



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
QUERÉTARO  
FACULTAD DE QUÍMICA**



**“Estandarización del proceso de fermentación y evaluación  
sensorial de una bebida tipo kombucha utilizando infusiones  
herbales”**

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestría en  
Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

**I.A. Martha Elena Vázquez Morales**

Dirigida por:

**Dra. Silvia Lorena Amaya Llano**

Abril 2021



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos  
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Estandarización del proceso de fermentación y evaluación sensorial de una bebida tipo kombucha utilizando infusiones herbales”

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Presenta:**

I. A. Martha Elena Vázquez Morales

**Dirigido por:**

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Presidente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Eduardo Castaño Tostado  
Secretario

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Minerva Ramos Gómez  
Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Sofía María Arvizu Medrano  
Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Karina Cruz Aldaco  
Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Directora de la Facultad

\_\_\_\_\_  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
Abril 2021  
México

### **DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:**

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.



Martha Elena Vázquez Morales

## DEDICATORIAS

*A mis padres y mis hermanos por su apoyo y amor incondicional. Por ser siempre mi mejor ejemplo a seguir.*

*A mi hermano Juan Antonio Q.E.P.D. de quien aprendí que los sueños solo se cumplen trabajando duro por ellos.*

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca económica otorgada para la realización de este proyecto de investigación.

Al posgrado de Alimentos, Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro por la disposición de equipos para la realización del proyecto, así como por los conocimientos brindados.

A la Dra. Silvia Lorena Amaya Llano por la oportunidad y confianza brindada durante el desarrollo del proyecto de investigación.

A los doctores, miembros de mi comité evaluador Dr. Eduardo Castaño Tostado, Dra. Minerva Ramos Gómez, Dra. Sofía Arvizu Medrano y Dra. Karina Cruz Aldaco por compartir sus conocimientos y por sus aportaciones a este trabajo.

A las Doctoras Sofía Arvizu Medrano y Dalia Miranda por el apoyo y préstamo de equipo e instalaciones requeridos durante la fase experimental.

A mis compañeros y amigos de laboratorio por su gran apoyo y aportaciones durante el proyecto.

A mis amigas Isa, Ite, Lupita, Fer e Italia por su apoyo académico y emocional, así como por su cariño incondicional.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Infusiones herbales.....	3
2.1.1 Capacidad antioxidante de plantas y sus infusiones.....	4
2.2 Compuestos bioactivos de las infusiones herbales.....	4
2.2.1 Jamaica ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> ).....	6
2.2.2 Hierbabuena ( <i>Mentha spicata</i> L.).....	7
2.2.3 Romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ).....	8
2.2.4 Manzanilla ( <i>Matricaria chamomilla</i> ).....	8
2.2.5 Zacate de Limón ( <i>Cymbopogon citratus</i> ).....	8
2.2.6 Hojasén ( <i>Flourensia cernua</i> ).....	9
2.3 Polifenoles.....	9
2.4 Bebidas fermentadas.....	9
2.4.1 Fermentación de plantas y vegetales.....	10
2.5 Kombucha.....	11
2.5.1 Producción de kombucha.....	12
2.5.2 Características químicas y nutricionales de la kombucha.....	14
3. JUSTIFICACIÓN.....	17
4. OBJETIVOS.....	18
4.1 Objetivo general.....	18
4.2 Objetivos específicos.....	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19

5.1 Materiales .....	19
5.1.1 Material vegetal .....	19
5.1.2 Consorcio microbiano.....	19
5.1.3 Material químico .....	19
5.2 Métodos .....	19
5.2.1 Determinación del efecto de la temperatura de preparación de las infusiones sobre los compuestos polifenólicos totales extraídos.....	19
5.2.2 Formulación de las mezclas de infusiones .....	21
5.2.3 Acondicionamiento del inóculo de kombucha.....	21
5.2.5 Evaluación del efecto de la temperatura sobre la fermentación de la Kombucha .....	25
5.2.6 Evaluación sensorial.....	27
5.3 Análisis estadístico .....	28
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29
6.1 Efecto de la temperatura sobre el contenido polifenólico y capacidad antioxidante de las infusiones no fermentadas.....	29
6.2 Formulación de las mezclas de infusiones .....	32
6.3 Estudio del efecto de la homogeneización de la biopelícula del consorcio bacteriano sobre la extracción de levaduras y bacterias .....	34
6.4 Efecto del estado físico del inóculo iniciador sobre el contenido polifenólico, pH y producción de biomasa durante la fermentación.....	36
6.5 Efecto de la temperatura sobre las características de la kombucha.....	42
6.5.1 Compuestos polifenólicos totales .....	42
6.5.3 Capacidad antioxidante .....	54
6.5.4 Análisis microbiológico .....	56

6.6 Evaluación sensorial.....	59
6.7 Análisis proximal.....	62
7. CONCLUSIONES .....	64
8. REFERENCIAS .....	66
9. ANEXOS.....	75
9.1 Formatos empleados en la evaluación sensorial.....	75
9.1.1 Cuestionario sobre la frecuencia de consumo de la bebida .....	75
9.1.2 Prueba de aceptabilidad sensorial de las kombuchas.....	75

Dirección General de Bibliotecas UAO



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Infusiones y sus compuestos bioactivos .....	5
Cuadro 2. Diseño experimental para la extracción de polifenoles totales de infusiones herbales .....	20
Cuadro 3. Diseño experimental para el proceso de homogeneización del consorcio de kombucha .....	23
Cuadro 4. Capacidad antioxidante de infusiones herbales preparadas a 95 °C ....	31
Cuadro 5. Factores determinantes de la formulación de mezclas de infusiones ...	34
Cuadro 6. Contenido polifenólico, capacidad antioxidante y pH de las mezclas de infusiones.....	34
Cuadro 7. Efecto del tiempo de homogeneización sobre cantidad de levaduras, BAA y BAL extraídas del consorcio bacteriano.....	36
Cuadro 8. Valores de pH en bebidas kombucha durante 12 días de fermentación a temperaturas de 25 °C y 30 °C .....	46
Cuadro 9. Acidez titulable en bebidas kombucha durante 12 días de fermentación a temperaturas de 25 °C y 30 °C .....	47
Cuadro 10. Contenido de azúcares reductores en bebidas kombucha durante 12 días de fermentación a temperaturas de 25 °C y 30 °C.....	49
Cuadro 11. Peso del consorcio en bebidas kombucha durante 12 días de fermentación a temperaturas de 25 °C y 30 °C .....	51
Cuadro 12. Capacidad antioxidante por ABTS y DPPH en bebidas kombucha durante 12 días de fermentación a temperaturas de 25 °C y 30 °C.....	56

Cuadro 13. Concentración de levaduras BAA y BAL en consorcios de kombucha durante 12 días de fermentación a temperaturas de 25 °C y 30 °C.....	57
Cuadro 14. Concentración de levaduras BAA y BAL en bebidas kombucha durante 12 días de fermentación a temperaturas de 25 °C y 30 °C.....	59
Cuadro 15. Contenido de proteína, minerales y azúcares de kombuchas.....	63

### ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Procedimiento para la adaptación del consorcio de Kombucha en té negro endulzado .....	22
Figura 2. Procedimiento para la homogeneización del consorcio de Kombucha ...	23
Figura 3. Efecto de la temperatura en la extracción de compuestos polifenólicos totales de infusiones herbales.....	30
Figura 4. pH de infusiones herbales preparadas a 95 °C .....	32
Figura 5. Dispersión de datos del peso de la biopelícula durante la fermentación de kombuchas con consorcio sólido y consorcio homogeneizado.....	38
Figura 6. Dispersión de datos del pH durante la fermentación de mezclas de infusiones con consorcio sólido y homogeneizado .....	40
Figura 7. Dispersión de datos del contenido polifenólico durante la fermentación de mezclas de infusiones con consorcio sólido y homogeneizado .....	42
Figura 8. Cambio en el contenido de compuestos polifenólicos totales durante el proceso de fermentación a 25 y 30 °C durante 12 días .....	45

Figura 9. Evolución de kombucha y consorcio de té negro durante 12 días de fermentación. (A) 25 °C, (B) 30°C.....	52
Figura 10. Evolución de kombucha y consorcio JMR durante 12 días de fermentación. (A) 25 °C, (B) 30°C.....	53
Figura 11. Evolución de kombucha y consorcio de HLH durante 12 días de fermentación. (A) 25 °C, (B) 30°C.....	54
Figura 12. Frecuencia de consumo de kombucha por el panel.....	61
Figura 13. Evaluación de descriptores sensoriales de kombucha.....	62
Figura 14. Preferencia sensorial de kombuchas.....	62

Dirección General de Bibliotecas UAO

## RESUMEN

La kombucha es una bebida elaborada, tradicionalmente, a partir de té negro (*Camellia sinensis*) endulzado, fermentado por un consorcio de bacterias y levaduras. Durante la fermentación se producen diversos metabolitos beneficiosos para la salud. La producción de kombucha en México se realiza de manera artesanal, bajo condiciones de fermentación no establecidas limitando la eficiencia del proceso. Por otra parte, es de interés estudiar la fermentación de infusiones distintas al té negro y evaluar las características fitoquímicas, físicas, químicas y sensoriales de las bebidas obtenidas. El objetivo de este proyecto fue estandarizar el proceso de fermentación y caracterizar bebidas tipo kombucha elaboradas a partir de mezclas de infusiones herbales. Se fermentaron mezclas de infusiones de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y romero (*Rosmarinus officinalis*) (JMR); y hierbabuena (*Mentha spicata* L.), zacate de limón (*Cymbopogon citratus*) y hojasén (*Flourensia cernua*) (HLH) con un consorcio de kombucha comercial. Se evaluó el efecto de las condiciones de fermentación sobre el contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante, propiedades físicas, químicas, microbiológicas y sensoriales. Adicionalmente, los resultados se compararon con una kombucha tradicional de té negro (TN). La fermentación se realizó a 25 °C y 30 °C por 12 días. Las condiciones de fermentación, de 30 °C durante 6 días, permitieron obtener la mayor cantidad de polifenoles totales y un pH de 2.5 el cual favorece la inocuidad de la bebida. La cantidad relativa de polifenoles totales en la kombucha fermentada después de 12 días, comparada con infusión no fermentada, de TN, JMR y HLH incrementó en 30.7%, 58.2% y 49.9%, respectivamente a 30 °C. Se observó, además, un incremento en la capacidad antioxidante. Se identificaron los grupos microbianos de levaduras, bacterias acidoacéticas y bacterias acidolácticas, tanto en la biopelícula producida por el consorcio como en la bebida. Aunque las tres kombuchas (TN, JMR y HLH) tuvieron una evaluación sensorial satisfactoria, se observó una diferencia en la preferencia en función del género. Las mezclas de infusiones formuladas fueron utilizadas exitosamente como medio de fermentación por el consorcio de kombucha, produciendo bebidas con características físicas, químicas y aceptación sensorial similares a las de la kombucha tradicional.

### Palabras clave

Consortio microbiano, capacidad antioxidante, compuestos polifenólicos.

## ABSTRACT

Kombucha is a fermented tea beverage which is traditionally prepared by sweetened black tea (*Camellia sinensis*), produced by a consortium of bacteria and yeast. During fermentation several metabolites are produced, which exert human health benefits. The production of kombucha in México is carried out under uncontrolled fermentation conditions, limiting the efficiency of the process. Besides, the use of infusions other than black tea can generate beverages with different phytochemical and sensory profiles. The aim of this project was standardize the fermentation process and characterizing kombucha-like beverages elaborated from herbal infusion mixtures. Infusion mixtures of roselle (*Hibiscus sabdariffa*), chamomile (*Matricaria chamomilla*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) (JMR); and peppermint (*Mentha spicata* L.), lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and senna leaves (*Flourensia cernua*) (HLH) were used for kombucha fermentation. The effect of fermentation conditions on total polyphenolic compounds, antioxidant capacity, physical, chemical, microbiological and sensory properties was evaluated. Additionally, the results were compared with a traditional black tea kombucha (TN). Fermentation was conducted at 25 °C and 30 °C for 12 days. Tea fermentation at 30 °C along 6 days, allowed to obtain the highest amounts of total polyphenols and a pH of 2.5, which favors the safety of the beverage. The relative amounts of total polyphenols in the fermented kombucha after 12 days, compared to the unfermented tea, to TN, JMR and HLH increased by 30.7%, 58.2% and 49.9%, respectively at 30 °C. An increase in antioxidant capacity was also observed, although this was not proportional to the polyphenolic increase. Microbial groups of yeasts, acetic acid bacteria and lactic acid bacteria were identified both in the biofilm produced by the consortium and in the beverage. Although all three kombuchas had a satisfactory sensory evaluation, a variation in preference based on gender was observed. In conclusion, the formulated infusions mixtures were used successfully as a fermentation medium by the kombucha consortium, producing a drink with physicochemical characteristics and sensory acceptance similar to traditional kombucha made from black tea.

### Key words

Microbial consortium, antioxidant capacity, polyphenolic compounds

## 1. INTRODUCCIÓN

La alimentación es uno de los principales factores que influye en el estado de salud de un individuo. El consumo de una dieta nutritiva es fundamental en la prevención de enfermedades crónico-degenerativas (OMS, 2018). La ingesta de vegetales se asocia con numerosos resultados de salud positivos (Emley *et al.*, 2017). En la actualidad se busca la aplicación de conocimientos y tecnología para mantener o mejorar la calidad nutricional de los alimentos, lo cual puede llevar a cabo de diversas maneras, por ejemplo, mediante la conservación de nutrientes sensibles, adición de nutrientes, eliminación de antinutrientes, así como el diseño de alimentos para optimizar la salud y reducir el riesgo de enfermedades (Floros *et al.*, 2010).

Las infusiones herbales se han consumido desde la edad antigua como tratamiento de diversos padecimientos debido a los beneficios a la salud que ofrecen. Dichos beneficios se atribuyen a compuestos fitoquímicos como los polifenoles. Recientemente se ha estudiado la fermentación de infusiones como una manera de incrementar la cantidad de compuestos bioactivos (Marsh *et al.*, 2014).

La kombucha es una bebida originaria del noroeste de China, producida a partir de la fermentación de té negro (*Camellia sinensis*) endulzado, por acción de un cultivo simbiótico de bacterias y levaduras. Los metabolitos producidos por la simbiosis durante la fermentación, principalmente ácidos orgánicos y polifenoles, se han asociado a beneficios a la salud del consumidor, debido a que estos compuestos poseen efecto antioxidante, antimicrobiano, anticarcinogénico, antihiperlipidémico, antidiabético, entre otros (Jayabalan *et al.*, 2014; Kapp y Sumner, 2019).

El consumo de kombucha se ha popularizado en los últimos años debido a los beneficios a la salud que se le atribuyen. Sin embargo, aún hacen falta estudios para estandarizar el proceso de fermentación, caracterizar sus compuestos y evaluar la influencia de la fermentación sobre la producción de éstos, así como demostrar su efecto biológico (Kapp y Sumner, 2019). Aunado a lo anterior, la fermentación de infusiones diferentes al té negro por el consorcio microbiano de

kombucha puede generar bebidas con características y composición diferentes a las obtenidas con el té negro (Jayabalan *et al.*, 2014, Vitas *et al.*, 2018).

Con base en lo anterior, el objetivo de este proyecto fue elaborar una bebida tipo kombucha a partir de mezclas de infusiones herbales, estandarizar su proceso de producción, así como evaluar el cambio en parámetros físicos y químicos, compuestos polifenólicos totales y capacidad antioxidante producidos durante la fermentación. Se utilizaron hojas y/o flores secas para infusión de jamaica, romero, manzanilla, hierbabuena, hojásén y zacate de limón.

Dirección General de Bibliotecas UAO

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Infusiones herbales

Las plantas y sus metabolitos secundarios se han identificado y utilizado desde tiempos ancestrales con objetivos distintos como el tratamiento de enfermedades agudas y crónicas, la elaboración de productos alimenticios y mejoras nutricionales. Las propiedades antioxidantes de los extractos herbales son usualmente expresadas por compuestos como los carotenoides, flavonoides y polifenoles, entre otros (Farzaneh y Carvalho, 2015). En la actualidad, hay un incremento en el consumo de infusiones herbales debido a sus posibles efectos en la salud humana, los cuales se atribuyen principalmente, a la presencia de compuestos fenólicos (Muñoz-Velázquez *et al.*, 2012). Sōukand y colaboradores (2013), propusieron el término “té recreativo” para describir a las infusiones herbales que se consumen en un contexto alimentario por su valor social y/o recreativo o por sus propiedades “saludables” al ser bebidas. Lo que contribuye al hecho de que, en la actualidad, la infusiones herbales no son consumidas únicamente con fines medicinales específicos.

Una infusión es una bebida que se obtiene de las partes aéreas (hojas secas, flores y frutos) de varias hierbas o plantas a las cuales se vierte agua a punto de hervir y se deja reposar durante un periodo de tiempo óptimo. La temperatura y tiempo de extracción, calidad del agua, tamaño de partícula del té y pH de extracción son factores importantes que afectan directamente la eficiencia de la extracción de los compuestos antioxidantes (Kosińska y Andlauer, 2014). Por ejemplo, un tiempo de infusión de cinco minutos con agua caliente es óptimo para extraer los antioxidantes del té (Kamiloglu *et al.*, 2012).

Muñoz-Velázquez y colaboradores (2012) evaluaron el contenido fenólico, la capacidad antioxidante y la actividad antiinflamatoria de infusiones comerciales de hierbabuena, limón, manzanilla, árnica y boldo obteniendo como resultado que dichas infusiones mostraron propiedades biológicas con beneficios potenciales a la salud.



### **2.1.1 Capacidad antioxidante de plantas y sus infusiones**

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) son subproductos del metabolismo aeróbico y sirven como moléculas de señalización para regular los procesos biológicos y fisiológicos. Sin embargo, la generación excesiva de EROs puede causar daño oxidativo a las biomoléculas sensibles, incluidos los péptidos, ácidos grasos y nucleótidos, lo que puede ocasionar diversos trastornos crónicos, como la esclerosis, varios tipos de cáncer, diabetes, envejecimiento y otras enfermedades degenerativas. Diversas investigaciones epidemiológicas proponen que la mayoría de los compuestos con potencial antioxidante son probablemente factores antiinflamatorios, anticancerígenos, antitumorales, antimutagénicos y antiescleróticos (Farzaneh y Carvalho, 2015; Rojas y Buitrago, 2019).

El consumo de bebidas como el té y el café proporciona un efecto preventivo contra diversos trastornos crónicos de interés creciente. Los compuestos relacionados con la capacidad antioxidante de plantas y sus infusiones son vitaminas (como la A y C), polifenoles, flavonoides, así como carotenoides y antocianinas. Estos retardan o previenen significativamente las reacciones de oxidación y han sido asociados con una disminución de los daños en el ADN y la peroxidación de lípidos. Varios estudios han definido a los compuestos fenólicos como los principales fitoquímicos bioactivos con actividad antioxidante y ventajas para la salud (Farzaneh y Carvalho, 2015).

### **2.2 Compuestos bioactivos de las infusiones herbales**

El té es una infusión elaborada, específicamente, a partir de las hojas de *Camellia sinensis* L. y es la segunda bebida más consumida en todo el mundo; éste es apreciado por sus diversos efectos beneficiosos para la salud. Sin embargo, otras infusiones de diversas plantas o tisanas han tomado relevancia y han sido estudiadas por sus compuestos bioactivos y, por tanto, sus beneficios para la salud. Se ha demostrado que la combinación de diferentes infusiones con diversos

constituyentes bioactivos produce efectos sinérgicos en sus efectos (Malongane *et al.*, 2017).

Un compuesto bioactivo se puede definir como un compuesto, esencial o no esencial, presente en un alimento y que es capaz de modular diferentes actividades biológicas proporcionando un beneficio a la salud del organismo que lo consume (Martín *et al.*, 2019). Los fitoquímicos son los principales compuestos bioactivos y son considerados no esenciales. De acuerdo a su estructura química, se clasifican en terpenoides, polifenoles, compuestos azufrados, fitoesteroles y alcaloides (Somani *et al.*, 2015). Estos compuestos se encuentran principalmente en frutas, vegetales, cereales, granos, algas y plantas medicinales, y son sintetizados como metabolitos secundarios por la célula vegetal (Zhang *et al.* 2015).

En el Cuadro 1 muestra los compuestos activos reportados para diversas plantas y sus infusiones.

**Cuadro 1. Infusiones y sus compuestos bioactivos**

Infusión	Compuestos bioactivos	
Menta ( <i>Mentha spicata</i> L.)	Catequina, epicatequina, rutina, luteolina, miricetina, apigenina, naringenina.	Bimakr <i>et al.</i> , 2012
Jamaica ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> )	Antocianinas: Cianidina 3-rutinósido, delphinidina 3-sambubiósido, cianidina 3-sambubiósido, cianidina 3-glucósido, delphinidina 3-glucósido. Flavonoides: Quercetina, leutolina.	Sindi <i>et al.</i> , 2014 Ifie <i>et al.</i> , 2016
Romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> )	Diterpenos fenólicos: Carnosol, rosmanol, ácido carnósico, Ácidos fenólicos: ácido cafeico, ácido rosmarínico, ácido gálico, ácido clorogénico, ácido ferúlico. Flavonoides: Apigenina, 4'5,7,8-tetrahidroxiflavona, pectolinarigenina, 6-hidroxiluteolina.	Ribeiro-Santos <i>et al.</i> , 2015 Sedighi <i>et al.</i> , 2015
Manzanilla ( <i>Matricaria chamomilla</i> )	Apigenina, quercetina, patuletina, luteolina, rutina. Cumarinas: Herniarina, umbeliferona. Fenilpropanoides: ácido clorogénico, ácido cafeico.	Singh <i>et al.</i> , 2011 Hameed <i>et al.</i> , 2018

	Flavonas: apigenina, apigenina-7-O-glucósido, luteolina y luteolina-7-O-glucósido. Flavonoles: quercetina y rutina. Flavonona: Naringenina.	
Zacate de Limón ( <i>Cymbopogon citratus</i> )	Isoorientina 2-V-ramnósido, isoorientina, Swertiajaponina. Procianidina B3, B4 y B2, catequina,	Ekpenyong <i>et al.</i> , 2013 Costa <i>et al.</i> , 2015
Hojasén ( <i>Flourensia cernua</i> )	Ácido dehidroflourénsico, flourensadiol, orselinato de metilo, benzopiranos, benzofuranos.	De Rodríguez <i>et al.</i> , 2012

### 2.2.1 Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*)

La flor o cáliz de *H. sabdariffa* es comúnmente utilizada para la elaboración de té. Sus principales constituyentes son las antocianinas (responsables de la coloración rojiza), ácidos orgánicos (ácido cítrico, málico y ascórbico) (Da-Costa-Rocha *et al.*, 2014) y flavonoides (quercetina, leutolina) (Ifie *et al.*, 2016).

