajo de final de grado (TFG) ha supuesto tanto un aprendizaje de nuevos conocimientos ligados al grado como un crecimiento personal. Trabajar codo con codo con investigadores ha sido una experiencia muy enriquecedora, personal y profesionalmente.

Por una parte, he podido aprender de primera mano la forma de trabajo de un laboratorio de investigación profesional de referencia, como es el Laboratorio de Análisis del Aroma y Enología (LAAE). Haber formado una pequeña parte del laboratorio durante estos meses ha significado adentrarme y conocer algo más del mundo de los aromas, poco tocado en la formación del grado. Me ha resultado de gran interés aprender acerca de los diferentes compuestos que interaccionan y dan el olor característico a un producto, pese a que muchos de esos compuestos aromáticos pasen desapercibidos en el olor general. También, aprender acerca de las técnicas usadas para analizar los distintos aromas de un alimento (cromatografía, olfatometría, etc) ha sido sumamente enriquecedor para mi currículum como graduado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

Por otra parte, el valor humano de este grupo de investigación es inmenso. Sus integrantes me han ayudado y acompañado durante todo el proceso de investigación del TFG, resolviendo mis dudas acerca de las técnicas de análisis utilizadas y enseñándome a trabajar en el ámbito de un laboratorio profesional de investigación. Su ayuda no se queda solo ahí, me he sentido integrado en el laboratorio desde el primer día y trabajar en el TFG se ha hecho mucho más ameno gracias a ellos.

Finalmente, las investigaciones de este grupo se centran en la química del aroma, no solo de la enología, sino de otros ámbitos como alimentos (kombucha, manzanas) o incluso los aromas utilizados en los detergentes. Esta variedad de investigaciones me ha enseñado las aplicaciones prácticas de sus análisis en la industria, especialmente la agroalimentaria, y me ha abierto también a la posibilidad de la investigación como ocupación profesional de mi carrera.

Debido a todos los factores comentados anteriormente, la realización del TFG ha sido una experiencia sumamente enriquecedora y, desde mi punto de vista, necesaria para culminar los estudios del Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos cursado en estos últimos cuatro años.

7. BIBLIOGRAFÍA

Al-Dulaimi, F.K.Y., Abd-Alwahab, W.I.A. y Hasan, A.S. (2018). "Bioactivity study of kombucha black tea and kombucha with skim milk on some of physiological and biochemical parameters in male albino rats." *International Journal of Pharmaceutical Research*, 10(1), pp. 301–306.

Bueno, F., Chouljenko, A. y Sathivel, S. (2021). "Development of coffee kombucha containing *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei*: Gastrointestinal simulations and DNA microbial analysis." *LWT*, 142, 110980. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110980>

Cheung, C.K.P. (2010). "The nutritional and health benefits of mushrooms." *Nutrition Bulletin*, 35(4), pp. 292–299. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2010.01859.x>

Coton, M., Pawtowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloume-Labarthe, L., Fall, A., Daube, G. y Coton, E. (2017). "Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods." *FEMS Microbiology Ecology*, 93(5), fix048. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsec/fix048>

de las Nieves Siles-Sánchez, M., Tejedor-Calvo, E., Jaime, L., Santoyo, S. y Morales, D. (2024). "Green Extraction Technologies and Kombucha Elaboration Using Strawberry Tree (*Arbutus unedo*) Fruits to Obtain Antioxidant and Anti-Inflammatory Fractions." *Food and Bioprocess Technology*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11947-024-03451-8>

Dravnieks, A. (1985). *Atlas of odor character profiles*. Philadelphia, PA: ASTM. ISBN: 0803104561 [Consultado 05-05-2025].

Emiljanowicz, K.E. y Malinowska-Pańczyk, E. (2019). "Kombucha from alternative raw materials – The review." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(19), pp. 3185–3194. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1679714>

Ferreira, V., López, R. y Cacho, J.F. (2000). "Identification of impact odorants of wines." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12), pp. 5813–5819. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5_18

Ferreira De Miranda, J., Ruiz, L.F., Silva, C.B., Uekane, T.M., Silva, K.A., Gonçalves, A.G.M.M. y Fernandes, F.F. (2022). "Kombucha: a Review of substrates, regulations, composition, and

biological properties.” *Journal of Food Science*, 87(2), pp. 503–527. DOI: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16029>

Gaggia, F., Baffoni, L., Galiano, M., Nielsen, D.S., Jakobsen, R.R., Castro-Mejía, J.L., Bosi, S., Truzzi, F., Musumeci, F., Dinelli, G. y Di Giola, D. (2019). “Kombucha Beverage from green, black and Rooibos teas: a comparative study looking at microbiology, chemistry and antioxidant activity.” *Nutrients*, 11(1), 1. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu11010001>