Sindi y colaboradores (2014) determinaron a través de un estudio que las condiciones óptimas para la extracción de polifenoles y antocianinas de *H. sabdariffa* consisten en un proceso de extracción con agua a 100 °C y un tiempo óptimo de 10 minutos.

Ifie y colaboradores (2012) realizaron un estudio en el cual utilizaron jugo de cáliz de *H. Sabdariffa* para la producción de vino de mesa mediante la fermentación con una cepa de *Saccharomices cerevisiae*. Los resultados obtenidos mostraron una aceptación sensorial favorable en cuanto a color, sabor, olor y aceptabilidad general. Los autores concluyeron que es posible obtener vino de mesa de buena calidad a partir de cáliz de *H. sabdariffa*.

En 2016, Ifie y colaboradores evaluaron el impacto de la fermentación sobre la composición fitoquímica y bioactividad en vino elaborado a partir de *H. sabdariffa*. Los resultados mostraron un aumento en la cantidad de compuestos fenólicos a medida que la fermentación avanzaba (de 743 mg/L a 1260 mg/L), Particularmente,

se observó un incremento de las antocianinas delphinidina 3-sambubiósida y cianidina 3-sambubiósida, alcanzando su máximo valor a los 2 días a 30 °C, y un decremento después de 8 días de fermentación. Los niveles de ácido gálico aumentaron constantemente desde el inicio, alcanzando concentraciones más altas en el día 21. La mayor transformación en los compuestos fenólicos fue la rápida disminución de los niveles de 3-O ácido cafeico quínico (80% al día 40), cuya reducción fue seguida por el aumento simultáneo del ácido cafeico, lo que indica la hidrólisis de 3-O ácido cafeico quínico en ácidos cafeico y quínico. Esta aparición podría ser significativa, ya que se ha demostrado que el ácido cafeico es un inhibidor más potente de la  $\alpha$ -amilasa y la  $\alpha$ -glucosidasa que el ácido clorogénico *in vitro*.

Los principales beneficios potenciales a la salud de *H. sabdariffa* son las propiedades antioxidantes, diuréticas, hipoglucémicas, anticancerígenas, reducción del colesterol e hipertensión (Da-Costa-Rocha *et al.*, 2014; Cid-Ortega y Guerrero-Beltrán, 2015).

### **2.2.2 Hierbabuena (*Mentha spicata* L.)**

La hierbabuena (*Mentha spicata* L.) es una planta aromática cuyas hojas se han utilizado para la preparación de infusiones o té en diversos países; contiene compuestos activos de interés como flavonoides, ácidos fenólicos, terpenoides y otros compuestos volátiles. Los principales efectos asociados a esta planta son propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes y antidepresivas. (Shaikh *et al.*, 2014).

Fotakis y colaboradores (2016) realizaron un estudio en el cual se determinaron el contenido polifenólico y la capacidad antioxidante de infusiones de 10 plantas diferentes. Se observó que las infusiones de *Mentha spicata* tuvieron con un contenido fenólico y una capacidad antioxidante mayor al encontrado en plantas como *Matricaria chamomilla* (manzanilla) y *Origanum majorana* (mejorana).

### **2.2.3 Romero (*Rosmarinus officinalis*)**

El romero (*Rosmarinus officinalis*) es una planta aromática ampliamente consumida. Sus hojas, frescas y secas, se utilizan con frecuencia en la elaboración de alimentos. Se reconocen numerosas actividades biológicas del romero, entre ellas, antioxidantes, antibacterianas y antifúngicas, anticancerígenas, antiinflamatorias, entre otras. La actividad biológica de esta planta está relacionada principalmente con los constituyentes fenólicos (diterpenos y ácidos) y volátiles (Ribeiro-Santos *et al.*, 2015; Sedighi *et al.*, 2015).

### **2.2.4 Manzanilla (*Matricaria chamomilla*)**

La manzanilla es comúnmente utilizada como antiinflamatorio, antiséptico, antiespasmódico, analgésico, antimicrobiano, anticancerígeno, hepatoprotector, entre otros. Se consume principalmente en forma de infusión (flores secas) para el alivio de perturbaciones estomacales. Contiene un gran número de compuestos activos de interés terapéutico; los sesquiterpenos, flavonoides, cumarinas y poliacilenos se consideran los más importantes (Singh *et al.*, 2011).

Park y colaboradores (2017) evaluaron el efecto de la fermentación de *M. chamomilla* por *Lactobacillus plantarum* en la mejora de las actividades antioxidantes. Se encontró que el contenido de polifenoles totales de la manzanilla fermentada se redujo de 21.75 a 18.76 mg de equivalente de ácido gálico (mg GAE/g), pero se encontró que la actividad de captura de radicales libres DPPH de la manzanilla fermentada fue un 11.1% más alta que la de la manzanilla no fermentada después de 72 h de fermentación.

### **2.2.5 Zacate de Limón (*Cymbopogon citratus*)**

El zacate de limón (*Cymbopogon citratus*) es una planta aromática, sus hojas recién cortadas y parcialmente secas son utilizadas con fines medicinales. Se le atribuyen efectos benéficos tales como actividad antioxidante, antibacteriana, antidiarreica, antifúngica, antiinflamatoria y antirreumática. También se ha estudiado su influencia en la hipoglucemia, inhibición de la agregación plaquetaria y en el comportamiento neurológico (Manvitha y Bidya, 2013). La actividad biológica de esta planta se

atribuye principalmente a los compuestos fenólicos, específicamente flavonoides y taninos (Costa *et al.*, 2015).

### **2.2.6 Hojasén (*Flourensia cernua*)**

El consumo de té o infusiones a partir de las hojas de *Flourensia cernua* es común en regiones áridas y semiáridas de México (De León-Zapata *et al.*, 2016). La actividad biológica de esta planta se atribuye a la presencia de benzofuranos y benzopiranos. Dentro de sus propiedades se encuentra la actividad antimicrobiana, antioxidante y anticancerígena (De Rodríguez *et al.*, 2012).

## **2.3 Polifenoles**

Los compuestos fenólicos, incluidos los ácidos fenólicos, los flavonoides y las proantocianidinas, se distribuyen ampliamente en plantas como mecanismo protector contra el estrés biótico y abiótico. Son uno de los grupos más importantes de antioxidantes naturales y agentes quimiopreventivos encontrados en la dieta humana que incluye frutas, vegetales, granos, té, aceites esenciales y sus alimentos y bebidas derivados. Estudios epidemiológicos, clínicos y nutricionales han demostrado que los compuestos fenólicos mejoran la salud por la disminución del riesgo a padecer enfermedades como cáncer, enfermedades cardiovasculares y desordenes metabólicos (Zhang y Tsao, 2016).

La capacidad de los polifenoles para modular la actividad de diferentes enzimas, para interferir consecuentemente en mecanismo de señalización y en distintos procesos celulares, pueden deberse, en parte, a su capacidad de participar en distintas reacciones metabólicas de óxido-reducción (Quiñones *et al.*, 2012).

## **2.4 Bebidas fermentadas**

Los alimentos fermentados se definen como aquellos elaborados a través del crecimiento microbiano controlado y la conversión enzimática de los componentes del alimento. Estos alimentos se han producido y consumido desde el desarrollo de

las primeras civilizaciones humanas, su elaboración contribuyó a la mejora de la seguridad alimentaria y la extensión de la vida útil de los productos frescos, además de proporcionar palatabilidad y usos medicinales (Selhub *et al.* 2014; Marco *et al.*, 2017). Se ha comprobado que los alimentos fermentados también pueden ejercer propiedades nutricionales y funcionales, debido a la transformación de sustratos y la formación de productos bioactivos y biodisponibles (Marco *et al.*, 2017).

Las propiedades funcionales de los microorganismos en los alimentos fermentados incluyen propiedades probióticas, antimicrobianas, antioxidantes, producción de péptidos, degradación de compuestos antinutritivos, entre otros (Tamang *et al.*, 2016). Los productos generados por fermentación, como péptidos bioactivos y fitoquímicos pueden actuar sobre el perfil de la microbiota intestinal, que puede a su vez regular, al menos en cierto grado, procesos de inflamación y estrés oxidativo (Selhub *et al.* 2014). Diversos péptidos y fracciones de péptidos con propiedades bioactivas se han aislado de yogurt, leche agria, kéfir y otros alimentos fermentados. Estos son investigados por sus efectos antihipertensivos, antitrombóticos, de saciedad, inmunomoduladores, osteogénicos y antioxidantes (Marco *et al.*, 2017).

#### **2.4.1 Fermentación de plantas y vegetales**

En la fermentación de plantas y vegetales, el crecimiento de bacterias ácido lácticas mejora la conversión de los compuestos fenólicos como los flavonoides a metabolitos biológicamente activos debido a la expresión de las enzimas glicosil hidrolasa, esterasa y descarboxilasa. Otros compuestos producidos durante la fermentación son dependientes de la cepa utilizada, dentro de estos podemos encontrar diversos ácidos orgánicos, vitaminas (complejo B principalmente) y aminoácidos con función neurotransmisora e inmunomoduladora (ácido  $\gamma$ -aminobutírico). Los compuestos mencionados poseen propiedades antimicrobianas, antioxidantes, hipoglucémicas, entre otras (Marco *et al.*, 2017).

Recientemente se ha trabajado en la innovación para desarrollar bebidas fermentadas probióticas no lácteas a partir de una extensa variedad de sustratos, dentro de los que incluyen leche de soya, suero de leche, cereales, jugos de frutas y vegetales. El primer lugar es ocupado por las bebidas producidas a partir de la fermentación de cereales o granos como el maíz, mijo, cebada, avena, centeno, trigo, arroz y sorgo (Marsh *et al.*, 2014). Existen también bebidas fermentadas elaboradas a partir de otras fuentes, un ejemplo de ello es la kombucha, producida a partir de té endulzado. Hay evidencia de que algunas bebidas fermentadas aumentan sus propiedades benéficas a través de la acción microbiana (probiótica) directa e indirectamente para la producción de metabolitos. Los ácidos orgánicos producidos en la fermentación pueden conferir beneficios para la salud (por ejemplo, el ácido glucurónico del kombucha). Estas formas de bebidas también pueden proporcionar componentes de origen vegetal, como fibra, vitaminas, minerales, flavonoides y compuestos fenólicos, que pueden prevenir el estrés oxidativo, la inflamación, la hiperglucemia y la carcinogénesis (Marsh *et al.*, 2014; Marco *et al.*, 2017).

Muchas de estas bebidas han ganado popularidad debido a su capacidad de mejorar la salud; sin embargo, la mayoría de éstas han sido poco estudiadas y sus beneficios a la salud no están del todo demostradas (Kapp y Sumner, 2019).

## **2.5 Kombucha**

La kombucha es una bebida agrdulce tradicional del noroeste de China, producida a partir de la fermentación del té negro (*Camellia sinensis*) endulzado, por acción de un cultivo simbiótico de bacterias y levaduras. Su origen data del 220 a.c. en Manchuria, China, donde ya era consumida debido a sus propiedades desintoxicantes y energizantes. Su inserción en el continente europeo se llevó a cabo durante la segunda guerra mundial y su consumo se popularizó por los beneficios a la salud que aportaba (Jayabalan *et al.*, 2014). Hoy en día el kombucha es consumido en diversas partes del mundo; en 2018 se reportó un incremento



rápido de kombucha en el mercado de bebidas funcionales, así como de las bebidas fermentadas no alcohólicas (Kapp y Sumner, 2019).

Los beneficios a la salud del kombucha se derivan de los compuestos presentes, de manera natural, en el té y de los producidos durante la fermentación, tales como el ácido glucónico, ácido glucurónico, polifenoles, lactona y vitaminas del complejo B (Jayabalan *et al.*, 2014; Chakravorty *et al.*, 2016). Existen reportes de que el consumo de kombucha ayuda a la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas como cáncer, padecimientos cardiovasculares, diabetes y enfermedades neurodegenerativas. Esto debido, principalmente, a los compuestos bioactivos presentes en la bebida que tienen propiedades tales como efecto antimicrobiano, hepatoprotector, desintoxicante, antioxidante, anticolesterolémico, antiinflamatorio, antitumoral, efectos profilácticos para la salud en general y la estimulación inmunológica (Jayabalan *et al.*, 2014; Kapp y Sumner, 2019). Estos beneficios han sido ampliamente comprobados en modelos animales, no obstante, existen pocos estudios donde se haya realizado un estudio controlado en humanos, sobre el efecto a la salud de la kombucha (Kapp y Sumner, 2019).

### **2.5.1 Producción de kombucha**

Tradicionalmente, y aún hoy en día, es común la producción de kombucha casera o artesanal, cuya difusión del proceso se ha llevado a cabo compartiendo el cultivo iniciador o consorcio bacteriano entre productores. La bebida se prepara adicionando una porción de consorcio y/o kombucha previamente fermentada a té negro endulzado para su fermentación. En los primeros días, los microorganismos producen una fina capa de celulosa en la superficie, al final de la fermentación la nueva biopelícula tendrá un espesor de varios centímetros; esta estructura proporciona un entorno de crecimiento protector que permite tolerar las condiciones extremas y la sobrevivencia en un medio hostil, como la acidez del medio (Valera *et al.*, 2015). Esta biopelícula o consorcio puede recuperarse, al final del proceso, por filtración y usarse un número indeterminado de veces.

El consorcio microbiano de kombucha consiste en una biopelícula de celulosa compuesta principalmente por una asociación simbiótica de bacterias ácido acéticas y especies osmofílicas de levaduras, aunque se han aislado bacterias ácido lácticas de algunos consorcios. Por lo que, la composición microbiana depende de la fuente del inóculo para la fermentación del té, las condiciones geográficas y climáticas, así como de la variedad de especies silvestres de levaduras y bacterias de la región (Chakravorty *et al.*, 2016). Se conoce que los géneros más abundantes son *Acetobacter* y *Gluconobacter*. Dentro de las acetobacterias las predominantes son *A. xylium*, *A. pasteurianus* y *A. aceti*; y para *Gluconobacter* son *G. oxydans* y *G. sp. A4*. En cuanto a las especies de levaduras, se han detectado las especies *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces*, *Torulospora*, *Koleckera*, *Pichia*, *Mycotorula*, *Mycoderma*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces ludwigii*, *Saccharomyces bisporus* y *Schizosaccharomyces pombe* (Jayabalan *et al.*, 2014; Chakravorty *et al.*, 2016; Kapp y Sumner, 2019).

Las bacterias y levaduras utilizadas para la obtención de kombucha llevan a cabo actividades metabólicas por rutas diferenciadas y complementarias. Las levaduras hidrolizan la glucosa y la fructosa para producir alcohol por la vía de glucólisis. En tanto que, las bacterias ácido acéticas hacen uso de la glucosa para producir ácido glucónico, y del etanol para producir ácido acético (Jayabalan *et al.*, 2014).

La fermentación para la obtención de kombucha se lleva a cabo a temperatura ambiente, por un periodo de entre 8 a 12 días y, en la mayoría de los casos, no se cuenta con un protocolo de procedimientos que permita monitorear, evaluar y controlar el proceso de fermentación (Jayabalan *et al.*, 2014, Chakravorty *et al.*, 2016). Estas prácticas han provocado la preocupación por la seguridad del procesamiento y consumo de kombucha a lo largo de su historia. En 2013, Nummer publicó un manual de análisis de riesgos y guía de procesamiento para la producción de kombucha de forma segura bajo el Código Alimentario Modelo de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA). Este

reporte incluye el análisis de peligros de kombucha (peligros químicos y biológicos), control de la seguridad alimentaria (puntos de control críticos, límites críticos, seguimiento, medidas correctivas y mantenimiento de registros) y buenas prácticas de manufactura (procedimiento operativo estándar y embalaje).

El número de compañías productoras de kombucha, así como la variedad de productos de kombucha, ha incrementado rápidamente. En 2014 se estableció una organización sin fines de lucro llamada Kombucha Brewers International (KBI), que busca ayudar al establecimiento de regulaciones y legislaciones relacionadas con la kombucha. Para noviembre de 2019 esta organización contaba con 235 empresas registradas, de las cuales 69 % se encuentran en Norte América; por su parte, México en América Latina, España en Europa y Australia en Asia-Pacífico son los países que tuvieron el mayor número de empresas de kombucha registradas en cada región (Kim y Adhikari, 2020).

### **2.5.2 Características químicas y nutricionales de la kombucha**

El fermento de kombucha se compone de dos fases: una biopelícula flotante (consorcio microbiano) y una fase acuosa que está compuesta principalmente de ácido acético y ácido glucónico. También contiene, en menor concentración, los ácido tartárico, málico y cítrico, vitaminas, polifenoles, aminoácidos, antioxidantes y otros microelementos. Todos estos compuestos son responsables de dar el sabor agrdulce al té kombucha y se les atribuyen los efectos benéficos de la bebida (Jayabalan *et al.*, 2007).

Chakravorty y colaboradores (2016) realizaron un estudio en el cual se evaluó el cambio en las propiedades bioquímicas del té de kombucha durante la fermentación. Se observó un incremento en el contenido total de polifenoles y flavonoides (54 y 24%, respectivamente) alrededor de los 21 días de fermentación; se observó también un incremento gradual de la capacidad antioxidante de 3.7%, 35% y 44.4% a los 7, 14 y 21 días de fermentación, respectivamente. Los principales ácidos orgánicos encontrados fueron ácido acético y ácido glucónico, con una

concentración de  $16.5 \pm 0.9$  g/L y  $7.36 \pm 0.8$  g/L, respectivamente, después de 21 días de fermentación. La fermentación resultó también en la producción de metabolitos no presentes en el té sin fermentar, como el ácido D-sacárido-1,4-lactona que está asociado a los efectos hipocolesterolémicos y la propiedad hepatoprotectora del té de kombucha.

Respecto a los sustratos utilizados para la fermentación, se han realizado estudios sobre la posibilidad de utilizar sustratos no tradicionales para la fermentación de kombucha (Jayabalan *et al.*, 2014).

Lončar y colaboradores (2007) demostraron que el metabolismo del consorcio microbiano de kombucha es más intensivo en un sustrato con extracto de alcachofa de Jerusalén en comparación al té negro. Específicamente, los contenidos de ácido L-láctico y L-ascórbico son significativamente más altos que al utilizar té negro. Velićanski y colaboradores (2013) demostraron que el té verde y el bálsamo de limón tienen un efecto más estimulante sobre la fermentación de la kombucha que el té negro, con lo que se obtiene el producto de la fermentación en un tiempo más corto. Vázquez-Cabral y colaboradores (2014), por su parte, realizaron un estudio en el cual sometieron una infusión de hojas de roble (*Quercus resinosa*) a fermentación con el consorcio microbiano de kombucha. El análisis químico del producto mostró la presencia de los ácidos hidroxibenzoico e hidroxycinámico, flavonoides, flavonoles y flavonas. Se produjo, además, ácido succínico que redujo la astringencia y amargor de la bebida mejorando su aceptabilidad sensorial.

La kombucha puede considerarse una bebida simbiótica debido a la existencia de microorganismos probióticos y moléculas prebióticas. Los alimentos simbióticos tienen un efecto benéfico en el huésped mejorando la supervivencia y la implantación de suplementos dietéticos microbianos vivos en el tracto gastrointestinal estimulando selectivamente el crecimiento y/o activando el metabolismo de bacterias promotoras de la salud. Las bacterias y levaduras que producen la kombucha son tolerantes al pH ácido (ente 4 y 2), por lo que se espera que estos microorganismos sean resistentes a la bilis, lleguen al colon y crezcan

allí. Por otra parte, la celulosa producida por las bacterias ácidoacéticas puede actuar como un componente prebiótico ya que es una fibra dietética insoluble que ayuda en la digestión al atrapar el agua en el colon. (Jayabalan *et al.*, 2019). Sin embargo, aún no hay estudios clínicos que expliquen las características probióticas de los microorganismos que fermentan té para producir kombucha. (Jayabalan *et al.*, 2019; Kapp y Sumner, 2019).

Dirección General de Bibliotecas UFG

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El consumo de bebidas hipercalóricas y sus consecuencias en la salud de la población mexicana ha despertado un interés creciente en el desarrollo de bebidas alternativas con perfiles más saludables. En los últimos años, el consumo del té de kombucha ha tomado popularidad en la población debido a que se le ha relacionado con propiedades beneficiosas para la salud por su efecto antioxidante, antiinflamatorio, antihiperglicémico, antimicrobiano, anticancerígeno, antihiperlipidémico, entre otros. No obstante, su consumo en México es limitado y su proceso de obtención aún es muy variable en la práctica; por lo tanto, hacen falta estudios para la estandarización del proceso de fermentación, la caracterización de sus compuestos y la influencia de la fermentación sobre la producción de éstos. Además, es de interés el estudio de plantas y flores distintas al té negro con las cuales pudiera producirse una bebida tipo kombucha con un perfil fitoquímico diferente cualitativa y cuantitativamente. El cuál pueda proporcionar alternativas de uso con fines benéficos a la salud diferentes o complementarios a las que ofrece la bebida tradicional, así como un perfil sensorial con características más identificadas y por tanto de mayor aceptabilidad en la población de estudio.

El presente proyecto buscó elaborar una bebida tipo kombucha a partir de mezclas de infusiones herbales (jamaica, romero, manzanilla, menta, hojasén y zacate de limón), utilizando un consorcio microbiano disponible comercialmente. Se innovó en el uso de infusiones de plantas más conocidas por la población mexicana y posiblemente de mayor aceptación sensorial, además de estudiar los compuestos antioxidantes que estas infusiones pudieran proporcionar al ser fermentadas.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Estandarizar el proceso de fermentación y caracterizar bebidas tipo kombucha elaboradas a partir de mezclas de infusiones herbales.

### **4.2 Objetivos específicos**

Determinar el efecto de la temperatura de preparación de las infusiones sobre los compuestos polifenólicos extraídos.

Formular mezclas de infusiones y determinar su capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales.

Evaluar el efecto del estado físico del inóculo iniciador sobre el contenido polifenólico, pH y producción de biomasa durante la fermentación.

Determinar el efecto de la temperatura y tiempo de fermentación sobre las características físicas, químicas, microbiológicas y contenido polifenólico de las mezclas de infusiones.

Caracterizar las kombuchas obtenidas mediante una evaluación sensorial, así como un análisis proximal.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Materiales**

#### **5.1.1 Material vegetal**

Hojas y/o flores de Té Negro, Hierbabuena, Jamaica, Romero, Manzanilla, Zacate de limón y Hojasén, obtenidas en un mercado local de la ciudad de Querétaro, Qro, se almacenaron en un lugar seco y protegido de la luz.

#### **5.1.2 Consorcio microbiano**

Consorcio microbiano de Kombucha proporcionado por la empresa Elemental Kombucha, México.

#### **5.1.3 Material químico**

NaOH, reactivo Folin-Ciocalteu, ácido gálico, Trolox, 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl-hydrate (DPPH·), 2,2-azinobis-3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic (ABTS), ácido dinitro salicílico (DNS), agar dextrosa y papa (APD), agar MRS, peptona de carne, glucosa, extracto de levadura, agar bacteriológico, ácido tartárico.

### **5.2 Métodos**

#### **5.2.1 Determinación del efecto de la temperatura de preparación de las infusiones sobre los compuestos polifenólicos totales extraídos**

Se prepararon infusiones a partir de las hojas y/o flores de Hierbabuena, Jamaica, Romero, Manzanilla, Zacate de limón, hojasén y Té Negro. Con la finalidad de establecer la temperatura de preparación de las infusiones, se aplicó un diseño unifactorial replicado (tres réplicas) con dos niveles. Se prepararon las infusiones a dos diferentes temperaturas, 70 °C (Neffe-Skocińska *et al.* 2017) y 95 °C (Marsh *et al.*, 2014) y se midió como variable respuesta la cantidad de polifenoles totales extraídos. Se utilizó agua potable, la cual se llevó a la temperatura correspondiente, se retiró del fuego y se agregaron las hojas de té (10 g de hoja de té/L agua), se dejó en agitación por 10 minutos, después se filtró el líquido a través de un filtro de papel (2.5 µm). Se determinó el contenido de polifenoles totales a cada una de las



infusiones. Una vez determinada la temperatura de preparación de las infusiones, a estas se les determinó su capacidad antioxidante.

**Cuadro 2. Diseño experimental para la extracción de polifenoles totales de infusiones herbales**

Factor	Nivel	Variable respuesta
Temperatura de infusión	70 °C	Contenido de polifenoles totales
	95 °C	

#### **5.2.1.1 Cuantificación de polifenoles hidrolizables por el método de Folin-Ciocalteu en microplaca**

Se colocaron 20  $\mu$ L de la muestra, de concentración conocida, en un pozo de una microplaca. Posteriormente, se agregaron 20  $\mu$ L del reactivo de Folin-Ciocalteu, dejándolos reaccionar por 5 min. Después de este tiempo, se añadieron 20  $\mu$ L de carbonato de sodio 0.01 M y se dejaron reaccionar por 5 min. Finalmente, la solución se disolvió con 125  $\mu$ L de agua destilada y su absorbancia se leyó a 790 nm en un lector de microplacas (Varioskan). La concentración de la muestra se obtuvo en equivalentes de ácido gálico por gramo de material por correlación lineal de acuerdo a una curva estándar de ácido gálico de 0-250 ppm realizada con los mismos pasos antes descritos (Wong, 2012).

#### **5.2.1.2 Capacidad antioxidante por el método ABTS**

Se produjo el catión radical ABTS (ABTS<sup>•+</sup>) mediante la reacción de 5 mL ABTS 7 mM y 88  $\mu$ L de persulfato de potasio 140 mM en la oscuridad a 4 °C por al menos 12 h antes de su uso. Pasado este tiempo, la solución de ABTS<sup>•+</sup> se diluyó con etanol hasta una absorbancia de  $0.70 \pm 0.02$  a 734 nm.

Se agregaron 20  $\mu$ L de la muestra y 230  $\mu$ L de la solución de ABTS, se dejó reposar 6 min y se leyó la absorbancia a 734 nm (Bran-Williams *et al.*, 1995).

Se utilizó como estándar una solución de trolox con la cual se realizó una curva de calibración (regresión lineal). Los resultados se expresaron como  $\mu\text{mol}$  equivalentes de trolox/mL (Re *et al.*, 1999).

#### **5.2.1.3 Capacidad antioxidante por el método DPPH**

Se preparó el radical DPPH a una concentración de  $60 \mu\text{M}$ , en solución metanólica. Se añadieron a la celda de reacción  $193 \mu\text{L}$  de solución metanólica de DPPH y  $7 \mu\text{L}$  de la muestra de concentración conocida. Se cuantificó el cambio de absorbancia de manera cinética a  $517 \text{ nm}$  hasta que el valor de la absorbancia permaneciera constante. Se tomó este valor para hacer las reacciones a tiempo final.

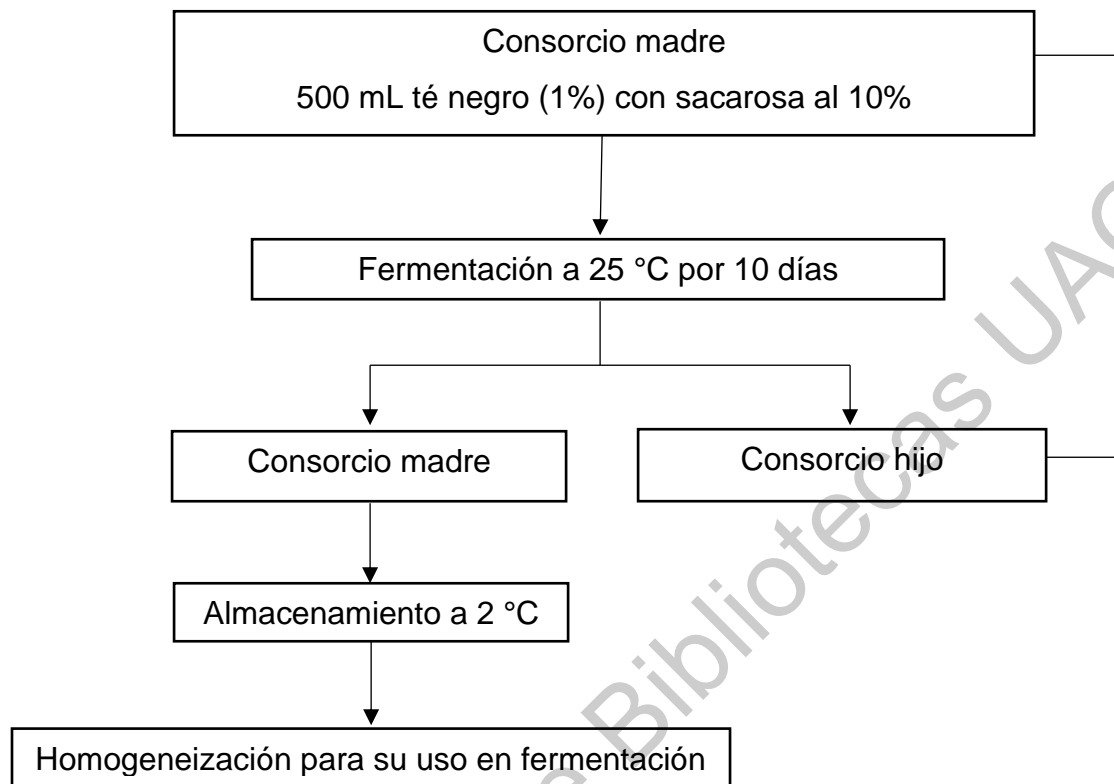
Se utilizó como estándar una solución de trolox con la cual se realizó una curva de calibración (regresión lineal). Los resultados se expresaron como  $\mu\text{mol}$  equivalentes de trolox/mL (Molyneux P., 2004).

#### **5.2.2 Formulación de las mezclas de infusiones**

Con base al contenido de compuestos polifenólicos totales de cada una de las infusiones se prepararon mezclas de hierbas de Jamaica, Manzanilla y Romero, al 70, 20 y 10 %, respectivamente (formulación JMR) y Hierbabuena, Zacate de limón y Hojasén al 70, 20 y 10 %, respectivamente (formulación HLH). Se utilizó agua potable, la cual se llevó a  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , se retiró del fuego y se agregaron las mezclas de hojas de té ( $10 \text{ g}$  de hojas/L), se dejó en agitación por 10 min, después se filtró la infusión a través de un filtro de papel ( $2.5 \mu\text{m}$ ) para eliminar las hojas. La infusión aún caliente se endulzó con azúcar al 10% y se agitó hasta disolver completamente (Kosińska y Andlauer, 2014).

#### **5.2.3 Acondicionamiento del inóculo de kombucha**

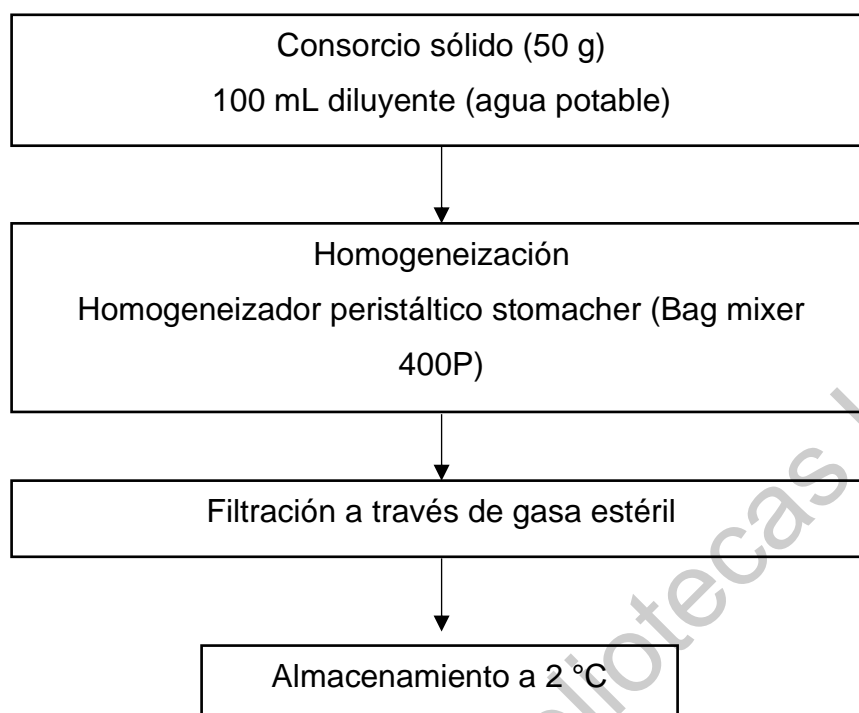
Una vez recibido el consorcio microbiano de Kombucha por parte de la empresa Elemental Kombucha, éste se acondicionó para crecer en té negro (1%) endulzado con sacarosa al 10%, a una temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  por 10 días. El consorcio se mantuvo de esta forma durante la duración del proyecto con la finalidad de contar con inóculo suficiente para llevar a cabo la serie de fermentaciones necesarias.



**Figura 1. Procedimiento para la adaptación del consorcio de Kombucha en té negro endulzado**

### 5.2.3.1 Homogeneización del consorcio

Se realizó la homogeneización del consorcio con la finalidad de obtener una suspensión y de esta manera asegurar una distribución homogénea de las poblaciones microbianas al momento de realizar la inoculación del consorcio en las mezclas de infusiones (Esto contribuye a la estandarización del proceso). A fin de determinar el tiempo adecuado de homogeneización se realizó un diseño unifactorial replicado, con 4 niveles, 1,2,3 y 4 min de homogeneización, se midió como variable respuesta la cantidad de levaduras y bacterias BAL y BAA extraídas. Para el análisis microbiológico se prepararon diluciones seriadas del consorcio homogeneizado utilizando una solución de peptona de carne al 0.1 % como diluyente, según lo establecido en la NOM-110-SSA1-1994.



**Figura 2. Procedimiento para la homogeneización del consorcio de Kombucha**

**Cuadro 3. Diseño experimental para el proceso de homogeneización del consorcio de kombucha**

Factor	Nivel	Variable respuesta
Tiempo de Homogeneización	1 min	Bacterias acidolácticas
	2 min	Bacterias acidoacéticas
	3 min	Levaduras
	4 min	

### 5.2.3.2 Conteo de levaduras

Se utilizó medio APD (Agar papa dextrosa), se preparó el medio y se esterilizó a 15lb/121°C por 15 min. Se colocó 1 mL de las diluciones de la muestra correspondientes en cajas Petri por duplicado. Se vertieron de 15 a 20 mL de APD acidificado a una temperatura de  $45 \pm 1$  °C. Se mezcló cuidadosamente el medio y se dejó solidificar sobre una superficie fría. Las cajas se incubaron a  $25 \pm 1$  °C y las colonias se contaron después de 5 días de incubación (NOM-111-SSA1-1994).

#### **5.2.3.3 Conteo de bacterias acidoacéticas**

Se utilizó el medio GY (5% glucosa, 1% extracto de levadura y 1.5% agar) con natamicina (100 mg/L) para evitar el crecimiento de levaduras. Se preparó el medio y se esterilizó a 15lb/121°C por 15 min. Posteriormente se vertió en cajas Petri (15 a 20 mL en cada una), se dejó solidificar sobre una superficie fría. Las cajas se almacenaron a 4 °C hasta su utilización. Para la siembra de la muestra se colocaron 100 µL de las diluciones correspondientes en la superficie del medio sólido y se extendió la muestra en la superficie utilizando una varilla de vidrio. Las cajas se incubaron a 30 ± 1 °C y las colonias se contaron después de 3 días de incubación (Valera *et al.*, 2015).

#### **5.2.3.4 Conteo de bacterias acidolácticas**

Se preparó el medio MRS y se esterilizó a 15lb/121 °C por 15 min. Posteriormente, se vertió en cajas Petri (15 a 20 mL en cada una), se dejó solidificar sobre una superficie fría. Las cajas se almacenaron a 4 °C hasta su utilización. Para la siembra de la muestra se colocaron 100 µL de las diluciones correspondientes en la superficie del medio sólido y se extendió la muestra en la superficie utilizando una varilla de vidrio (método de extensión en superficie). Las cajas se incubaron a 35 ± 1 °C en atmósfera microaerófila (5% O<sub>2</sub>), utilizando sobres generadores de condiciones anaerobias (BD GasPack® EZ Gas Generating Systems). Las colonias se contaron después de 3 días de incubación.

#### **5.2.4 Cinética de fermentación mediante consorcio sólido y homogeneizado**

Partiendo de las infusiones JMR y HLH preparadas según lo establecido en la sección 5.2.2, así como una infusión control de té negro (TN), éstas se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente, se colocaron 100 mL en un matraz Erlenmeyer y se inoculó una muestra con consorcio sólido (3% m/v) y otra con consorcio homogeneizado (6% v/v), se cubrieron los recipientes con una torunda estéril y se incubaron por 12 días a 30 °C. Se utilizó un diseño unifactorial replicado para evaluar el efecto del estado de inóculo iniciador sobre los parámetros físicos,

químicos y contenido polifenólico total (Chakravorty *et al.*, 2016). Durante el periodo de fermentación se evaluó el cambio en el pH, peso de consorcio y compuestos polifenólicos totales a los 0, 3, 6, 9 y 12 días de fermentación.

#### **5.2.4.1 Inoculación a partir del consorcio en estado sólido**

Se fraccionó un disco de consorcio de Kombucha en cubos de 2x2 cm aproximadamente, de un peso de 3 g, para después inocular con estos 100 mL de cada infusión.

#### **5.2.4.2 Inoculación a partir de una suspensión del consorcio de kombucha**

Se tomó una alícuota de 6 ml de la suspensión de consorcio de Kombucha obtenida mediante la metodología descrita en la sección 5.2.4, para después inocular 100 mL de cada infusión.

#### **5.2.5 Evaluación del efecto de la temperatura sobre la fermentación de la Kombucha**

Partiendo de 100 mL de las infusiones JMR, HLH y TN a temperatura ambiente, se inocularon con consorcio homogeneizado (6% v/v), se cubrió el recipiente con una torunda estéril y se incubaron por 12 días a 30 °C. Se utilizó un diseño unifactorial replicado para evaluar el efecto de la temperatura sobre los parámetros físicos y químicos, contenido polifenólico y capacidad antioxidante (Chakravorty *et al.*, 2016). Durante el periodo de fermentación se evaluó el cambio de los siguientes parámetros: pH, acidez titulable, azúcares reductores, peso de la biopelícula, compuestos polifenólicos totales y capacidad antioxidante a los 0, 3, 6, 9 y 12 días de fermentación. Además, se realizó un seguimiento de las poblaciones bacterianas a los 0, 6 y 12 días de fermentación, para lo cual se realizó un conteo en placa de levaduras, bacterias acidoacéticas y bacterias acidolácticas, como se describió en las secciones 5.2.3.2, 5.2.3.3 y 5.2.3.4.

### 5.2.5.1 pH

El pH se midió con un potenciómetro con electrodo de vidrio LAQUA 101-SU utilizando la metodología descrita en la NMX-F-317-S-1978.

### 5.2.5.2 Acidez titulable

En el caso de la kombucha HLH, se realizó la titulación de 10 mL (dilución 1:9) de cada bebida con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N, utilizando fenolftaleína como indicador de acuerdo a lo establecido en la NMX-F-102-S-1978. El porcentaje de acidez titulable se calculó con la siguiente ecuación:

$$\%Acidez\ titulable = \frac{(Volumen\ de\ NaOH)(Normalidad\ de\ NaOH)(Eq.\ de\ ácido\ acético)}{(Volumen\ de\ la\ muestra)100}$$

En caso de la kombucha JMR, se realizó la titulación de 10 mL de muestra diluidos con 50 mL de agua destilada con una solución de hidróxido de sodio 0.1N hasta alcanzar un pH de 8.3 de acuerdo con lo establecido en la NMX-F-102-S-1978. El porcentaje de acidez titulable se calculó con la siguiente ecuación:

$$\%Acidez\ titulable = \frac{(Volumen\ de\ NaOH)(Normalidad\ de\ NaOH)(Eq.\ de\ ácido\ acético)}{(Volumen\ de\ la\ muestra)100}$$

### 5.2.5.3 Azúcares reductores

Se colocaron 0.5 mL de la muestra (concentración conocida) en un tubo de ensayo, posteriormente se agregaron 0.5 mL del reactivo DNS. Se introdujo el tubo en un baño a ebullición lenta por 5 min. Se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 5 mL de agua destilada. Se agitó la muestra en vortex y su absorbancia se leyó a 540 nm en un espectrofotómetro de celdas (Spectrophotometer HALOXB-10). Los resultados se expresaron como g de glucosa/mL de muestra por correlación lineal de acuerdo a una curva estándar de glucosa de 0 a 1 g/L realizada con los mismos pasos descritos anteriormente (Jain A. *et al.*, 2020).

#### **5.2.5.4 Peso de la biopelícula**

El peso de la biopelícula obtenida se determinó mediante la medición de la masa; la biopelícula flotante de celulosa se removió de la superficie del líquido fermentado y se filtró de acuerdo al método establecido previamente por Malbaša y colaboradores (2008).

#### **5.2.5.5 Análisis microbiológico**

Para el análisis microbiológico del consorcio (estado sólido) y la kombucha (estado líquido) se prepararon diluciones seriadas utilizando una solución de peptona de carne al 0.1 % como diluyente, según lo establecido en la NOM-110-SSA1-1994. Se realizó el conteo en placa de levaduras, bacterias ácidoacéticas y bacterias acidolácticas mediante la metodología descrita en las secciones 5.2.4.1, 5.2.4.2 y 5.2.4.3, respectivamente.

#### **5.2.6 Evaluación sensorial**

Con el objetivo de seleccionar la mejor formulación se realizó una evaluación sensorial utilizando el método de escala hedónica. Se reclutaron 35 consumidores, hombres y mujeres entre 18 y 60 años de edad, alumnos, docentes o trabajadores de la Universidad Autónoma de Querétaro, que evaluaron el color, olor, sabor, acidez, dulzor y aceptabilidad general de cada una de las kombuchas, utilizando una escala hedónica de 1 “me disgusta mucho” a 7 “me gusta mucho” (Lawless y Heymann, 2013). Las muestras consistieron en 15 mL de cada producto, y se sirvieron en recipientes de plástico transparente, a una temperatura ideal para su consumo (4 °C). Previo al análisis sensorial, los productos se sometieron a un análisis microbiológico a fin de asegurar que el producto fuese inocuo para los evaluadores. Para el análisis sensorial se excluyó la participación de mujeres embarazadas y personas que presentaban algún tipo de alergia y que estuvieran en tratamiento médico (fármacos). Cada uno de los participantes recibió un consentimiento informado, en el cual se les informó sobre los objetivos del proyecto, los requisitos para su participación, así como los riesgos asociados con el estudio.



### **5.2.7 Análisis proximal**

El contenido total de cenizas y proteína se determinó por los métodos de las normas mexicanas, NMX-F-066-S-1978 y NMX-F-068-S-1980, respectivamente.