Jingqian, S., Qingqing, T., Qian, T., Zhiyong, T. y Minhe, Y. (2023). “Research progress on alternative kombucha substrate transformation and the resulting active components.” *Frontiers in Microbiology*, 14. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1254014>

Li, Y., Zhang, X. y Wang, L. (2023). “Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry for the determination of aroma-active components in soy sauce.” *Food Chemistry*, 405, 134961. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109838>

Tokitomo, Y., Steinhaus, M., Büttner, A., & Schieberle, P. (2005). “Odor-active constituents in fresh pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) by quantitative and sensory evaluation.” *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69(7), 1323-1330. DOI: <https://doi.org/10.1271/bbb.69.1323>

May, A., Narayanan, S., Alcock, J., Varsani, A., Maley, C. y Aktipis, A. (2019). “Kombucha: a novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem.” *PeerJ Life & Environment*, 7, e7565. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.7565>

Milheiro, J., Filipe-Ribeiro, L., Cosme, F. y Nunes, F.M. (2023). “Development and validation of a multiple headspace solid-phase microextraction method for accurate and precise analysis of the aroma of Tawny and White Port wines.” *Food Chemistry*, 421, 136154. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136154>

Morales, D., de la Fuente-Nieto, L., Marco, P. y Tejedor-Calvo, E. (2024). “Elaboration and Characterization of Novel Kombucha Drinks Based on Truffles (*Tuber melanosporum* and *Tuber aestivum*) with Interesting Aromatic and Compositional Profiles.” *Foods*, 13(13), 2162. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods13132162>

Ortega, C., Lopez, R., Cacho, J. y Ferreira, V. (2001). “Fast analysis of important wine volatile compounds: Development and validation of a new method based on gas chromatographic-flame

ionisation detection analysis of dichloromethane microextracts.” *Journal of Chromatography A*, 923(1–2), pp. 205–214. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00972-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00972-4)

Prodeca (s.f.). *El auge de la kombucha en España: un crecimiento exponencial del 580% en dos años*. Disponible en: <https://www.prodeca.cat/es/actualidad/el-auge-de-la-kombucha-en-espana-un-crecimiento-exponencial-del-580-en-dos-anos> [Consultado 7-05-2025].

Rajendran, S., Silcock, P. y Bremer, P. (2023). “Flavour volatiles of fermented vegetable and fruit substrates: A review.” *Molecules*, 28(7), 3236. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28073236>

Reglamento (UE) 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L304, 22 de noviembre de 2011. Disponible en: <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/1169/2018-01-01/spa> [Consultado 25-05-2025].

Roncero-Ramos, I. y Delgado-Andrade, C. (2017). “The beneficial role of edible mushrooms in human health.” *Current Opinion in Food Science*, 14, pp. 122–128. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.04.002>

Tejedor-Calvo, E., García-Barreda, S., Sánchez, S., Morales, D., Soler-Rivas, C., Ruiz-Rodriguez, A., Sanz, M.Á., Garcia, A.P., Morte, A. y Marco, P. (2021). “Supercritical CO₂ extraction method of aromatic compounds from truffles.” *LWT*, 150, 111954. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111954>

Xu, Y., Yao, L., Song, S., Sun, M., Wang, H., Yu, C., Liu, Q. y Feng, T. (2024). “Revealing the microbial diversity and volatile flavor formation in finger citron kombucha by metagenomic and GC-MS analysis.” *Food Bioscience*, 59, p.104087. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104087>

ANEXO 1

Tabla A1. Concentración (mg/L) de los compuestos mayoritarios del aroma de la kombucha BE (*Boletus edulis*) a lo largo de los días de fermentación.