### **5.3 Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA). Se realizó un análisis de comparación de medias empleando la prueba de Tukey ( $\alpha < 0.05$ ) para la comparación de las características físicas, químicas, fitoquímicas, microbiológicas y sensoriales de las diferentes kombuchas formuladas. Para el análisis de datos se utilizó el programa estadístico R versión 3.5.1

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

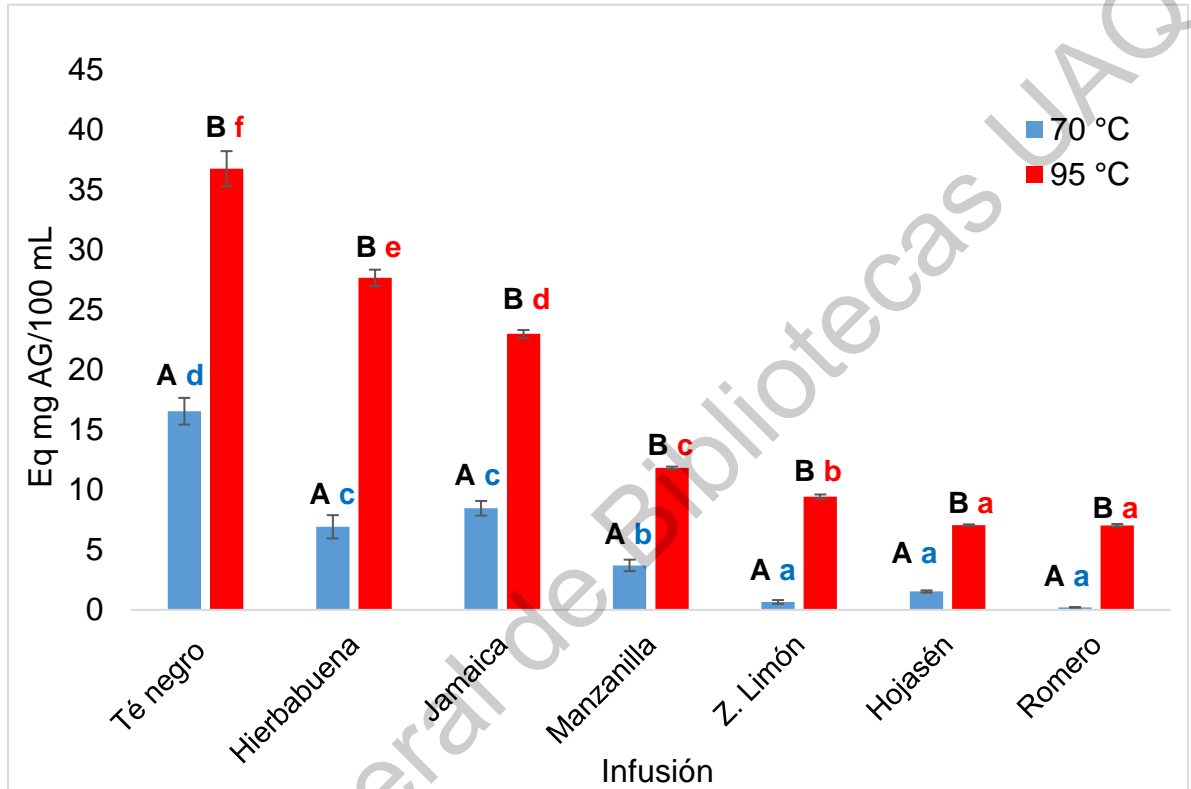
### 6.1 Efecto de la temperatura sobre el contenido polifenólico y capacidad antioxidante de las infusiones no fermentadas

La eficiencia en la extracción de compuestos polifenólicos de una infusión está determinada por diversos factores como, la relación hojas/agua, tipo de planta, tamaño de partícula, así como el tiempo y la temperatura de preparación (Makanjoula *et al.*, 2020). En la Figura 3 se presenta el contenido de compuestos polifenólicos de infusiones herbales preparadas a 70 °C y 95 °C.

Se encontraron diferencias significativas en el contenido de polifenoles totales de las diferentes infusiones para ambas temperaturas ( $p$  valor < 0.0001); tanto para 70 °C como para 95 °C la infusión que presentó mayor concentración de compuestos polifenólicos es la de Té Negro, seguida de Hierbabuena y Jamaica. Es importante notar que en la infusión de Romero preparada a 70 °C no se detectaron dichos compuestos.

Respecto al efecto de la temperatura, se observó, de manera general, que a una temperatura de 95 °C se obtiene una mayor extracción de polifenoles en comparación con una temperatura de extracción de 70 °C. Se pudo observar, por ejemplo, que para la infusión de Zacate de limón se incrementó nueve veces la cantidad de polifenoles extraídos. Otro caso destacable es la infusión de Romero en la cual a temperatura de 70 °C no se detectaron compuestos fenólicos; sin embargo, a una temperatura de 95 °C la extracción fue más eficiente permitiendo la recuperación de polifenoles en la infusión. Estos resultados sugieren que la extracción de compuestos polifenólicos es proporcional al aumento de temperatura de preparación de las infusiones. Los resultados obtenidos para las infusiones de Manzanilla, Limón y Hierbabuena, preparadas a 95 °C, son comparables con los obtenidos por Muñoz-Velázquez y colaboradores (2012), quienes reportan un contenido polifenólico de 6.18 a 6.93 mg eq. AG/100 mL, 6.99 a 7.56 mg eq. AG/100 mL y 15.08 a 23.18 mg eq. AG/100 mL, para infusiones de Manzanilla, Limón y

Hierbabuena respetivamente, preparadas al 0.5%, es decir, la mitad de la concentración de las infusiones evaluadas en este trabajo.



**Figura 3. Efecto de la temperatura en la extracción de compuestos polifenólicos totales de infusiones herbales**

Valores expresados como la media  $\pm$  desviación estándar (n=3). Los valores con diferente letra mayúscula indican diferencia estadística significativa respecto a la temperatura de extracción de una misma infusión. Los valores con diferente letra minúscula indican diferencia estadística significativa respecto al tipo de infusión a una misma temperatura, ambas a un  $\alpha=0.05$ . AG: ácido gálico.

Los beneficios a la salud asociados al consumo de infusiones herbales se ha atribuido, en parte, al potencial antioxidante de algunos compuestos de las infusiones como los compuestos polifenólicos, que les permite actuar como agentes reductores, donantes de hidrógeno y quelantes de metales (Rusak *et al.*, 2008; Pękal y Pyrzynska, 2015). En el Cuadro 4 se presenta la capacidad antioxidante de infusiones herbales preparadas a 95 °C por los métodos DPPH y ABTS, temperatura

a la que se obtuvo la mayor extracción de compuestos polifenólicos. Las infusiones con mayor capacidad antioxidante son las de Té Negro y la de Hierbabuena, seguidas de la de Jamaica y Romero; este último, aún siendo de las infusiones con menor contenido polifenólico, presentó una capacidad antioxidante importante. Esto puede deberse a que el Romero, además de polifenoles como el ácido rosmarínico, contiene diversos flavonoides como la genkwanina, luteolina y crisimaritina, que contribuyen de manera importante en la capacidad antioxidante (Del Baño *et al.*, 2013).

**Cuadro 4. Capacidad antioxidante de infusiones herbales preparadas a 95 °C**

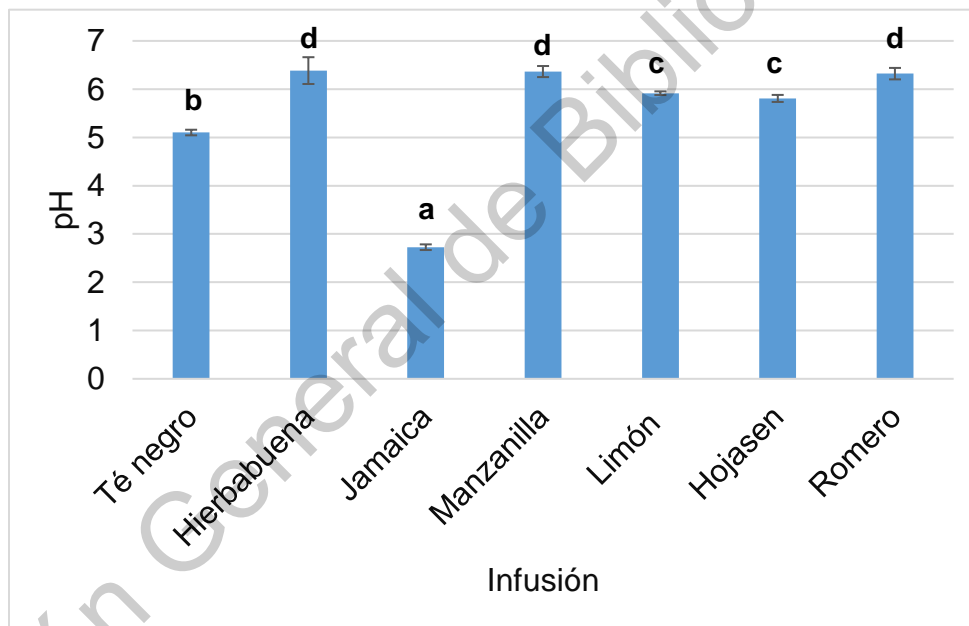
Infusión (1%)	DPPH μmol eq. Tx/mL	ABTS μmol eq. Tx/mL
Té Negro	4.84 ± 0.09e	4.82 ± 0.05e
Hierbabuena	3.67 ± 0.15d	3.14 ± 0.01d
Jamaica	1.38 ± 0.14c	2.05 ± 0.05c
Manzanilla	1.16 ± 0.12bc	1.54 ± 0.07b
Limón	0.91 ± 0.03b	1.53 ± 0.03b
Hojasén	0.56 ± 0.06a	0.55 ± 0.01a
Romero	1.01 ± 0.05b	1.62 ± 0.22b

Valores expresados como la media ± desviación estándar (n=3). Los valores con diferentes letras en la misma columna indican diferencia estadística significativa a un α=0.05

Tx: Trolox.

La tasa de transferencia de compuestos de la materia vegetal a la infusión, así como la estabilidad de los compuestos extraídos, está relacionada con factores como las condiciones de extracción y el pH de la infusión (Pohl *et al.*, 2016). Por otra parte, en la elaboración de kombucha el pH es un parámetro importante puesto que está relacionado con el desarrollo del consorcio microbiano y con la calidad del producto final (Marsh *et al.*, 2014). Debido a lo anterior, fue importante la medición del pH, para la caracterización y seguimiento de las infusiones a partir de las cuales se llevó a cabo la fermentación. En la Figura 4 se muestra el pH de las diferentes infusiones preparadas a 95 °C, donde se observó una evidente diferencia estadística entre las

infusiones de Jamaica y Té Negro, con respecto al grupo conformado por Limón y Hojasén; y el conformado por Hierbabuena, Manzanilla y Romero, cuyo valor de pH no es estadísticamente diferente ( $p$  valor=0.081 y 0.914, respectivamente). Si se toma como referencia el pH de la infusión de té negro ( $5.07 \pm 0.14$ ), se podría pensar que elaborar Kombucha con una infusión de pH inferior podría acortar el tiempo de fermentación requerido. Puesto que se podría alcanzar en menor tiempo el pH final de la Kombucha (entre 2.5 y 3) (Nummer, 2015). Aunque un pH extremadamente bajo como es el caso de la infusión de jamaica, podría repercutir en el metabolismo de los microorganismos del consorcio y por tanto provocar que no se lleve a cabo la fermentación.



**Figura 4. pH de infusiones herbales preparadas a 95 °C**

Valores expresados como la media  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ). Los valores con diferentes letras indican diferencia estadística significativa a un  $\alpha=0.05$ .

## 6.2 Formulación de las mezclas de infusiones

En la actualidad, el mercado se ha enfocado el desarrollo de nuevas formulaciones de infusiones preparadas a partir de una mezcla de diferentes especies de plantas,

a fin de obtener posibles efectos sinérgicos, o bien, incrementar sus propiedades aromáticas y gustativas (Caleja *et al.*, 2019).

En este estudio se elaboraron 2 formulaciones, cada una consistió en la mezcla de tres diferentes plantas de entre las 6 propuestas. Los factores que se tomaron en cuenta para definir las formulaciones fueron el contenido de polifenoles y el pH de las infusiones individuales. En el Cuadro 5 se puede observar una clasificación de acuerdo al contenido polifenólico como alto, medio y bajo. Debido a que un objetivo del estudio fue obtener bebidas con un alto contenido de polifenoles, se decidió que cada formulación debería contar con una planta de contenido polifenólico alto, una de contenido medio y una de contenido bajo. En primer lugar, se separaron las infusiones de Hierbabuena y Jamaica, las de mayor contenido polifenólico, en formulaciones diferentes. Debido al bajo pH de la infusión de Jamaica, se optó por combinar esta infusión con las infusiones del grupo medio y bajo de mayor pH, es decir, con Manzanilla y Romero. Con esto se buscó aumentar el pH de la mezcla para poder llevar a cabo la fermentación, ya que el pH mínimo del producto fermentado debe ser de 2.5, un pH muy cercano al pH de la infusión de Jamaica por sí sola.

Con base a lo anterior, se elaboraron infusiones de mezcla de Jamaica, Manzanilla y Romero (70:20:10) y Hierbabuena, Limón, Hojasén (70:20:10). En el Cuadro 6 se muestra el contenido polifenólico, capacidad antioxidante y pH de las formulaciones JMR y HLH. Se observó que los tres parámetros son significativamente mayores en la mezcla HLH, el contenido polifenólico fue 0.5 veces mayor, y la capacidad antioxidante fue 0.7 veces mayor por la técnica de ABTS y 1.0 veces mayor por la técnica de DPPH.

**Cuadro 5. Factores determinantes de la formulación de mezclas de infusiones**

	Infusión	Polifenoles totales (Eq mg AG/100 mL)	pH
<b>Alto</b>	Hierbabuena	27.62 ± 0.69	6.39 ± 0.28
	Jamaica	22.96 ± 0.33	2.73 ± 0.06
<b>Medio</b>	Manzanilla	11.82 ± 0.10	6.37 ± 0.11
	Limón	9.42 ± 0.18	5.92 ± 0.04
<b>Bajo</b>	Romero	7.03 ± 0.11	6.32 ± 0.12
	Hojasén	7.05 ± 0.06	5.81 ± 0.07

**Cuadro 6. Contenido polifenólico, capacidad antioxidante y pH de las mezclas de infusiones**

		Polifenoles totales (Eq mg AG/100 mL)	Capacidad antioxidante		pH
			ABTS (µmol eq. Tx/mL)	DPPH (µmol eq. Tx/mL)	
Formulación JMR	Jamaica	12.45 ± 0.34 <sup>a</sup>	2.18 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.97 ± 0.12 <sup>a</sup>	4.13 ± 0.02 <sup>a</sup>
	Manzanilla				
	Romero				
Formulación HLH	Hierbabuena	18.14 ± 0.42 <sup>b</sup>	3.68 ± 0.09 <sup>b</sup>	4.07 ± 0.34 <sup>b</sup>	6.40 ± 0.01 <sup>b</sup>
	Limón				
	Hojasén				

Valores expresados como la media ± desviación estándar (n=3). Los valores con diferentes letras en la misma columna indican diferencia estadística significativa a un  $\alpha=0.05$ .

### 6.3 Estudio del efecto de la homogeneización de la biopelícula del consorcio bacteriano sobre la extracción de levaduras y bacterias

La fermentación de Kombucha se inicia inoculando una porción de la biopelícula que contiene al consorcio microbiano (cultivo madre) en té endulzado. Sin embargo,

no existen estudios que evalúen la distribución de las colonias microbianas a través de la biopelícula de Kombucha y, por tanto, que demuestren que al tomar una muestra de consorcio ésta sea representativa. Esto podría repercutir en la producción de lotes de kombucha con diferentes características, es decir, un producto no estandarizado, debido a la probabilidad de no partir de un mismo número de microorganismos al inocular la infusión para su fermentación.

En 2015, Valera y colaboradores realizaron un estudio en el cual evaluaron imágenes de una biopelícula de vinagre de fresa por microscopía confocal láser y microscopía electrónica de barrido a fin de determinar la disposición y morfología celular de los microorganismos presentes. Se observó una distribución celular heterogénea. La presencia de comunidades mixtas de levaduras y bacterias distribuidas irregularmente a través de la matriz de celulosa se ha demostrado en diversos estudios de biopelículas (Domínguez-Manzano *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012). En el Cuadro 7 se presenta la cantidad de levaduras, BAA y BAL extraídas a diferentes tiempos de homogeneización del consorcio bacteriano utilizando un homogeneizador peristáltico. Se puede observar para el caso de levaduras y BAA que a mayor tiempo de homogeneización mayor es la cantidad de microorganismos que se pueden extraer. Para el caso de BAL no se encontró un efecto del tiempo de homogeneización sobre la cantidad de microorganismos extraídos. De acuerdo a los resultados obtenidos se tomó el tiempo de 3 min como el mejor tratamiento para la homogeneización del consorcio, y se utilizó éste para obtener el inóculo a usar en la fermentación a partir de consorcio en suspensión.



**Cuadro 7. Efecto del tiempo de homogeneización sobre cantidad de levaduras, BAA y BAL extraídas del consorcio bacteriano**

Tiempo de homogeneización (min)	Levaduras (Log UFC mL <sup>-1</sup> )	BAA (Log UFC mL <sup>-1</sup> )	BAL (Log UFC mL <sup>-1</sup> )
1	6.30 ± 0.04 <sup>a</sup>	4.13 ± 0.08 <sup>a</sup>	4.36 ± 0.08 <sup>a</sup>
2	6.32 ± 0.05 <sup>a</sup>	4.28 ± 0.04 <sup>b</sup>	4.34 ± 0.02 <sup>a</sup>
3	6.49 ± 0.05 <sup>b</sup>	4.26 ± 0.03 <sup>b</sup>	4.40 ± 0.02 <sup>a</sup>
4	6.40 ± 0.08 <sup>ab</sup>	4.22 ± 0.05 <sup>ab</sup>	4.35 ± 0.04 <sup>a</sup>

Valores expresados como la media ± desviación estándar (n=3). Los valores con diferentes letras en la misma columna indican diferencia estadística significativa a un  $\alpha=0.05$ .

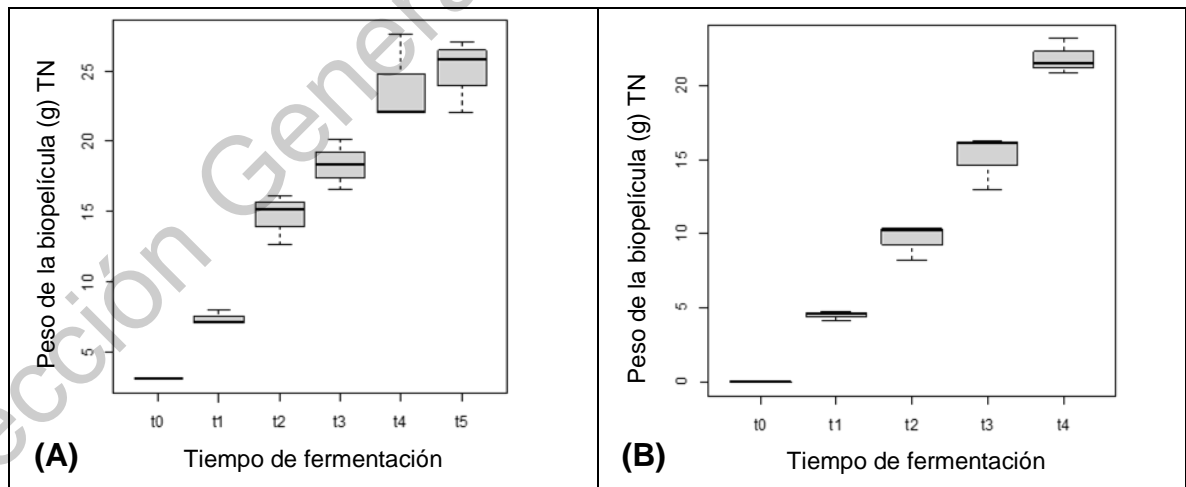
#### **6.4 Efecto del estado físico del inóculo iniciador sobre el contenido polifenólico, pH y producción de biomasa durante la fermentación**

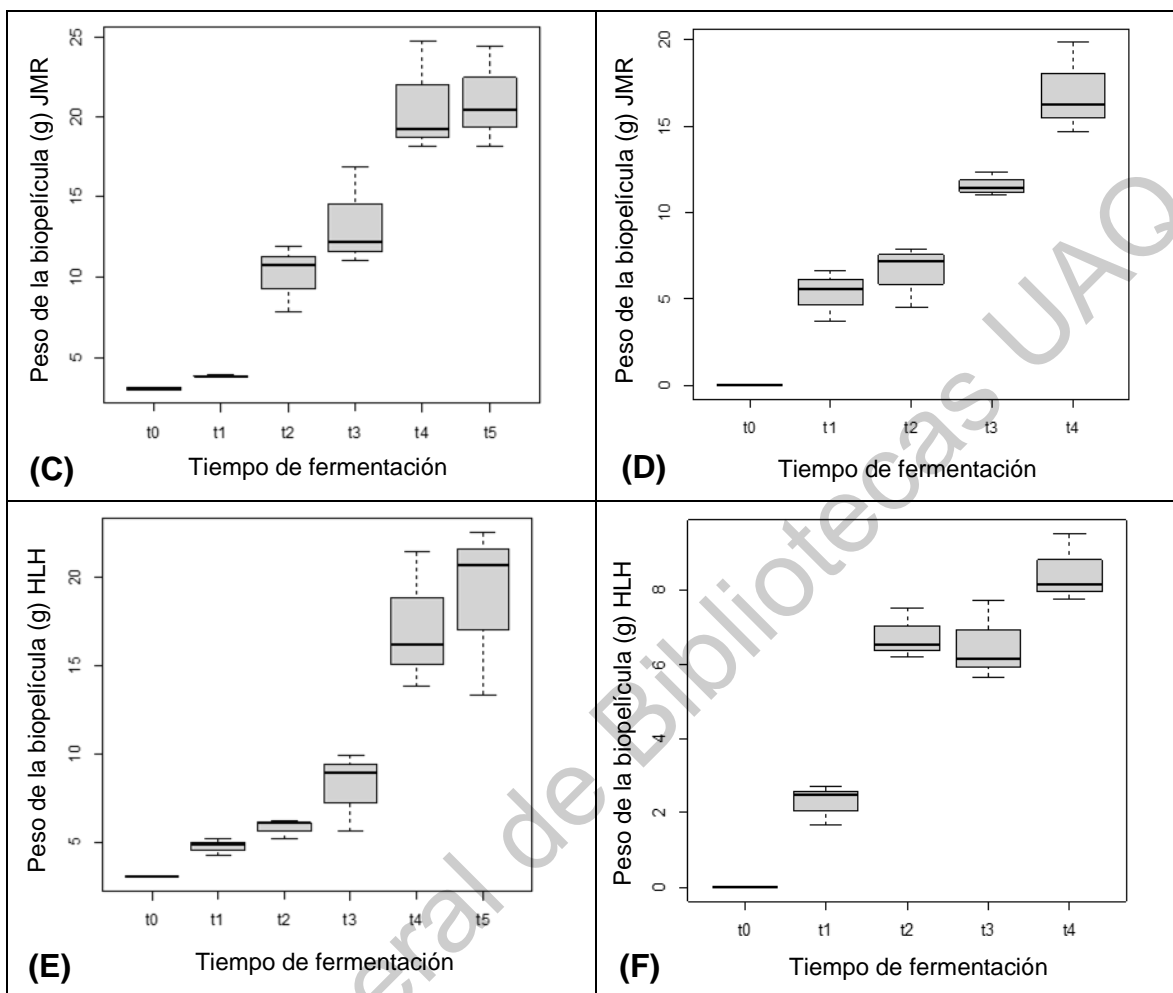
La técnica de inoculación más reportada para la producción de kombucha es la que propone partir de una fracción sólida de la biopelícula (Jayabalan *et al.*, 2014; Chakravorty *et al.*, 2016). Uno de los cambios físicos más evidentes durante la fermentación es el incremento de tamaño de la biopelícula, ya que puede observarse a simple vista; este incremento de tamaño es debido a la producción de celulosa por algunas bacterias durante la fermentación. Sin embargo, durante las primeras fermentaciones realizadas siguiendo esta metodología, se observó una diferencia grande en el tamaño de la biopelícula entre las réplicas de un mismo experimento. Esta variación puede significar que el proceso no sea reproducible y que otros parámetros de importancia varíen de manera significativa entre lotes diferentes del producto.

Debido a esto, y a fin de evitar o disminuir la variación que implicaba utilizar el consorcio sólido en la inoculación, se implementó y estandarizó un método de homogeneización del consorcio. Se inocularon las mezclas de las infusiones JMR, LH y TN, tanto con una alícuota de consorcio homogeneizado como con una fracción de consorcio sólido, se sometieron a 15 días de fermentación y se evaluó el cambio en el peso del consorcio, el pH y el contenido de polifenoles; se evaluó la

dispersión de los valores entre 3 réplicas y como ésta afectaba a la reproducibilidad del experimento.

En la Figura 5 se muestra la distribución de los datos del peso de la biopelícula a diferentes tiempos de fermentación, para las tres formulaciones (TN, JMR y HLH) inoculadas con consorcio sólido y con consorcio homogeneizado. En el caso de TN (Figuras 5A y 5B) se observa una mayor dispersión del peso de biopelícula en las muestras fermentadas a partir de consorcio sólidos que en las fermentadas a partir consorcio homogeneizado. Un comportamiento similar se observa para JMR (figuras 5C y 5D) y para HLH (Figuras 5E y 5F); por ejemplo, para los días 9,12 y 15 de fermentación de JMR se obtuvieron los pesos de  $13.4 \pm 3.1$ ,  $20.7 \pm 3.5$ ,  $21.0 \pm 3.2$ , las desviaciones mostradas corresponden al 23%, 17% y 15% del valor promedio, respectivamente. Para los días 9, 12 y 15 de la fermentación de HLH se obtuvieron los valores de  $8.2 \pm 2.3$ ,  $17.2 \pm 3.9$ ,  $18.9 \pm 4.9$ ; lo que significa 28%, 23% y 26% del valor promedio, respectivamente. Estos valores representan un porcentaje alto considerando que, usualmente, en un proceso reproducible, la desviación estándar no debe ser más del 10 % del valor promedio.



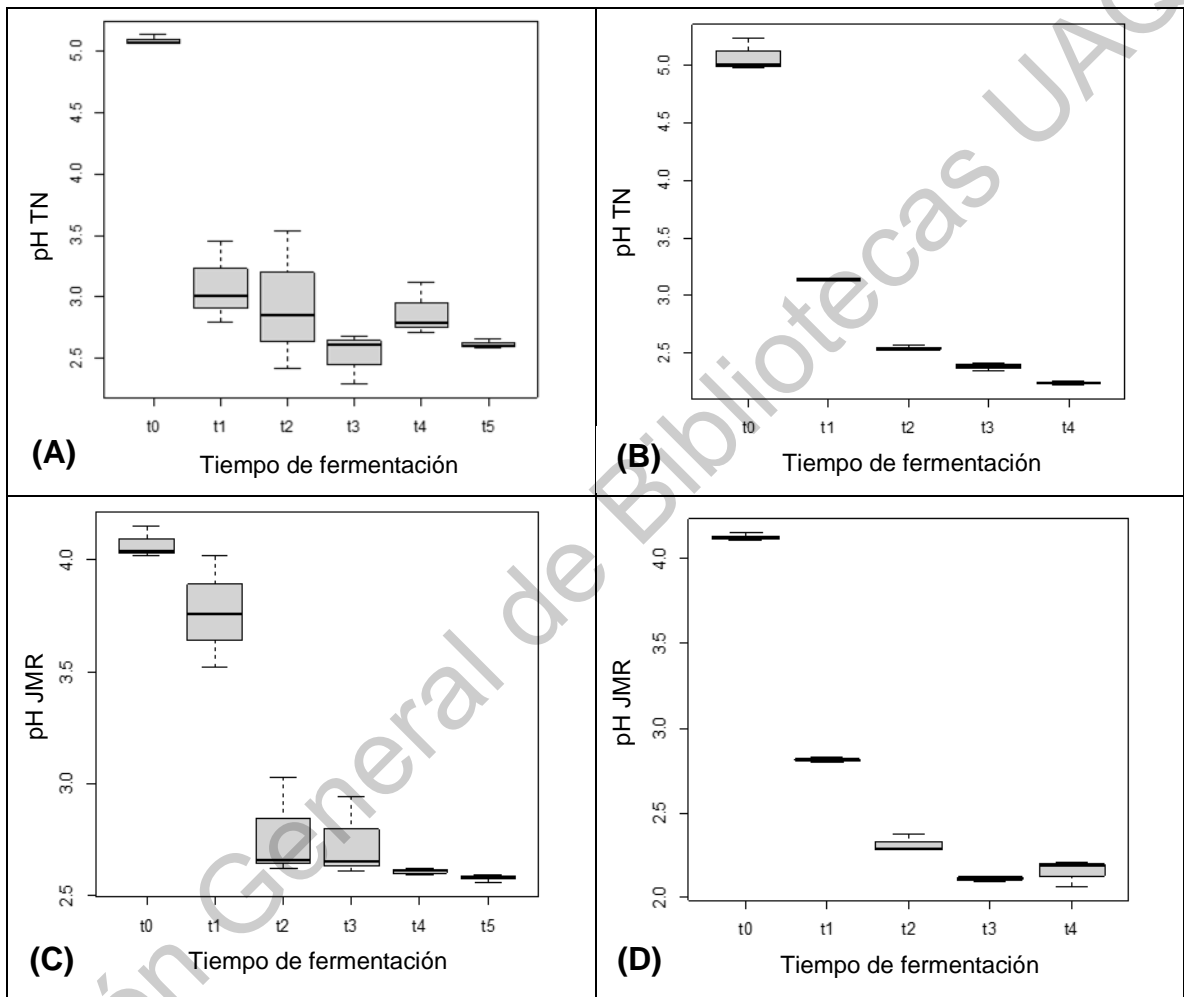


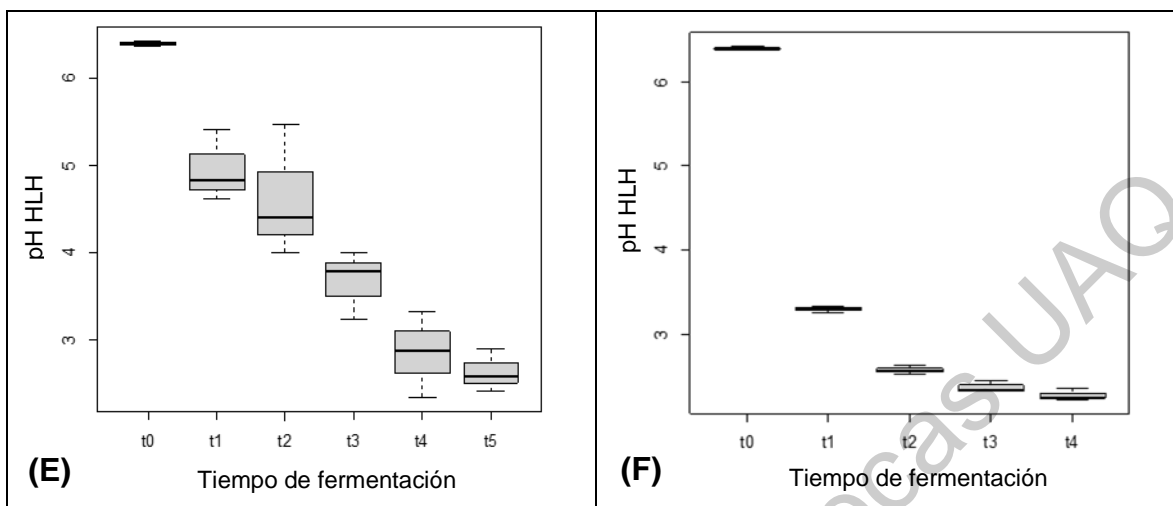
**Figura 5. Dispersión de datos del peso de la biopelícula durante la fermentación de kombuchas con consorcio sólido y consorcio homogeneizado**

A, C y E kombuchas fermentadas a partir de consorcio sólido. B, D y F kombuchas fermentadas a partir de consorcio homogeneizado. t0: día 0, t1: día 3, t2: día 6, t3: día 9, t4: día 12, t5: día 15.

Además del monitoreo del peso de la biopelícula, se consideró de importancia la evaluación del cambio en el pH y polifenoles totales, ya que estos parámetros fueron críticos en la investigación. En la Figura 6 se muestra la distribución de los datos del pH de las tres formulaciones, TN (Figuras 6A y 6B) JMR (Figuras 6C y 6D) y HLH (Figuras 6E y 6F). Se puede observar, de manera general, un comportamiento similar del pH en los dos tipos de fermentaciones (inoculado con consorcio sólido y con consorcio homogeneizado), ya que se observa una caída abrupta del este parámetro en los primeros días de fermentación; sin embargo, la variabilidad de los

datos es mucho más grande en las Kombuchas fermentadas a partir de consorcio sólido, en comparación a las Kombuchas fermentadas a partir de consorcio homogeneizado.





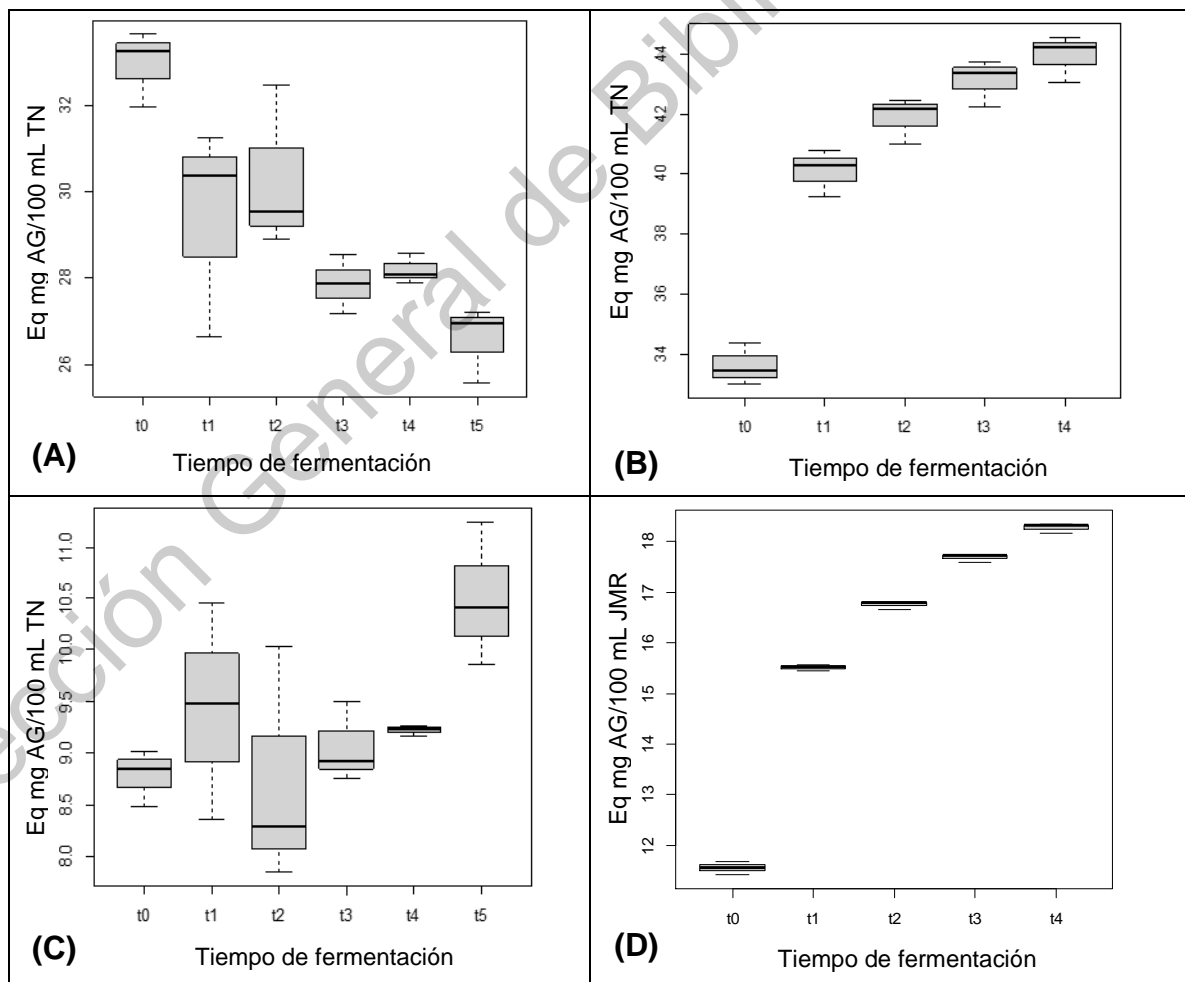
**Figura 6. Dispersión de datos del pH durante la fermentación de mezclas de infusiones con consorcio sólido y homogeneizado**

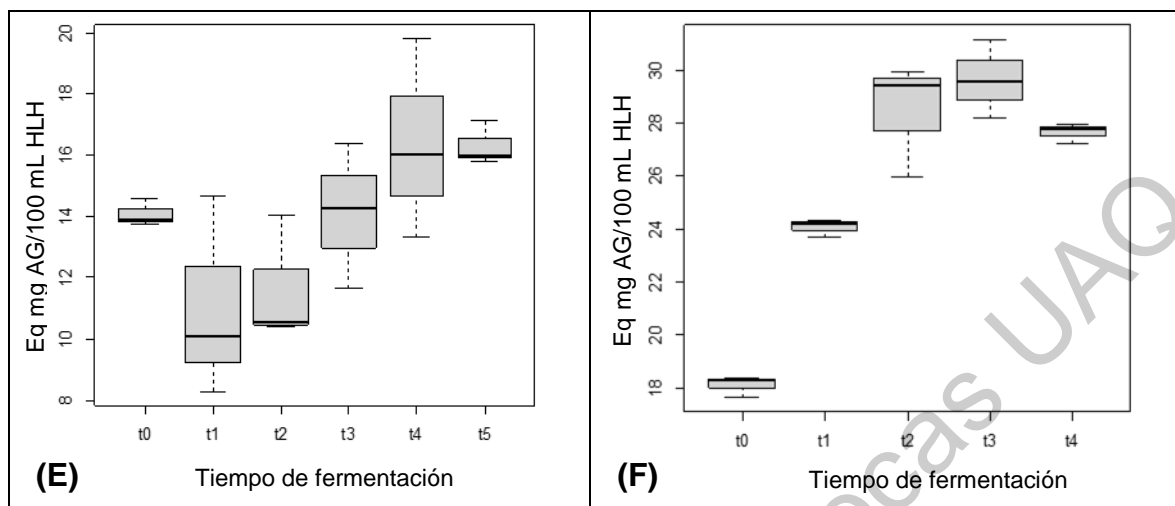
A, C y E kombuchas fermentadas a partir de consorcio sólido. B, D y F kombuchas fermentadas a partir de consorcio homogeneizado. t0: día 0, t1: día 3, t2: día 6, t3: día 9, t4: día 12, t5: día 15.

Respecto a los resultados del contenido polifenólico, se observó de manera general una dispersión de los datos más grande en las fermentaciones con consorcio sólido que las fermentaciones con consorcio homogeneizado en las tres formulaciones. Para el caso de TN, se observa un decremento en el contenido polifenólico conforme avanza la fermentación a partir de consorcio sólido (Figura 7A); sin embargo, la variabilidad de los datos no permite confirmar este hecho con certeza ya que la variabilidad es menor en las Kombuchas inoculadas a partir de consorcio homogeneizado (Figura 7B). Mientras tanto, JMR y HLH presentaron un comportamiento similar. Se observa en las Kombuchas inoculadas a partir de consorcio sólido que el contenido polifenólico se mantiene constante (Figuras 7C y 7E). Sin embargo, la variabilidad de los datos no permite reafirmar este hecho, ya que la variabilidad es menor en las Kombuchas inoculadas a partir de consorcio homogeneizado (Figuras 7D y 7F).

Con base a los datos obtenidos, en el caso de las fermentaciones producidas por la inoculación con consorcio sólido es difícil establecer si una diferencia estadística es causa del tratamiento en sí, o si tiene influencia la variabilidad de los datos.

Una posible causa de la variación de los datos en las Kombuchas producidas a partir de consorcio sólido puede ser el hecho de la utilización de sistemas de microfermentación. Al trabajar con volúmenes pequeños de fermentación se incrementa la variabilidad de los parámetros, esto aunado al hecho de que se ha demostrado que la distribución de las poblaciones bacterianas dentro de la película de este tipo de consorcios no es homogénea (Valera *et al.*, 2015). Por lo que tomar una fracción de la biopelícula para la inoculación puede no ser representativo. De acuerdo a los resultados obtenidos en esta etapa se decidió trabajar únicamente con el consorcio homogeneizado para realizar las fermentaciones de los siguientes objetivos.





**Figura 7. Dispersión de datos del contenido polifenólico durante la fermentación de mezclas de infusiones con consorcio sólido y homogeneizado**

A, C y E kombuchas fermentadas a partir de consorcio sólido. B, D y F kombuchas fermentadas a partir de consorcio homogeneizado. t0: día 0, t1: día 3, t2: día 6, t3: día 9, t4: día 12, t5: día 15.

## 6.5 Efecto de la temperatura sobre las características de la kombucha

Durante la fermentación de kombucha ocurren diversas reacciones bioquímicas, producto del metabolismo de los microorganismos del consorcio bacteriano (Por ejemplo, la producción de ácidos orgánicos a partir de azúcares). Una apropiada selección y control de parámetros en el proceso de fermentación permite la obtención de una bebida de calidad reproducible.

La fermentación de Kombucha regularmente se realiza a temperatura ambiente (20 a 30 °C). Estudios como los realizados por Neffe-Skocińska y colaboradores (2017) y Filippis y colaboradores (2018) demuestran que existe un efecto de la temperatura de fermentación sobre el crecimiento de poblaciones bacterianas que conforman el consorcio, fisicoquímicas y organolépticas del producto.

### 6.5.1 Compuestos polifenólicos totales

En la Figura 8 se presenta el cambio en el contenido de compuestos polifenólicos totales durante la fermentación de cada una de las tres formulaciones de Kombucha (TN, JMR y HLH) a dos diferentes temperaturas, 25 y 30 °C, durante 12 días. Se

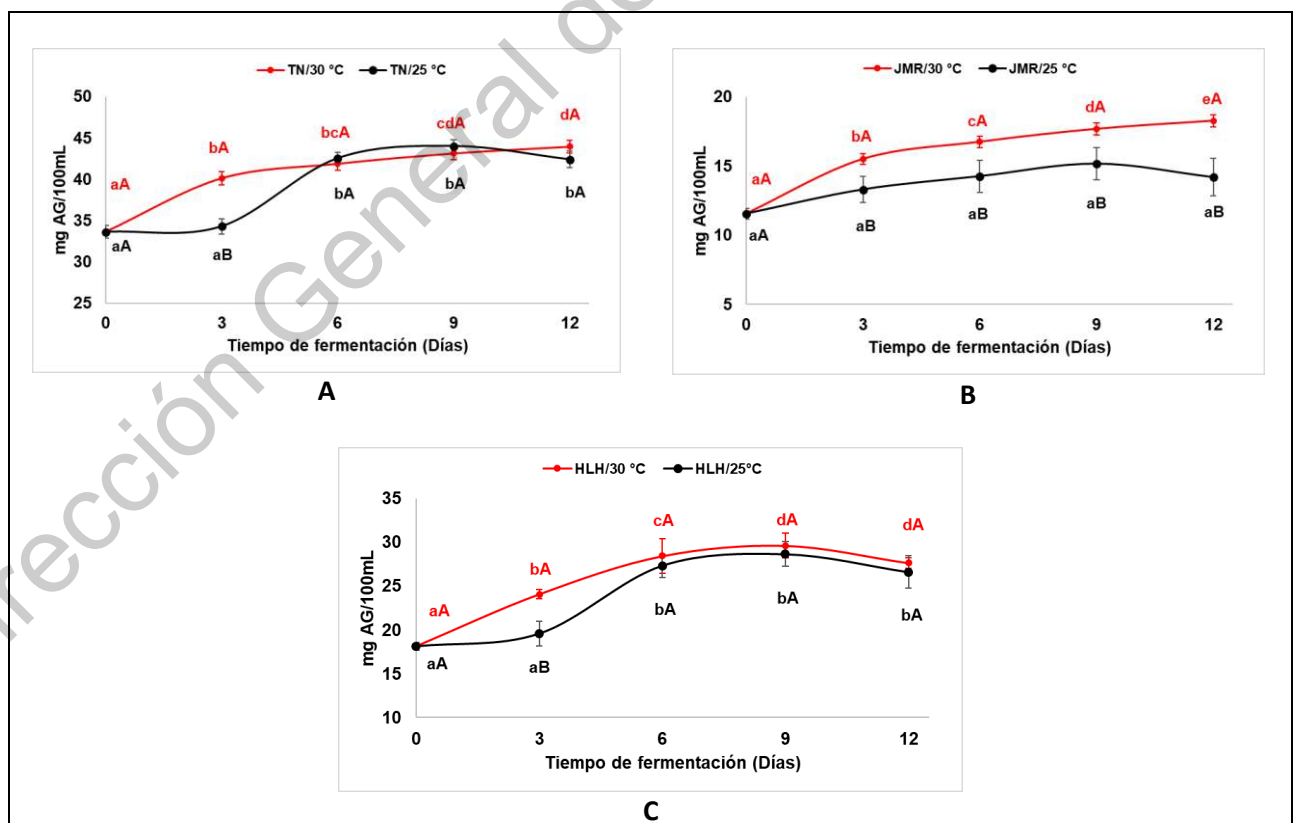
observó un incremento progresivo en la concentración de compuestos polifenólicos totales con el paso del tiempo de fermentación, esto concuerda con lo reportado en otros estudios (Jayabalan *et al.*, 2008; Chakravorty *et al.*, 2016). Este incremento puede deberse a la degradación de polifenoles complejos en componentes de bajo peso molecular por acción de algunas enzimas liberadas por las especies microbianas presentes en el consorcio de Kombucha (Chakravorty *et al.*, 2016; Chandrakala *et al.*, 2019,). Levaduras como *Candida tropicalis* son capaces de degradar compuestos polifenólicos poliméricos. El género *Candida* fue identificado como la levadura dominante en el sistema de Kombucha utilizado por Chakravorty y colaboradores en 2016, y se le atribuyó la posibilidad de la degradación enzimática de complejos de polifenoles y flavonoides a moléculas más pequeñas, resultando en su aumento general con la progresión de la fermentación. La hidrólisis de los polifenoles probablemente es causada por enzimas extracelulares como la tanasa, fitasa,  $\alpha$ -galactosidasa y  $\beta$ - galactosidasa, producidas por diversas levaduras y bacterias (Emiljanowicz y Malinowska-Pańczyk, 2019); ya que se ha demostrado que la aplicación de éstas provoca un incremento en el contenido de compuestos polifenólicos simples en sustratos como lentejas tratadas enzimáticamente (Dueñas *et al.*, 2007) y agua residual de la almazara (proceso de extracción de aceite de oliva) (Hamza *et al.*, 2012). Sin embargo, las vías metabólicas involucradas aún no están dilucidadas, por lo que es importante la identificación de las enzimas extracelulares responsables de la modificación estructural de los componentes durante la fermentación de la Kombucha y la identificación de los potentes metabolitos resultantes responsables de las capacidades de captación de radicales libres (Jayabalan y Waisundara, 2019).