K-BE Días	0	3	7	10	14	21
Diacetilo	<LD	<LD	<LD	<LD	2,79	5,97
Butirato de etilo	0,57	0,78	0,66	0,41	1,14	0,87
Hexanal	<LD	<LD	<LD	<LD	9,37	11,88
Isobutanol	<LD	<LD	1,10	0,66	1,53	3,97
Acetato de isoamilo	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
1-butanol	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Alcohol isoamílico	<LD	<LD	37,53	24,82	51,90	55,68
Acetoína	52,33	101,64	7,64	195,63	3151,91	9668,86
Lactato de etilo	<LD	<LD	<LD	69,55	256,11	240,28
1-hexanol	<LD	<LD	<LD	0,40	<LD	<LD
c-3-hexenol	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
3-octanol	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Octanoato de etilo	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Ácido acético	<LD	<LD	<LD	5339,67	<LD	12751,06
Ácido propanoico	<LD	<LD	<LD	11,28	<LD	38,49
Ácido isobutírico	<LD	<LD	<LD	39,65	<LD	72,79
γ-valerolactona	17,30	31,06	40,87	18,09	71,15	136,04
γ-butirolactona	2,33	4,99	5,25	8,05	32,26	65,08
γ-caprolactona	<LD	<LD	<LD	<LD	30,57	185,51
Ácido isovalerianico	<LD	<LD	1,48	<LD	25,48	30,54
Ácido hexanoico	0,41	0,54	0,26	5,60	0,77	1,14
Alcohol bencílico	0,62	1,35	1,39	0,28	1,08	1,06
β-feniletanol	0,10	0,19	0,43	2,12	3,70	6,53
γ-nonolactona	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Ácido octanoico	0,08	0,17	0,09	0,08	0,29	0,24
Ácido nonanoico	2,04	5,40	7,06	<LD	7,85	3,33
Ácido decanoico	0,11	0,18	0,15	0,26	1,40	0,10
Ácido fenilacético	2,30	4,56	6,46	19,24	61,21	103,38

Tabla A2. Concentración (mg/L) de los compuestos mayoritarios del aroma de la kombucha PO (*Pleurotus ostreatus*) a lo largo de los días de fermentación.

K-PO	0	3	7	10	14	21
Días						
Diacetilo	<LD	<LD	<LD	<LD	1,72	7,08
Butirato de etilo	0,76	0,58	0,66	0,77	0,68	0,87
Hexanal	6,93	3,87	<LD	<LD	<LD	<LD
Isobutanol	<LD	<LD	0,65	0,71	<LD	<LD
Acetato de isoamilo	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
1-butanol	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Alcohol isoamílico	<LD	<LD	16,12	14,04	8,37	<LD
Acetoína	56,93	73,97	94,65	984,41	3203,77	14316,86
Lactato de etilo	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	50,45
1-hexanol	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
c-3-hexenol	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
3-octanol	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Octanoato de etilo	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Ácido acético	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	8480,62
Ácido propanoico	<LD	<LD	<LD	12,11	34,28	100,47
Ácido isobutírico	<LD	<LD	<LD	13,93	33,46	119,50
γ -valerolactona	16,57	22,44	31,48	43,03	57,93	68,59
γ -butirolactona	3,05	3,83	4,85	11,73	24,00	41,47
γ -caprolactona	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Ácido isovalerianico	1,09	1,82	2,74	5,94	15,09	32,35
Ácido hexanoico	1,08	1,25	1,95	2,48	3,02	4,15
Alcohol bencílico	<LD	<LD	0,25	0,31	0,35	0,32
β -feniletanol	<LD	<LD	0,89	1,16	0,99	2,42
γ -nonalactona	<LD	<LD	<LD	1,73	1,91	7,10
Ácido octanoico	0,18	0,21	0,29	0,39	0,27	0,51
Ácido nonanoico	2,61	4,15	4,71	6,72	2,47	5,13
Ácido decanoico	<LD	0,10	0,11	0,97	<LD	0,19
Ácido fenilacético	<LD	5,31	10,13	17,05	29,06	121,18

Tabla A3. Concentración (mg/L) de los compuestos mayoritarios del aroma de la kombucha CC (*Cantharellus cibarius*) a lo largo de los días de fermentación.

K-CC Días	0	3	7	10	14	21
Diacetilo	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Butirato de etilo	0,71	0,66	0,61	0,62	0,63	0,65
Hexanal	11,57	2,59	<LD	<LD	<LD	<LD
Isobutanol	<LD	<LD	6,38	7,79	5,38	2,82
Acetato de isoamilo	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
1-butanol	<LD	<LD	1,05	1,99	1,10	<LD
Alcohol isoamílico	<LD	<LD	99,06	146,39	116,66	81,72
Acetoína	50,68	81,98	12,78	12,40	191,10	675,47
Lactato de etilo	<LD	<LD	<LD	<LD	30,29	78,05
1-hexanol	<LD	0,33	1,53	<LD	0,10	0,20
c-3-hexenol	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
3-octanol	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Octanoato de etilo	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Ácido acético	<LD	<LD	<LD	3521,17	14352,67	12531,89
Ácido propanoico	<LD	<LD	<LD	<LD	7,01	14,04
Ácido isobutírico	<LD	<LD	<LD	5,68	11,36	12,53
γ -valerolactona	14,75	26,36	33,74	54,59	108,63	177,40
γ -butirolactona	2,52	4,11	3,54	3,76	7,25	14,75
γ -caprolactona	<LD	<LD	<LD	9,33	37,48	129,73
Ácido isovalerianico	<LD	<LD	2,89	9,53	18,54	29,96
Ácido hexanoico	3,03	3,24	0,72	0,50	1,30	2,35
Alcohol bencílico	<LD	0,09	0,25	0,21	0,18	0,15
β -feniletanol	<LD	0,15	1,52	3,27	4,34	5,27
γ -nonalactona	<LD	<LD	2,24	3,70	5,35	8,11
Ácido octanoico	0,20	0,26	0,16	0,10	0,22	0,76
Ácido nonanoico	2,07	10,90	5,07	3,65	1,48	2,53
Ácido decanoico	<LD	0,67	0,160	0,18	0,11	0,18
Ácido fenilacético	<LD	3,78	16,85	53,93	68,18	93,84