Respecto al efecto de la temperatura, se puede observar para la formulación JMR (Figura 8B) que a 30 °C se obtiene un mayor incremento de polifenoles en comparación con una temperatura de 25 °C. Para las formulaciones TN (Figura 8A) y HLH (Figura 8C) únicamente se observó un mayor incremento a 30 °C a los 3 días de fermentación; mientras tanto, para los días 6, 9 y 12 no se observó una diferencia



significativa entre las dos temperaturas. Esto puede estar asociado a que estas dos formulaciones TN y HLH presentaron un valor de pH inicial más cercano a la alcalinidad, 5.07 y 6.4, respectivamente, en contraste con el valor de 4.13 de la formulación JMR. Según Dueñas y colaboradores (2005), la disminución constante del pH a causa del metabolismo de los microorganismos que participan en la fermentación puede activar algunas enzimas que hidrolizan compuestos polifenólicos poliméricos. Esto podría explicar el incremento mayor de polifenoles a 30 °C en comparación con 20 °C, puesto que a 30 °C la disminución de pH y la actividad microbiana son mayores.

Chakravorty y colaboradores (2016) reportaron un incremento progresivo en el contenido de polifenoles totales de kombucha durante todo el periodo de fermentación, comprendido de 21 días a una temperatura de  $28 \pm 2$  °C. Sin embargo, el pH alcanzado después de este tiempo fue extremadamente bajo ( $1.88 \pm 0.03$ ), lo que puede generar un producto no apto para su consumo.



### **Figura 8. Cambio en el contenido de compuestos polifenólicos totales durante el proceso de fermentación a 25 y 30 °C durante 12 días**

Valores expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar (n=3). Los valores de medias seguidas de letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas en el tiempo y las medias seguidas de letras mayúsculas diferentes representan diferencias significativas con respecto a la temperatura a un valor  $\alpha = 0.05$ . (A) Té Negro, (B) Jamaica/Manzanilla/Romero, (C) Hierbabuena/Zacate de limón/Hojasén.

AG: Ácido gálico.

## **6.5.2 Parámetros físicos y químicos**

### **6.5.2.1 pH y acidez titulable**

El pH es uno de los factores que describe y determina el curso de la fermentación de Kombucha y se puede utilizar para determinar el final del proceso, y como parámetro de calidad de la bebida. Además, es un factor que puede favorecer o inhibir el desarrollo bacteriano (Malbaša, Lončar y Djuric, 2008). En el Cuadro 8 se presenta el efecto de la fermentación a 25 °C y 30 °C sobre el pH de las tres formulaciones de Kombucha. Se observó una disminución rápida del pH al inicio de la fermentación en las tres formulaciones. En los primeros 3 días de fermentación el pH disminuyó rápidamente en aproximadamente 2, 1.5 y 3 unidades para TN, JMR y HLH, respectivamente, y después la disminución fue más lenta del día 3 al 12 de fermentación, aproximadamente 1, 0.6 y 1 unidades para TN, JMR y HLH, respectivamente. Esto puede estar asociado con el efecto amortiguador que surgen de las reacciones entre los ácidos orgánicos sintetizados y los minerales del sustrato, como el anión hidrogenocarbonato anfiprótico ( $\text{HCO}_3^-$ ), que reacciona fácilmente con los iones de hidrógeno de los ácidos orgánicos presentes en el medio de fermentación, evitando cambios adicionales en el pH (Malbaša, Lončar y Djuric, 2008; Velićanski *et al.*, 2014).

**Cuadro 8. Valores de pH en bebidas kombucha durante 12 días de fermentación a temperaturas de 25 °C y 30 °C**

Kombucha	Días de fermentación				
	0	3	6	9	12
<b>TN/30 °C</b>	5.07 ± 0.14 <sup>aB</sup>	3.14 ± 0.02 <sup>bC</sup>	2.37 ± 0.01 <sup>cB</sup>	2.18 ± 0.02 <sup>dAB</sup>	2.06 ± 0.02 <sup>dA</sup>
<b>TN/25 °C</b>	5.07 ± 0.14 <sup>aB</sup>	3.36 ± 0.02 <sup>bE</sup>	2.54 ± 0.03 <sup>cC</sup>	2.39 ± 0.03 <sup>cdC</sup>	2.24 ± 0.02 <sup>dB</sup>
<b>JMR/30 °C</b>	4.13 ± 0.02 <sup>aA</sup>	2.41 ± 0.01 <sup>bA</sup>	2.24 ± 0.01 <sup>cA</sup>	2.11 ± 0.01 <sup>dA</sup>	2.01 ± 0.03 <sup>eA</sup>
<b>JMR/25 °C</b>	4.13 ± 0.02 <sup>aA</sup>	2.81 ± 0.01 <sup>bB</sup>	2.31 ± 0.05 <sup>cAB</sup>	2.16 ± 0.02 <sup>dAB</sup>	2.06 ± 0.03 <sup>eA</sup>
<b>HLH/30 °C</b>	6.40 ± 0.01 <sup>aC</sup>	3.30 ± 0.04 <sup>bD</sup>	2.37 ± 0.04 <sup>cB</sup>	2.23 ± 0.04 <sup>dB</sup>	2.09 ± 0.01 <sup>eA</sup>
<b>HLH/25 °C</b>	6.40 ± 0.01 <sup>aC</sup>	3.36 ± 0.01 <sup>bE</sup>	2.57 ± 0.05 <sup>cC</sup>	2.37 ± 0.08 <sup>dC</sup>	2.28 ± 0.07 <sup>dB</sup>

Los valores se expresaron como la media ± la desviación estándar (n=3). Las medias en una misma fila seguidas de letras minúsculas diferentes y medias en una misma columna seguidas de letras mayúsculas diferentes representan diferencias significativas a un valor  $\alpha = 0.05$ .

Se encontraron diferencias significativas en el pH para los cinco tiempos de fermentación, así como entre los dos niveles de temperatura. En todos los casos el pH fue menor en las formulaciones fermentadas a 30 °C. El pH inicial de las bebidas no fermentadas fue estadísticamente diferente para TN, JMR y HLH (5.07, 4.13 y 6.40, respectivamente) sin embargo, el pH alcanzado después de 12 días de fermentación fue muy parecido en todos los casos, difiriendo significativamente solo los valores de pH de las Kombuchas de TN y HLH fermentadas a 25 °C (Cuadro 8). La disminución de los valores de pH sigue el incremento progresivo de la acidez (Cuadro 9), esto es debido a la actividad metabólica de las bacterias y levaduras que metabolizan la sacarosa a diversos ácidos orgánicos como el ácido acético y ácido glucurónico. La Kombucha JMR fue la bebida que obtuvo los valores más altos de acidez titulable. De acuerdo con Velićanski y colaboradores (2014), para obtener una bebida de acidez agradable, la fermentación debe finalizar cuando la acidez total (expresada como ácido acético) alcance el valor de 4 a 4.5 g/L. Sin embargo, el periodo de tiempo para obtener este valor puede diferir según el origen del medio de cultivo y las condiciones de fermentación.

Esta tendencia del aumento progresivo de la acidez titulable y la disminución rápida del pH al inicio del proceso es típica de la fermentación de Kombucha y también fue observada en otros estudios donde se trabajó con té negro (Jayabalan *et al.*, 2007;

Chakravorty *et al.*, 2016; Neffe-Skocińska *et al.*, 2017); así como, en estudios con otras infusiones como en el realizado por Velićanski y colaboradores en 2014 donde se utilizó una infusión de toronjil (*Melissa officinalis* L).

**Cuadro 9. Acidez titulable en bebidas kombucha durante 12 días de fermentación a temperaturas de 25 °C y 30 °C**

Kombucha	Días de fermentación					
	0	3	6	9	12	
Acidez titulable (g/L) *	TN/30 °C	0.02 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.49 ± 0.01 <sup>bB</sup>	1.33 ± 0.07 <sup>cA</sup>	2.19 ± 0.09 <sup>dA</sup>	3.51 ± 0.18 <sup>eA</sup>
	TN/25 °C	0.02 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>aA</sup>	1.19 ± 0.06 <sup>bA</sup>	1.99 ± 0.04 <sup>cA</sup>	2.09 ± 0.20 <sup>cA</sup>
	JMR/30 °C	1.01 ± 0.05 <sup>aB</sup>	2.81 ± 0.21 <sup>bD</sup>	3.35 ± 0.63 <sup>bB</sup>	7.81 ± 1.27 <sup>cB</sup>	7.70 ± 1.33 <sup>cB</sup>
	JMR/25 °C	1.01 ± 0.05 <sup>aB</sup>	1.76 ± 0.20 <sup>aC</sup>	4.07 ± 0.41 <sup>bB</sup>	6.55 ± 0.88 <sup>cB</sup>	7.04 ± 0.67 <sup>cB</sup>
	HLH/30 °C	0.02 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.51 ± 0.05 <sup>bB</sup>	1.66 ± 0.20 <sup>cA</sup>	2.57 ± 0.04 <sup>dA</sup>	3.71 ± 0.40 <sup>eA</sup>
	HLH/25 °C	0.02 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.20 ± 0.01 <sup>aAB</sup>	1.33 ± 0.07 <sup>bA</sup>	2.59 ± 0.18 <sup>cA</sup>	2.91 ± 0.12 <sup>dA</sup>

Los valores se expresaron como la media ± la desviación estándar (n=3). Las medias en una misma fila seguidas de letras minúsculas diferentes y medias en una misma columna seguidas de letras mayúsculas diferentes representan diferencias significativas a un valor  $\alpha = 0.05$ .

\* g de ácido acético/L.

Diversos estudios afirman que a medida que aumenta el tiempo de fermentación es posible la producción de mayor cantidad de metabolitos beneficiosos para la salud, como el contenido de polifenoles totales, flavonoides totales y ácido D-sacárico 1,4-lactona (Chakravorty *et al.*, 2016); así como, el contenido de ácido glucurónico (Neffe-Skocińska *et al.*, 2017). Sin embargo, son pocos los estudios que han evaluado el efecto de procesos de fermentación prolongados sobre la calidad sensorial e inocuidad de la bebida. Nummer (2013) estableció que llevar la fermentación más allá de 10 días puede aumentar la acidez a niveles potencialmente dañinos para los consumidores. En este estudio también se estableció que para que el consumo de Kombucha sea seguro para el consumidor el pH debe ser menor o igual a 4.2, pero no menor de 2.5. Un pH menor a 4.2 puede inhibir el crecimiento de patógenos a humanos, por su parte, un pH mayor a 2.5 puede prevenir intoxicaciones por acidosis.

De acuerdo a lo anterior, en esta investigación el periodo adecuado de fermentación fue de 6 días para TN y HLH, y aproximadamente de 4 días para JMR. Tiempo en el cual se alcanza el pH mínimo permitido.

#### **6.5.2.2 Azúcares reductores**

La sacarosa disuelta en el medio se hidrolizada por la enzima invertasa de las levaduras en glucosa y fructosa; estos azúcares reductores se utilizan en la producción de etanol, ácido acético, entre otros compuestos. La medición de los azúcares reductores durante la fermentación se puede utilizar como un indicador de la actividad microbiana (Velićanski *et al.*, 2014)

En el Cuadro 10 se presenta el cambio en el contenido total de azúcares reductores en las tres Kombuchas formuladas, durante la fermentación a 25 °C y 30 °C. En los tres casos se observó una producción significativa de azúcares reductores en los primeros 6 días de fermentación, seguido de una disminución por el resto del tiempo del proceso. El incremento inicial de azúcares reductores se puede atribuir a la hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa. Posteriormente, estos azúcares son utilizados para la producción de etanol principalmente, entre otros productos.

Se observó una diferencia significativa en el contenido de azúcares reductores por efecto de la temperatura de fermentación. De manera general, el contenido de azúcares reductores fue mayor a 25 °C que a 30 °C. se pudo observar que después de 12 días de fermentación sigue habiendo azúcares disponibles en las bebidas que no han sido utilizados por los microorganismos, esto puede deberse al bajo pH alcanzado, el cual no permite el desarrollo de las comunidades bacterianas. La Kombucha JMR fue la que presentó una cantidad significativamente mayor de azúcares reductores a los 9 y 12 días, lo cual puede indicar que después de los 6 días, el metabolismo de los microorganismos es mal lento en la Kombucha JMR, por lo que hay una menor utilización de los azúcares disponibles. Esto puede explicarse por el bajo pH y la elevada acidez alcanzada en los días 9 y 12, que representa un medio hostil para el consorcio bacteriano.

Los resultados encontrados difieren de los reportados por Chakravorty y colaboradores (2016), en donde se utilizó la misma concentración de sacarosa. Si bien la tendencia de los datos es la misma, es decir, se observó un incremento en los primeros días de fermentación y una disminución al final de ésta, la concentración de azúcares reductores totales en el estudio en mención es menor en todos los tiempos evaluados. Esto supone que hay una mayor actividad del consorcio utilizado por Chakravorty y colaboradores, que desencadena en una rápida utilización de los azúcares. Las diferencias en los parámetros físicos y químicos y la duración del proceso en diferentes estudios son de esperarse, puesto que los cultivos de kombucha que se originan en diferentes ubicaciones geográficas no tienen composiciones químicas y microbiológicas estandarizadas (Velićanski *et al.*, 2014).

**Cuadro 10. Contenido de azúcares reductores en bebidas kombucha durante 12 días de fermentación a temperaturas de 25 °C y 30 °C**

	Kombucha	Días de fermentación				
		0	3	6	9	12
Azúcares reductores (g/L)	TN/30 °C	0.85 ± 0.03 <sup>aB</sup>	16.30 ± 0.97 <sup>bB</sup>	22.31 ± 2.22 <sup>cA</sup>	14.87 ± 3.17 <sup>bA</sup>	14.15 ± 1.98 <sup>bA</sup>
	TN/25 °C	0.85 ± 0.03 <sup>aB</sup>	7.00 ± 0.52 <sup>bA</sup>	22.58 ± 0.28 <sup>cA</sup>	18.30 ± 1.68 <sup>dAB</sup>	16.27 ± 1.84 <sup>dA</sup>
	JMR/30 °C	0.62 ± 0.08 <sup>aA</sup>	20.79 ± 1.68 <sup>bBC</sup>	37.38 ± 1.53 <sup>cB</sup>	30.65 ± 2.50 <sup>dC</sup>	24.21 ± 2.83 <sup>bB</sup>
	JMR/25 °C	0.62 ± 0.08 <sup>aA</sup>	25.27 ± 3.21 <sup>bCD</sup>	39.50 ± 6.35 <sup>cB</sup>	33.15 ± 1.51 <sup>bcC</sup>	27.29 ± 2.66 <sup>bB</sup>
	HLH/30 °C	0.78 ± 0.01 <sup>aB</sup>	24.42 ± 1.55 <sup>bCD</sup>	35.22 ± 1.71 <sup>cB</sup>	22.48 ± 1.14 <sup>bB</sup>	17.15 ± 0.71 <sup>dA</sup>
	HLH/25 °C	0.78 ± 0.01 <sup>aB</sup>	28.67 ± 3.11 <sup>bcD</sup>	34.05 ± 2.83 <sup>cB</sup>	23.30 ± 1.00 <sup>bB</sup>	15.96 ± 1.97 <sup>dA</sup>

Los valores se expresaron como la media ± la desviación estándar (n=3). Las medias en una misma fila seguidas de letras minúsculas diferentes y medias en una misma columna seguidas de letras mayúsculas diferentes representan diferencias significativas a un valor  $\alpha = 0.05$ .

### 6.5.2.3 Peso de la biopelícula

La biopelícula formada durante la fermentación incrementa su peso como consecuencia del crecimiento de los microorganismos que conforman el consorcio y la biosíntesis de componentes de la biopelícula, principalmente polisacáridos como la celulosa. La formación de biopelículas de celulosa por especies de BAA, se ha reportado con anterioridad y su formación contribuye a la resistencia de los microorganismos al ambiente ácido (Wang *et al.*, 2012).

En el Cuadro 11 se presenta el cambio en el peso de la biopelícula formada en las tres formulaciones a 25 y 30 °C durante el proceso de fermentación. Se observó un incremento significativo en los tres casos conforme el paso del tiempo, los pesos de biopelícula más bajos se observaron en la formulación HLH; este incremento pudo observarse a simple vista, como lo muestran las Figuras 9, 10 y 11.

Respecto al efecto de la temperatura se observó que el peso de las biopelículas en las bebidas fermentadas a 30 °C fue significativamente mayor en comparación a las bebidas obtenidas a 25 °C. Los resultados sugieren que hay un mayor desarrollo de las bacterias responsables de la formación de la biopelícula de celulosa a 30 °C. La producción de celulosa es atribuida a bacterias del género *Acetobacter*, específicamente a la especie *Acetobacter xylinum* (reclasificada como *Guconobacter Xylinus* y recientemente como *Komagataeibacter*) (Jayabalan *et al.*, 2014; Villarreal-Soto *et al.*, 2018; Kapp y Sumner, 2019). Chakravorty y colaboradores (2016) encontraron dentro de la composición bacteriana una abundancia de *Komagataeibacter sp* de alrededor de 50 %, tanto en la biopelícula como en el medio líquido, siendo este género la bacteria predominante en el sistema.

**Cuadro 11. Peso del consorcio en bebidas kombucha durante 12 días de fermentación a temperaturas de 25 °C y 30 °C**

Kombucha	Días de fermentación	Días de fermentación				
		0	3	6	9	12
Peso del consorcio (g)	TN/30 °C	0 <sup>aA</sup>	4.52 ± 0.30 <sup>bC</sup>	9.64 ± 1.23 <sup>cC</sup>	15.16 ± 1.87 <sup>dC</sup>	21.85 ± 1.20 <sup>eC</sup>
	TN/25 °C	0 <sup>aA</sup>	0.11 ± 0.03 <sup>aA</sup>	0.95 ± 0.67 <sup>bA</sup>	7.75 ± 0.29 <sup>cA</sup>	18.23 ± 4.16 <sup>dBC</sup>
	JMR/30 °C	0 <sup>aA</sup>	5.28 ± 1.50 <sup>bC</sup>	6.53 ± 1.75 <sup>bB</sup>	11.57 ± 0.66 <sup>cB</sup>	16.25 ± 1.57 <sup>dB</sup>
	JMR/25 °C	0 <sup>aA</sup>	0.13 ± 0.11 <sup>aA</sup>	2.95 ± 0.27 <sup>bA</sup>	6.11 ± 0.15 <sup>cA</sup>	7.01 ± 0.69 <sup>cA</sup>
	HLH/30 °C	0 <sup>aA</sup>	2.28 ± 0.55 <sup>bB</sup>	6.76 ± 0.69 <sup>cB</sup>	6.51 ± 1.07 <sup>cA</sup>	8.47 ± 0.92 <sup>cA</sup>
	HLH/25 °C	0 <sup>aA</sup>	0.37 ± 0.09 <sup>bA</sup>	1.25 ± 0.22 <sup>cA</sup>	5.35 ± 2.19 <sup>dA</sup>	5.73 ± 0.77 <sup>dA</sup>

Los valores se expresaron como la media ± la desviación estándar (n=3). Las medias en una misma fila seguidas de letras minúsculas diferentes y medias en una misma columna seguidas de letras mayúsculas diferentes representan diferencias significativas a un valor  $\alpha = 0.05$ .







Figura 9. Evolución de kombucha y consorcio de té negro durante 12 días de fermentación. (A) 25 °C, (B) 30°C





Figura 10. Evolución de kombucha y consorcio JMR durante 12 días de fermentación. (A) 25 °C, (B) 30°C





**Figura 11. Evolución de kombucha y consorcio de HLH durante 12 días de fermentación. (A) 25 °C, (B) 30°C**

### 6.5.3 Capacidad antioxidante

La capacidad de las tres kombuchas formuladas para atrapar radicales como ABTS y DPPH se muestra en el Cuadro 12. En general, se observó una mayor capacidad antioxidante de la Kombucha TN, seguida de HLH y JMR, tanto en la bebida sin fermentar (tiempo cero) como en las kombuchas obtenidas en los diferentes tiempos.

Respecto al tiempo de fermentación en las Kombuchas TN y HLH no se observó un cambio significativo en la capacidad para inhibir el radical ABTS en los primeros días de fermentación, si no hasta después de los 9 o 12 días. Por el contrario, en el caso de la Kombucha JMR fermentada a 30 °C se observó un incremento significativo a los 3 días de fermentación; sin embargo, la capacidad antioxidante permaneció sin cambios por el resto del tiempo de fermentación. Esto puede explicarse por el hecho de que la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos está relacionada con su estructura química (Dueñas *et al*, 2005); lo que puede

indicar que después de cierto tiempo de fermentación los compuestos formados poseen una actividad antioxidante baja, que no alcanza impactar significativamente en la capacidad antioxidante total.

En cuanto a la inhibición del radical DPPH se observó un incremento significativo dentro de los primeros 3 a 6 días de fermentación para la Kombucha TN, periodo después del cual se mantiene sin cambios. En el caso de JMR y HLH la capacidad para inhibir al radical DPPH incrementa significativamente hasta una etapa final de la fermentación (9 a 12 días).

En cuanto a la temperatura, no se encontró efecto de esta sobre la capacidad de inhibición de los radicales ABTS y DPPH por parte de las tres Kombuchas formuladas. Sin embargo, se observó que se alcanzó más rápido un incremento significativo a 30 °C que a 25 °C. Los resultados obtenidos con los métodos ABTS y DPPH permiten alcanzar conclusiones prácticamente similares.