Tabla A4. Concentración (mg/L) de los compuestos mayoritarios del aroma de las kombuchas comerciales.

Día	KB1		KB2		KB3	
	1	2	1	2	1	2
Diacetilo	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Butirato de etilo	0,63 ± 0,14	0,74 ± 0,05	0,73 ± 0,04	0,67 ± 0,05	0,79 ± 0,06	0,77 ± 0,05
Hexanal	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Isobutanol	2,84 ± 0,49	3,01 ± 0,64	3,15 ± 0,18	2,02 ± 1,83	12,65 ± 1,33	9,98 ± 0,29
Acetato de isoamilo	<LD	<LD	<LD	<LD	0,47 ± 0,03	0,37 ± 0,01
1-butanol	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Alcohol isoamílico	98,33 ± 7,61	94,62 ± 19,25	101,97 ± 1,84	97,27 ± 15,48	220,71 ± 4,57	184,17 ± 8,67
Acetoína	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Lactato de etilo	274,54 ± 40,92	285,48 ± 62,54	291,74 ± 25,89	283,38 ± 63,04	1056,59 ± 60,51	904,44 ± 15,33
1-hexanol	0,10 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,07 ± 0,00	0,33 ± 0,02
c-3-hexenol	<LD	<LD	<LD	<LD	0,20 ± 0,01	<LD
3-octanol	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Octanoato de etilo	0,79 ± 0,04	0,61 ± 0,14	0,58 ± 0,00	0,64 ± 0,05	<LD	<LD
Ácido acético	9186,05 ± 1995,19	8621,88 ± 2156,93	11082,49 ± 1013,37	9095,11 ± 2632,52	9737,23 ± 1088,94	7311,51 ± 126,36
Ácido propanoico	4,86 ± 1,03	4,93 ± 1,25	5,97 ± 0,55	4,78 ± 0,77	6,43 ± 0,35	6,34 ± 0,15
Ácido isobutírico	6,88 ± 1,54	7,02 ± 1,92	6,81 ± 0,22	6,74 ± 1,21	8,86 ± 0,54	7,46 ± 0,18
γ -valerolactona	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
γ -butirolactona	32,2 ± 5,89	33,69 ± 7,19	33,96 ± 3,25	31,72 ± 7,22	11,89 ± 0,58	9,97 ± 0,50
γ -caprolactona	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Ácido isovalerianico	5,68 ± 0,89	5,81 ± 1,57	6,14 ± 0,21	5,8 ± 1,66	8,70 ± 0,35	7,40 ± 0,42
Ácido hexanoico	1,86 ± 0,13	1,74 ± 0,38	1,90 ± 0,20	1,81 ± 0,30	1,37 ± 0,06	1,18 ± 0,01
Alcohol bencílico	0,98 ± 0,10	0,94 ± 0,21	1,03 ± 0,11	0,96 ± 0,19	7,20 ± 0,34	6,12 ± 0,04
β -feniletanol	4,46 ± 1,83	4,54 ± 0,92	4,49 ± 0,06	5,25 ± 0,60	6,52 ± 1,26	6,97 ± 0,16
γ -nonalactona	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Ácido octanoico	1,53 ± 0,18	1,44 ± 0,29	1,48 ± 0,10	1,47 ± 0,16	1,13 ± 0,07	1,46 ± 0,04
Ácido nonanoico*	-	-	-	-	-	-
Ácido decanoico*	-	-	-	-	-	-
Ácido fenilacético	12,11 ± 1,42	11,96 ± 1,41	12,66 ± 1,32	11,14 ± 2,51	11,53 ± 0,91	10,46 ± 0,84

* No se han podido cuantificar estos compuestos debido a la presencia de interferencias en los cromatogramas.