Aunque se observó un incremento en la capacidad antioxidante, este no es proporcional al incremento de polifenoles totales, en donde se observó un incremento progresivo en los primeros 6 días de fermentación. Esto puede explicarse por el hecho de que el número de grupos OH fenólicos no es siempre el único factor que determina la capacidad antioxidante. Sino que la posición de los grupos OH fenólicos, la presencia de otros grupos funcionales, como los dobles enlaces y su conjugación con los grupos OH y cetónicos, así como la polaridad e hidrofobicidad de la molécula también juegan un papel importante en las actividades antioxidantes (Romano *et al.*, 2009).

Además, se sabe que el potencial antioxidante total de las frutas, verduras, té y las infusiones de hierbas está regido por los efectos aditivos y sinérgicos de los fitoquímicos en conjunto y no por el efecto antioxidante específico individual. Debido a esto, las propiedades antioxidantes de un solo compuesto dentro de un grupo pueden variar notablemente (Velićanski *et al.*, 2014).

**Cuadro 12. Capacidad antioxidante por ABTS y DPPH en bebidas kombucha durante 12 días de fermentación a temperaturas de 25 °C y 30 °C**

Kombucha		Días de fermentación				
		0	3	6	9	12
ABTS ( $\mu\text{mol eq. Tx/mL}$ )	TN/30 °C	4.47 $\pm$ 0.04 <sup>aC</sup>	4.50 $\pm$ 0.03 <sup>aE</sup>	4.85 $\pm$ 0.30 <sup>abC</sup>	5.19 $\pm$ 0.14 <sup>bcD</sup>	5.56 $\pm$ 0.14 <sup>cd</sup>
	TN/25 °C	4.46 $\pm$ 0.08 <sup>aC</sup>	4.20 $\pm$ 0.16 <sup>abDE</sup>	4.42 $\pm$ 0.09 <sup>abBC</sup>	4.73 $\pm$ 0.23 <sup>bCD</sup>	4.79 $\pm$ 0.20 <sup>bc</sup>
	JMR/30 °C	2.18 $\pm$ 0.10 <sup>aA</sup>	2.81 $\pm$ 0.29 <sup>bB</sup>	2.95 $\pm$ 0.14 <sup>bA</sup>	3.05 $\pm$ 0.06 <sup>bA</sup>	2.99 $\pm$ 0.07 <sup>bB</sup>
	JMR/25 °C	2.09 $\pm$ 0.15 <sup>aA</sup>	2.32 $\pm$ 0.13 <sup>abA</sup>	2.38 $\pm$ 0.26 <sup>abA</sup>	2.50 $\pm$ 0.05 <sup>bA</sup>	2.57 $\pm$ 0.05 <sup>bA</sup>
	HLH/30 °C	3.68 $\pm$ 0.09 <sup>aB</sup>	3.75 $\pm$ 0.02 <sup>abC</sup>	4.08 $\pm$ 0.28 <sup>abB</sup>	4.20 $\pm$ 0.19 <sup>bBC</sup>	4.71 $\pm$ 0.17 <sup>cC</sup>
	HLH/25 °C	3.57 $\pm$ 0.43 <sup>aB</sup>	3.78 $\pm$ 0.17 <sup>aCD</sup>	3.84 $\pm$ 0.15 <sup>aB</sup>	3.91 $\pm$ 0.41 <sup>aB</sup>	4.74 $\pm$ 0.15 <sup>bc</sup>
DPPH ( $\mu\text{mol eq. Tx/mL}$ )	TN/30 °C	3.77 $\pm$ 0.1 <sup>aB</sup>	4.32 $\pm$ 0.09 <sup>bB</sup>	4.87 $\pm$ 0.15 <sup>cC</sup>	5.01 $\pm$ 0.18 <sup>cC</sup>	5.10 $\pm$ 0.21 <sup>cd</sup>
	TN/25 °C	3.97 $\pm$ 0.20 <sup>aB</sup>	4.16 $\pm$ 0.10 <sup>abB</sup>	4.39 $\pm$ 0.10 <sup>bcBC</sup>	4.50 $\pm$ 0.05 <sup>cB</sup>	4.97 $\pm$ 0.13 <sup>dD</sup>
	JMR/30 °C	1.97 $\pm$ 0.12 <sup>aA</sup>	1.92 $\pm$ 0.21 <sup>aA</sup>	2.08 $\pm$ 0.10 <sup>aA</sup>	2.12 $\pm$ 0.08 <sup>aA</sup>	2.76 $\pm$ 0.10 <sup>bB</sup>
	JMR/25 °C	1.67 $\pm$ 0.09 <sup>aA</sup>	1.67 $\pm$ 0.20 <sup>aA</sup>	1.92 $\pm$ 0.05 <sup>abA</sup>	2.03 $\pm$ 0.19 <sup>abA</sup>	2.06 $\pm$ 0.11 <sup>bA</sup>
	HLH/30 °C	4.07 $\pm$ 0.34 <sup>aB</sup>	4.20 $\pm$ 0.29 <sup>aB</sup>	4.30 $\pm$ 0.38 <sup>aB</sup>	4.54 $\pm$ 0.26 <sup>abBC</sup>	4.83 $\pm$ 0.04 <sup>bcD</sup>
	HLH/25 °C	3.94 $\pm$ 0.06 <sup>aB</sup>	4.18 $\pm$ 0.05 <sup>abB</sup>	4.16 $\pm$ 0.13 <sup>abB</sup>	4.45 $\pm$ 0.23 <sup>bB</sup>	4.52 $\pm$ 0.13 <sup>bc</sup>

Los valores se expresaron como la media  $\pm$  la desviación estándar (n=3). Las medias en una misma fila seguidas de letras minúsculas diferentes y medias en una misma columna seguidas de letras mayúsculas diferentes representan diferencias significativas a un valor  $\alpha = 0.05$ .

#### 6.5.4 Análisis microbiológico

En el Cuadro 13 se presenta el contenido de levaduras, BAA y BAL del consorcio o biopelícula de las tres Kombucha formuladas, a los 0, 6 y 12 días de fermentación a 25 °C y 30 °C. La población predominante en el inóculo (día cero) fueron las levaduras con una concentración aproximada de 5.6 log CFU ml<sup>-1</sup>; mientras que, las BAA y BAL se encontraron en 4.5 y 4.8 log CFU ml<sup>-1</sup>, respectivamente. De forma general, la concentración de levaduras y BAL incrementó a los 6 días de fermentación, y disminuyó a los 12 días, por su parte en el caso de las BAA se observó un incremento significativo tanto a los 6 días como a los 12.

Respecto al efecto de la temperatura se observó en las Kombuchas JMR y HLH que tuvieron una mayor población de levaduras a 30 °C. La concentración de BAA en JMR y HLH se vio afectada por la temperatura solamente en el día 12, habiendo una mayor producción a 30 °C. Finalmente en el caso de BAL, no se observó efecto sobre las poblaciones.

La disminución de las poblaciones de BAA y BAL observada a los 12 días pudo ser causada por un choque ácido (bajo pH), el cual influye en la multiplicación de bacterias y levaduras (Villareal-soto *et al.*, 2018). El dióxido de carbono generado durante la fermentación alcohólica se acumula en la superficie, principalmente en la interfase entre la biopelícula y el líquido, dificultando la transferencia de nutrientes del líquido a la biopelícula (Jayabalan *et al.*, 2007).

**Cuadro 13. Concentración de levaduras BAA y BAL en consorcios de kombucha durante 12 días de fermentación a temperaturas de 25 °C y 30 °C**

Especie microbiana (log CFU mL <sup>-1</sup> )	Consortio	Días de fermentación		
		0	6	12
Levaduras	TN/30 °C	5.72 ± 0.05 <sup>aA</sup>	6.23 ± 0.28 <sup>bBC</sup>	4.14 ± 0.37 <sup>cA</sup>
	TN/25 °C	5.54 ± 0.21 <sup>aA</sup>	6.40 ± 0.06 <sup>bC</sup>	5.65 ± 0.32 <sup>aBC</sup>
	JMR/30 °C	5.72 ± 0.05 <sup>aA</sup>	6.19 ± 0.13 <sup>bBC</sup>	5.97 ± 0.23 <sup>abC</sup>
	JMR/25 °C	5.54 ± 0.21 <sup>aA</sup>	5.32 ± 0.07 <sup>aA</sup>	4.35 ± 0.25 <sup>bA</sup>
	HLH/30 °C	5.72 ± 0.05 <sup>aA</sup>	6.55 ± 0.03 <sup>bC</sup>	4.36 ± 0.05 <sup>cA</sup>
	HLH/25 °C	5.54 ± 0.21 <sup>abA</sup>	5.87 ± 0.09 <sup>bB</sup>	5.06 ± 0.40 <sup>ab</sup>
BAA	TN/30 °C	4.54 ± 0.11 <sup>aA</sup>	4.80 ± 0.48 <sup>aA</sup>	6.45 ± 0.13 <sup>bAB</sup>
	TN/25 °C	4.52 ± 0.08 <sup>aA</sup>	5.81 ± 0.13 <sup>bAB</sup>	6.56 ± 0.12 <sup>cB</sup>
	JMR/30 °C	4.54 ± 0.11 <sup>aA</sup>	6.24 ± 0.78 <sup>bB</sup>	6.55 ± 0.23 <sup>bB</sup>
	JMR/25 °C	4.52 ± 0.08 <sup>aA</sup>	5.59 ± 0.31 <sup>bAB</sup>	7.19 ± 0.13 <sup>cC</sup>
	HLH/30 °C	4.54 ± 0.11 <sup>aA</sup>	6.47 ± 0.21 <sup>bB</sup>	6.70 ± 0.15 <sup>bB</sup>
	HLH/25 °C	4.52 ± 0.08 <sup>aA</sup>	5.64 ± 0.76 <sup>abAB</sup>	6.02 ± 0.21 <sup>bA</sup>
BAL	TN/30 °C	4.83 ± 0.11 <sup>abA</sup>	5.08 ± 0.43 <sup>bA</sup>	4.11 ± 0.24 <sup>aA</sup>
	TN/25 °C	4.70 ± 0.07 <sup>aA</sup>	5.58 ± 0.51 <sup>bA</sup>	4.17 ± 0.07 <sup>aA</sup>
	JMR/30 °C	4.83 ± 0.11 <sup>aA</sup>	5.36 ± 0.10 <sup>bA</sup>	4.26 ± 0.11 <sup>cAB</sup>
	JMR/25 °C	4.70 ± 0.07 <sup>aA</sup>	4.79 ± 0.17 <sup>aA</sup>	4.22 ± 0.13 <sup>bA</sup>
	HLH/30 °C	4.83 ± 0.11 <sup>aA</sup>	5.30 ± 0.21 <sup>aA</sup>	4.81 ± 0.43 <sup>aAB</sup>
	HLH/25 °C	4.70 ± 0.07 <sup>aA</sup>	5.60 ± 0.43 <sup>bA</sup>	5.07 ± 0.49 <sup>abB</sup>

Los valores se expresaron como la media ± la desviación estándar (n=3). Las medias en una misma fila seguidas de letras minúsculas diferentes y medias en una misma columna seguidas de letras mayúsculas diferentes representan diferencias significativas a un valor  $\alpha = 0.05$ .

BAA: Bacterias ácido acéticas, BAL: Bacterias ácido lácticas.

En el Cuadro 14 se presentan las concentraciones de las levaduras, BAA y BAL de las bebidas kombucha formuladas (fracción líquida), a los 0, 6 y 12 días de fermentación a 25 °C y 30 °C. Los resultados del día cero corresponden a las

infusiones iniciales, es decir sin fermentar. Los resultados obtenidos indican que las infusiones no aportan poblaciones microbianas relevantes y confirma que el crecimiento posterior corresponde a las poblaciones bacterianas presentes en el inóculo del consorcio. Se pudo observar de manera general un incremento de las tres poblaciones (levaduras, BAA y BAL) a los 6 días y una disminución de las mismas en el día 12 de fermentación.

Respecto al efecto de la temperatura, se observó que afecta, de manera particularmente importante, a las BAA, donde hubo una mayor producción a 25 °C

Contrario a lo observado en las BAA de la biopelícula, donde el conteo aumenta durante el tiempo de la fermentación; en el caso de la fracción líquida se observa una disminución en el día 12. Esto puede deberse al bajo pH, alcanzado en ese tiempo que dificulta la actividad microbiana. El ambiente anaeróbico creado pudo ser otra de las razones de la disminución de las poblaciones bacterianas; la biopelícula y el dióxido de carbono generado en la interfase biopelícula-líquido, crea un ambiente anaerobio que bloquea la transferencia de oxígeno de la superficie de la biopelícula al líquido (Jayabalan *et al.*, 2007).

La complejidad de la cinética de fermentación de kombucha se debe principalmente al importante número de microorganismos presentes y las interacciones entre ellos. El fenómeno de coexistencia se establece por interacciones comensalistas o amensalistas, es decir la mayoría de las especies microbianas producen metabólicos que pueden estimular o inhibir la tasa de crecimiento específico de las otras especies (Villarreal-Soto *et al.*, 2018).

**Cuadro 14. Concentración de levaduras BAA y BAL en bebidas kombucha durante 12 días de fermentación a temperaturas de 25 °C y 30 °C**

Especie microbiana (log CFU mL <sup>-1</sup> )	Kombucha	Días de fermentación		
		0	6	12
Levaduras	TN/30 °C	<1 <sup>a</sup>	5.64 ± 0.04 <sup>bA</sup>	4.87 ± 0.37 <sup>cA</sup>
	TN/25 °C	<1 <sup>a</sup>	5.98 ± 0.35 <sup>bA</sup>	4.96 ± 0.32 <sup>cA</sup>
	JMR/30 °C	<1 <sup>a</sup>	5.73 ± 0.53 <sup>bA</sup>	4.63 ± 0.40 <sup>cA</sup>
	JMR/25 °C	<1 <sup>a</sup>	6.16 ± 0.09 <sup>bA</sup>	6.16 ± 0.05 <sup>bB</sup>
	HLH/30 °C	<1 <sup>a</sup>	5.72 ± 0.77 <sup>bA</sup>	4.08 ± 0.20 <sup>cA</sup>
	HLH/25 °C	<1 <sup>a</sup>	5.68 ± 0.07 <sup>bA</sup>	4.44 ± 0.48 <sup>cA</sup>
BAA	TN/30 °C	<1 <sup>a</sup>	4.59 ± 0.28 <sup>bA</sup>	4.28 ± 0.28 <sup>bB</sup>
	TN/25 °C	<1 <sup>a</sup>	4.59 ± 0.28 <sup>bA</sup>	4.65 ± 0.05 <sup>bC</sup>
	JMR/30 °C	<1 <sup>a</sup>	4.95 ± 0.04 <sup>bAB</sup>	4.85 ± 0.08 <sup>bC</sup>
	JMR/25 °C	<1 <sup>a</sup>	6.15 ± 0.11 <sup>bC</sup>	4.32 ± 0.13 <sup>cB</sup>
	HLH/30 °C	<1 <sup>a</sup>	5.25 ± 0.25 <sup>bAB</sup>	3.87 ± 0.11 <sup>cA</sup>
	HLH/25 °C	<1 <sup>a</sup>	5.49 ± 0.25 <sup>bBC</sup>	4.87 ± 0.11 <sup>cC</sup>
BAL	TN/30 °C	<1 <sup>a</sup>	5.03 ± 0.12 <sup>bA</sup>	5.00 ± 0.13 <sup>bABC</sup>
	TN/25 °C	<1 <sup>a</sup>	5.85 ± 0.39 <sup>bB</sup>	5.25 ± 0.38 <sup>bBC</sup>
	JMR/30 °C	<1 <sup>a</sup>	5.43 ± 0.35 <sup>bAB</sup>	5.16 ± 0.27 <sup>bBC</sup>
	JMR/25 °C	<1 <sup>a</sup>	6.01 ± 0.27 <sup>bB</sup>	5.53 ± 0.05 <sup>cC</sup>
	HLH/30 °C	<1 <sup>a</sup>	5.04 ± 0.21 <sup>bA</sup>	4.77 ± 0.13 <sup>bAB</sup>
	HLH/25 °C	<1 <sup>a</sup>	5.67 ± 0.20 <sup>bAB</sup>	4.41 ± 0.37 <sup>cA</sup>

Los valores se expresaron como la media ± la desviación estándar (n=3). Las medias en una misma fila seguidas de letras minúsculas diferentes y medias en una misma columna seguidas de letras mayúsculas diferentes representan diferencias significativas a un valor  $\alpha = 0.05$ .

## 6.6 Evaluación sensorial

La evaluación sensorial se define como un método científico usado para evocar, medir, analizar e interpretar la respuesta a productos percibidos a través de los sentidos. Este procedimiento proporciona información útil a los desarrolladores de productos y científicos alimentarios sobre las características sensoriales de sus productos (Lawless y Heymann, 2013).

Con base a los resultados de las características físicas, químicas y microbiológicas obtenidos con la cinética de fermentación, la mejor temperatura para la fermentación fue a 30 °C para las tres Kombuchas. Se tomó el pH como parámetro crítico para la



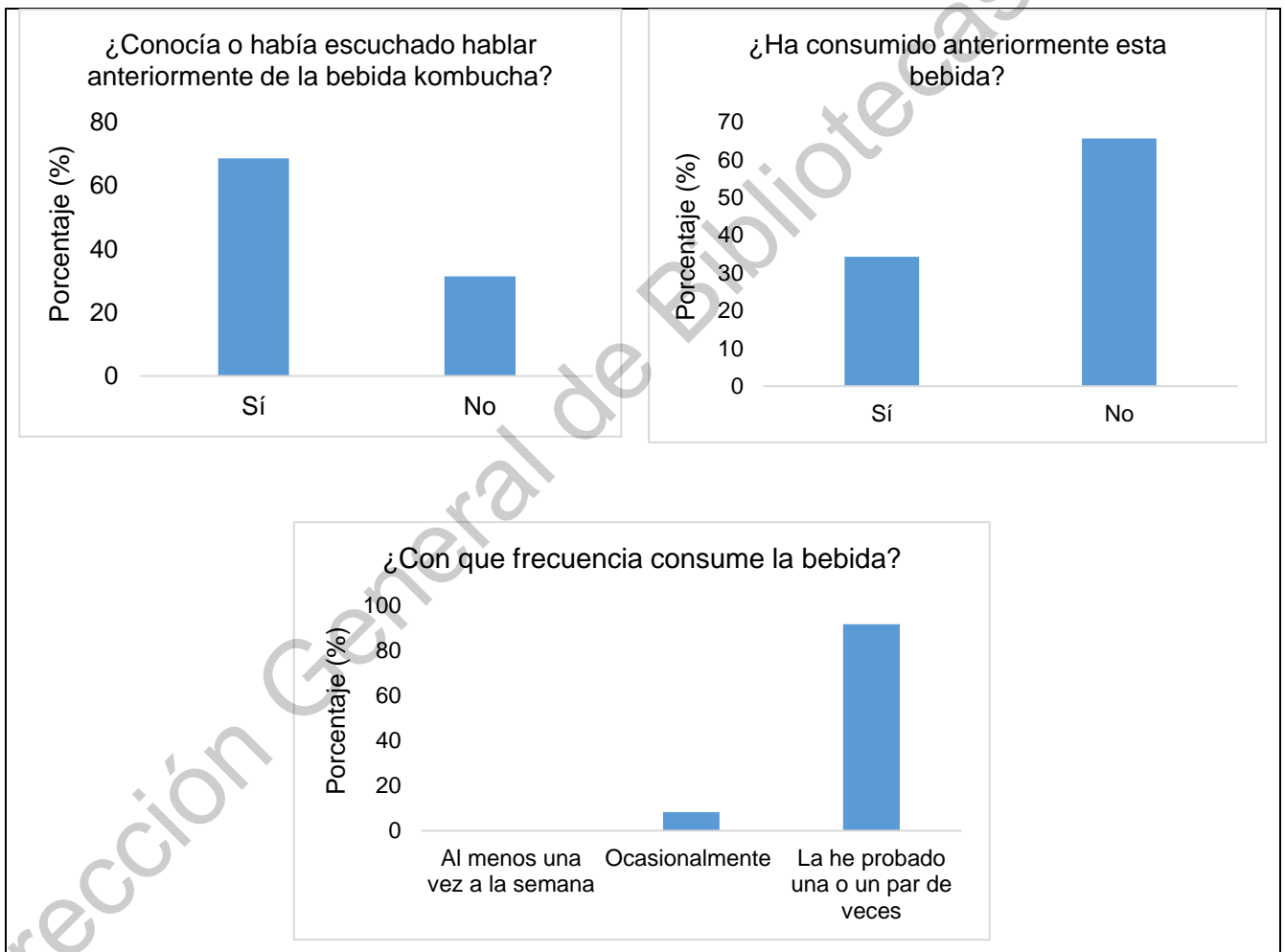
finalización del proceso; por lo que, se estableció un valor de pH entre 2.7 y 2.5 para la finalización de la fermentación. Las bebidas se obtuvieron por el proceso de fermentación descrito en el apartado 5.2.5.2, se llevaron a fermentación a 30 °C y se monitoreó el pH cada 24 horas, cuando éste alcanzó un pH entre 2.7 y 2.5 se detuvo la fermentación, se filtró y la kombucha obtenida se mantuvo en refrigeración hasta la aplicación de la evaluación sensorial.

Se sometieron a evaluación sensorial las tres Kombuchas formuladas TN, JMR y HLH, obtenidas por la fermentación a 30 °C por un tiempo de 6, 5 y 6 días, respectivamente. En la evaluación participaron 35 evaluadores (24 mujeres y 11 hombres) con un rango de edad de los 22 a los 46 años. Debido a que la evaluación se realizó con panelistas no entrenados, y a la inserción reciente de la bebida en el mercado, se aplicó una encuesta sobre la frecuencia de consumo del producto y en la Figura 12 se presentan los resultados, observándose que solo el 69 % de los evaluadores conocía o había escuchado sobre la bebida kombucha, el 34 % la había consumido con anterioridad y de éstos el 92 % la había consumido solo un par de ocasiones. Si bien estos datos dificultan comparar los productos desarrollados con los que ya se encuentran en el mercado, desde el punto de vista de un consumidor frecuente o experto, nos permiten evaluar la percepción del producto de una forma general.

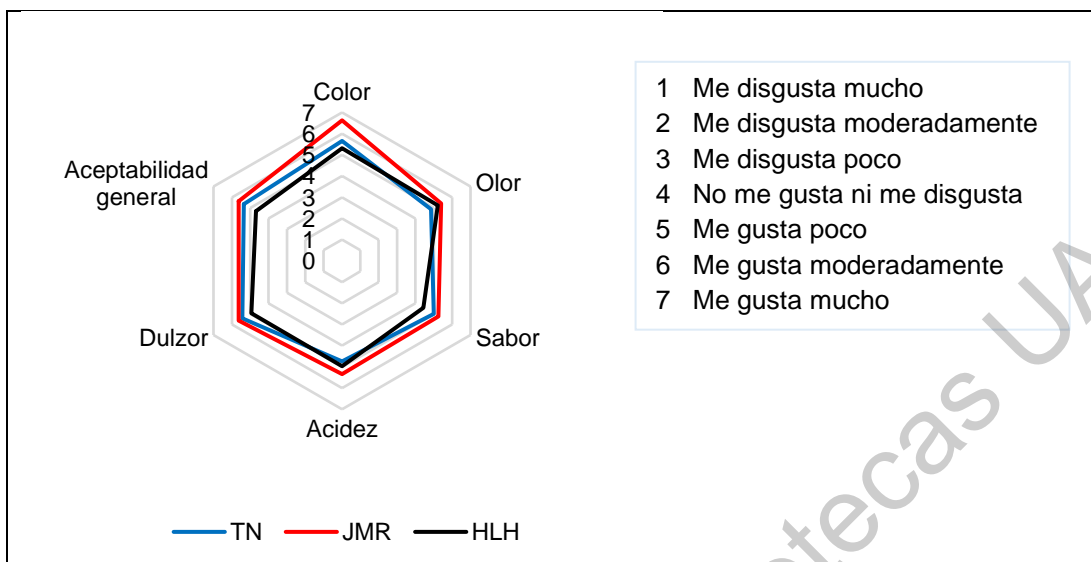
En la Figura 13 se muestra el nivel de agrado de 6 descriptores sensoriales, color, olor, sabor, acidez, dulzor y aceptabilidad general de las kombuchas; representado en un análisis químico descriptivo. La escala utilizada fue de 1 (Me disgusta mucho) a 7 (Me gusta mucho). La Kombucha JMR fue mejor evaluada en los parámetros de color, sabor, acidez y aceptabilidad general. A pesar de ser la bebida menos preferida, la kombucha HLH fue evaluada con calificaciones entre 5 (me gusta poco) y 6 (me gusta moderadamente), para todos los parámetros; lo que indica que no hubo un rechazo de la bebida.

En la Figura 14 se muestra la preferencia de los consumidores de las tres Kombuchas. De forma general se observó que la Kombucha HLH fue la menos

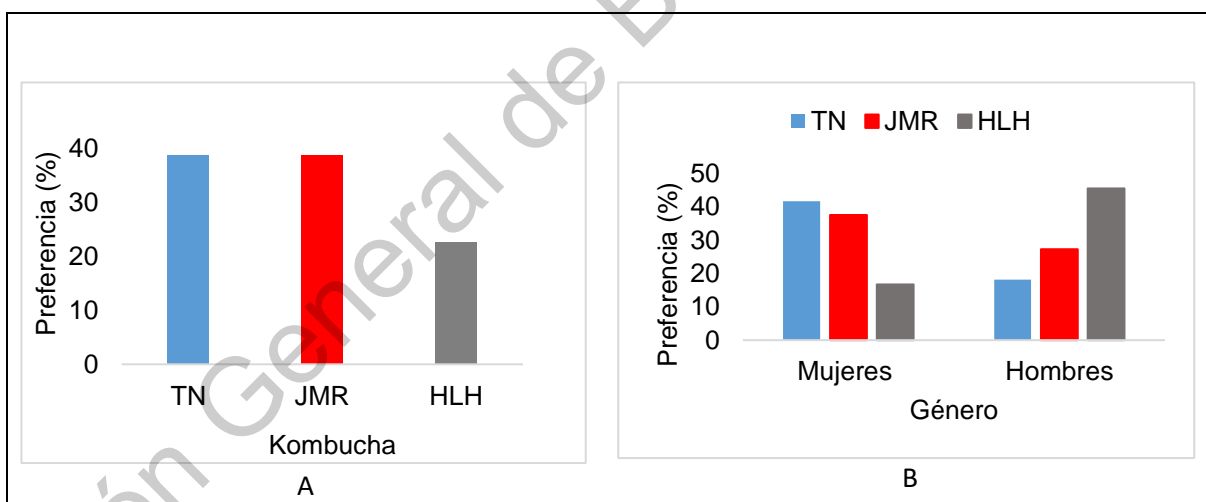
preferida por los consumidores, entre tanto las Kombuchas TN y JMR tuvieron la misma preferencia (Figura 14 A). Sin embargo, en cuanto a la preferencia de las bebidas por género, se observó un comportamiento completamente opuesto, ya que la Kombucha más preferida por las mujeres (TN) fue la menos preferida por los hombres, mientras que para las mujeres la Kombucha HLH fue la menos preferida para los hombres esta fue la de mayor preferencia.



**Figura 12. Frecuencia de consumo de kombucha por el panel**



**Figura 13. Evaluación de descriptores sensoriales de kombucha**  
 JMR: Jamaica, manzanilla, romero, HLH: Hierbabuena, zacate de limón, hojásén.



**Figura 14. Preferencia sensorial de kombuchas**

TN: Té negro; JMR: Jamaica, manzanilla, romero; HLH: Hierbabuena, zacate de limón, hojásén. (A) preferencia general de las bebidas, (B) preferencia de las bebidas por género.

### 6.7 Análisis proximal

En el Cuadro 15 se muestra el contenido de proteína, minerales y azúcares de las tres Kombucha formuladas, TN, JMR y HLH; obtenidas por la fermentación a 30 °C durante 6, 5 y 6, días respectivamente. No se observó una diferencia significativa,

en cuanto al contenido de proteína, por otra parte, el contenido de minerales y azúcares fue significativamente mayor en la Kombucha JMR. La diferencia en el contenido de azúcares puede explicarse por el hecho de que la fermentación de la Kombucha JMR se detuvo 24 horas antes que las Kombuchas TN y HLH, por lo que a dicho tiempo había más azúcares disponibles que no habían sido utilizados por los microorganismos del consorcio.

Nummer (2015) estableció una ingesta diaria de kombucha de 4 oz (aproximadamente 118 mL) por día, esto como medida para la reducción del riesgo de enfermedad por acidosis. Tomando esta dosis como tamaño de porción de la bebida, las kombuchas obtenidas pueden clasificarse como un producto bajo en calorías según lo establecido en la NOM-086-SSA1-1994, donde se denomina producto bajo en calorías a aquel cuyo contenido de calorías es menor a 40 calorías por porción.

**Cuadro 15. Contenido de proteína, minerales y azúcares de kombuchas**

Parámetro	Kombucha		
	JMR	HLH	TN
<b>Proteína (mg/100 mL)</b>	1.93 ± 0.35 <sup>a</sup>	1.40 ± 0.81 <sup>a</sup>	1.75 ± 0.49 <sup>a</sup>
<b>Minerales (mg/100 mL)</b>	0.79 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.49 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.39 ± 0.10 <sup>a</sup>
<b>Azúcares (g/100 mL)</b>	4.52 ± 0.21 <sup>b</sup>	4.33 ± 0.02 <sup>a</sup>	3.09 ± 0.30 <sup>a</sup>

Los valores se expresaron como la media ± la desviación estándar (n=3). Las medias en una misma fila seguidas de letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas a un valor  $\alpha=0.05$ .

## 7. CONCLUSIONES

La mayor extracción de compuestos polifenólicos totales de las infusiones de Jamaica, Romero, Manzanilla, Hierbabuena, Hojasén, Zacate de limón y Té Negro se obtuvo con el tratamiento 95 °C por 10 min.

La homogeneización del consorcio contribuyó a la estandarización del proceso de obtención de kombucha, permitiendo la identificación del proceso a fin de obtener bebidas de características y calidad reproducible.

El pH puede ser considerado un parámetro de control de calidad en el proceso de fermentación de kombucha. El pH del producto terminado debe encontrarse dentro del rango de 2.5 a 4.2.

La capacidad antioxidante de las kombuchas de TN, JMR y HLH incrementó significativamente después de los 6 días de fermentación. Sin embargo, después de ese tiempo, el pH de las bebidas está por debajo del valor considerado para el consumo saludable por presentar riesgo de acidosis; por lo que, la fermentación debe detenerse antes de este tiempo.

Las mezclas de infusiones jamaica, manzanilla y romero; así como hierbabuena, limón y hojasén, pueden ser fermentadas por el consorcio de kombucha para la producción de bebidas con características físicas, químicas y sensoriales similares a la kombucha tradicional elaborada a partir de té negro.

La preferencia sensorial de las kombuchas varió en función del género. La kombucha más preferida por las mujeres (TN) fue la menos preferida por los hombres, mientras que la Kombucha HLH fue la más preferida para los hombres siendo además la de menor preferencia para las mujeres.

El consorcio microbiano utilizado está compuesto por levaduras, así como por bacterias ácido acéticas y ácido lácticas. Se necesitan estudios para la identificación de los diferentes géneros y especies, así como su abundancia tanto en la biopelícula como en la fase líquida.

Los productos elaborados se pueden considerar bebidas bajas en calorías y con capacidad antioxidante.

### **Perspectivas**

Con la finalidad de ampliar las conclusiones que se pueden obtener con este trabajo se propone:

Con el fin de ampliar el estudio sensorial de la bebida se propone realizar una evaluación con consumidores frecuentes de kombucha, determinar la aceptación de la bebida y posteriormente realizar el estudio de vida de anaquel sensorial.

Evaluar la funcionalidad de las bebidas mediante el estudio de su efecto in vivo.

Caracterizar la biopelícula obtenida después de la fermentación para su posible uso en alimentos como recubrimiento comestible.

## 8. REFERENCIAS

Bimakr M., Rahman R., Ganjloo A., Taip F., Salleh L., Sarker M. (2012). Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves by using response surface methodology. *Food and Bioprocess Technology*. 5(3), 912-920.

Cid-Ortega S., Guerrero-Beltrán J. (2015). Roselle calyces (*Hibiscus sabdariffa*), an alternative to the food and beverages industries: a review. *Journal of Food Science and Technology*. 52(11), 6859-6869.

Caleja C., Finimundy T. C., Pereira C., Barros L., Calhelha R. C., Sokovic M., Ferreira I. C. (2019). Challenges of traditional herbal teas: plant infusions and their mixtures with bioactive properties. *Food and Function*. 10(9), 5939-5951.

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.

Costa G., González-Manzano S., González-Paramás A., Figueiredo I., Santos-Buelga C., Batista M. (2015). Flavan hetero-dimers in the *Cymbopogon citratus* infusion tannin fraction and their contribution to the antioxidant activity. *Food and Function*. 6(3), 932-937.

Da-Costa-Rocha I., Bonnlaender B., Sievers H., Pischel I., Heinrich M. (2014). *Hibiscus sabdariffa* L.—A phytochemical and pharmacological review. *Food Chemistry*. 165, 424-443.

De León-Zapata M., Pastrana-Castro L., Rúa-Rodríguez M., Alvarez-Pérez O., Rodríguez-Herrera R., Aguilar C. (2016). Experimental protocol for the recovery and evaluation of bioactive compounds of tarbush against postharvest fruit fungi. *Food Chemistry*. 198, 62-67.

De Rodríguez D., Hernández-Castillo F., Solís-Gaona S., Rodríguez-García R., Rodríguez-Jasso R. (2012). *Flourensia cernua* DC: A Plant from Mexican Semiarid Regions with a Broad Spectrum of Action for Disease Control. En Larramendy M.L., Soloneski S (Eds), *Integrated Pest Management and Pest Control-Current and Future Tactics* (639-650). Intech, Riejecka, Croacia.

Del Baño M. J., Lorente J., Castillo J., Benavente-García O., Del Rio J. A., Ortuño, A., Gerard, D. (2013). Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4247-4253.

Domínguez-Manzano J., Olmo-Ruiz C., Bautista-Gallego J., Arroyo-López F. N., Garrido-Fernández A., Jiménez-Díaz R. (2012). Biofilm formation on abiotic and biotic surfaces during Spanish style green table olive fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 157(2), 230-238.

Dueñas M., Fernández D., Hernández T., Estrella I., Muñoz R. (2005). Bioactive phenolic compounds of cowpeas (*Vigna sinensis* L). Modifications by fermentation with natural microflora and with *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85(2), 297-304.

Dueñas M., Hernández T., Estrella I. (2007). Changes in the content of bioactive polyphenolic compounds of lentils by the action of exogenous enzymes. Effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry*. 101(1), 90-97.

Ekpenyong C., Akpan E., Daniel N. (2014). Phytochemical Constituents, Therapeutic Applications and Toxicological Profile of *Cymbopogon citratus* Stapf (DC) Leaf Extract. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 3(1),133-142.

Emiljanowicz K. E., Malinowska-Pańczyk E. (2019). Kombucha from alternative raw materials–The review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 60(19), 3185-3194.

Emley E., Taylor M., Musher-Eizenman D. (2017). Mindful feeding and child dietary health. *Eating Behaviors*. 24, 89-94.

Farzaneh V., Carvalho I. (2015). A review of the health benefit potentials of herbal plant infusions and their mechanism of actions. *Industrial Crops and Products*. 65, 247-258.

Filippis F., Troise A., 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.

Floros J., Newsome R., Fisher W., Barbosa-Cánovas G., Chen H., Dunne C., German J., Hall R., Heldman D., Karwe M., Knabel S., Labuza T., Lund D., Newell-McGloughlin M.,



Robinson J., Sebranek J., Shewfelt R., Tracy W., Weaver C., Ziegler G. (2010). Feeding the world today and tomorrow: The importance of food science and technology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 9, 572-599.

Fotakis C., Tsigrimani D., Tsiaka T., Lantzouraki, D., Strati I., Makris C., Zoumpoulakis P. (2016). Metabolic and antioxidant profiles of herbal infusions and decoctions. *Food Chemistry*. 211, 963-971.

Hamza M., Khoufi S., Sayadi S. (2012). Changes in the content of bioactive polyphenolic compounds of olive mill wastewater by the action of exogenous enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60(1), 66-73.

Ifie I., Olurin T., Aina, J. (2012). Production and quality attributes of vegetable wine from *Hibiscus sabdariffa* Linn. *African Journal of Food Science*. 6(7), 212-215.

Ifie I., Marshall L., Ho P., Williamson G. (2016). *Hibiscus sabdariffa* (Roselle) extracts and wine: Phytochemical profile, physicochemical properties, and carbohydrase inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64(24), 4921-4931.

Jain A., Jain R., Jain, S. (2020). Quantitative analysis of reducing sugars by 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNSA method). In *Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology: Principles and Techniques* (181–183). Springer Protocols Handbooks. Humana, New York, NY.

Jayabalan R., Marimuthu S., Swaminathan K. (2007). Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*. 102, 329-398.

Jayabalan R., Subathradevi P., Marimuthu S., Sathishkumar M., Swaminathan K. (2008). Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food Chemistry*. 109(1), 227-234.

Jayabalan R., Waisundara V. Y. (2019). Kombucha as a Functional Beverage. *Functional and Medicinal Beverages*. 11, 413-446.

Jayabalan R., Malbasa R., Loncar E., Vitas J., Sathishkumar M. (2014). A Review on Kombucha Tea-Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 13, 538-550.

Kamiloglu S., Toydemir G., Boyacioglu D., Capanoglu E. (2012). Health Perspectives on Herbal Tea Infusions. *Phytotherapeutics*. 43(1), 54-68.

Kapp J., Sumner W. (2019). Kombucha: A systematic review of the empirical evidence of human health benefit. *Annals of Epidemiology*. 30, 66-70.

Kosińska S., Andlauer W. (2014). Antioxidant capacity of tea: effect of processing and storage. En Preedy V (Ed). *Processing and impact on antioxidants in beverages*. Academic Press. 109-120.

Kim, J., Adhikari, K. (2020). Current Trends in Kombucha: Marketing Perspectives and the Need for Improved Sensory Research. *Beverages*. 6(1), 15-34.

Lawless H. T., Heymann H. (2013). *Sensory evaluation of food: principles and practices*. 450-455. Springer Science & Business Media. New York, NY.

Lončar E., Malbaša R., Kolarov L. (2007). Kombucha fermentation on raw extracts of different cultivars of jerusalem artichoke. *Acta Periodica Technologica*. 38, 37-44.

Malongane F., McGaw L., Mudau F. (2017). The synergistic potential of various teas, herbs and therapeutic drugs in health improvement: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 97(14), 4679-4689.

Makanjoula S. A., Enujiugha V. N., Omoba O. S., Sanni D. M. (2020). Modelling and prediction of antioxidant properties of tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) leaf. *Scientific African*. 8, e00455.

Malbaša R., Lončar E., Djurić M. (2008). Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. *Food Chemistry*, 106(3), 1039-1045.

Manvitha K., Bidya B. (2013). Review on pharmacological activity of *Cymbopogon citratus*. *International Journal of Herb Medicine*. 1(6), 5-7.

Marco M., Heeney D., Binda S., Cifelli C., Cotter P., Foligné B., Smid E. (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current Opinion in Biotechnology*. 44, 94-102.

Marsh A., Hill C., Ross R., Cotter P. (2014). Fermented beverages with health-promoting potential: past and future perspectives. *Trends in Food Science and Technology*. 38(2), 113-124.

Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*. 26 (2), 211-219.

Muñoz-Velázquez E., Rivas-Díaz K., Loarca-Piña M., Flavia G., Mendoza-Díaz S., Reynoso-Camacho R., Ramos-Gómez, M. (2012). Comparación del contenido fenólico, capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria de infusiones herbales comerciales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 3(3), 481-495.

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.

Norma Mexicana NMX-F-066-S-1978. Determinación de cenizas en alimentos. Foodstuff determination of ashes. Dirección general de normas. Fecha de consulta: 10/05/2020. Disponible en: <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-066-S-1978.PDF>

Norma Mexicana NMX-F-068-S-1980. Alimentos. Determinación de proteínas. Foods. Determination of proteins. Dirección general de normas. Fecha de consulta: 18/05/2020. Disponible en: <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-068-S-1980.PDF>

Norma Mexicana NMX-F-317-S-1978. Determinación de pH en alimentos. Determination of pH in foods. Dirección general de normas. Fecha de consulta: 21/08/2019. Disponible en: <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-317-S-1978.PDF>

Norma Mexicana NMX-F-102-1978. Determinación de la acidez titulable en productos elaborados a partir de frutas y hortalizas. Dirección general de normas. Fecha de consulta

21/08/2019. Disponible en: <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-102-S-1978.PDF>

Norma Oficial Mexicana NOM-086-SSA1-1994, Bienes y servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales. Fecha de consulta 28/02/2021. Disponible en:

<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/086ssa14.html>

NORMA Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Fecha de consulta 19/02/2021. Disponible en: <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo69533.pdf>

NORMA Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. Fecha de consulta 19/02/2021. Disponible en: <http://www.economia-noms.gob.mx/normas/noms/1995/111-ssa1.pdf>

Nummer B. A. (2013). SPECIAL REPORT: Kombucha Brewing Under the Food and Drug Administration Model Food Code: Risk Analysis and Processing Guidance. Journal of Environmental Health. 76(4), 8-11.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018). Enfermedades no transmisibles. Disponible en <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>. Fecha de consulta 03/05/2109.

Park E., Bae W., Eom S., Kim K. T., Paik H. (2017). Improved antioxidative and cytotoxic activities of chamomile (*Matricaria chamomilla*) florets fermented by *Lactobacillus plantarum* KCCM 11613P. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B. 18(2), 152-160.

Pękal A., Pyrzynska K. (2015). Effect of pH and metal ions on DPPH radical scavenging activity of tea. International Journal of Food Sciences and Nutrition. 66(1), 58-62.

Pohl P., Dzimitrowicz A., Jedryczko D., Szymczycha-Madeja A., Welna M., Jamroz P. (2016). The determination of elements in herbal teas and medicinal plant formulations and their tisanes. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 130, 326-335.

Quiñones M., Miguel M., Aleixandre A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Nutrición Hospitalaria. 27(1), 76-89.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26, 1231-1237.

Ribeiro-Santos R., Carvalho-Costa D., Cavaleiro C., Costa H., Albuquerque T., Castilho M., Sanches-Silva, A. (2015). A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Trends in Food Science and Technology*. 45(2), 355-368.

Rojas J., Buitrago A. (2019). Antioxidant Activity of Phenolic Compounds Biosynthesized by Plants and Its Relationship with Prevention of Neurodegenerative Diseases. En Segura Campos M. (Ed.), *Bioactive Compounds. Health Benefits and Potential Applications*. 33-34. Woodhead Publishing. Duxford, United Kingdom.

Romano C. S., Abadi K., Repetto V., Vojnov A. A., Moreno S. (2009). Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. *Food Chemistry*, 115(2), 456-461.

Rusak G., Komes D., Likić S., Horžić D., Kovač M. (2008). Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*. 110(4), 852-858.

Sedighi R., Zhao Y., Yerke A., Sang S. (2015). Preventive and protective properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in obesity and diabetes mellitus of metabolic disorders: a brief review. *Current Opinion in Food Science*. 2, 58-70.

Selhub E., Logan A., Bested A. (2014). Fermented foods, microbiota, and mental health: ancient practice meets nutritional psychiatry. *Journal of Physiological Anthropology*. 33(1), 2.

Shaikh S., Yaacob H., Rahim Z. (2014). Prospective role in treatment of major illnesses and potential benefits as a safe insecticide and natural food preservative of mint (*Mentha* spp.): A review. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. 4(35), 1-12.

Sindi H., Marshall L., Morgan M. (2014). Comparative chemical and biochemical analysis of extracts of *Hibiscus sabdariffa*. *Food Chemistry*. 164, 23-29.

Singh O., Khanam Z., Misra N., Srivastava M. (2011). Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): an overview. *Pharmacognosy Reviews*. 5(9), 82.

Somani S.J., Modi K.P., Majumdar A.S., Sadarani B.N. (2015). Phytochemicals and their potential usefulness in inflammatory bowel disease. *Phytotherapy Research*. 29, 339-350.

Sõukand R., Quave C. L., Pieroni A., Pardo-de-Santayana M., Tardío J., Kalle R., Mustafa B. (2013). Plants used for making recreational tea in Europe: a review based on specific research sites. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 9(1), 58.

Tamang J. P., Shin D. H., Jung S. J., Chae, S. W. (2016). Functional properties of microorganisms in fermented foods. *Frontiers in Microbiology*. 7, 578.

Valera M. J., Torija M. J., Mas A., Mateo E. (2015). Acetic acid bacteria from biofilm of strawberry vinegar visualized by microscopy and detected by complementing culture-dependent and culture-independent techniques. *Food Microbiology*. 46, 452-462.

Vázquez-Cabral B., Rocha-Guzmán N., Gallegos-Infante J., González-Herrera S., González-Laredo R., Moreno-Jiménez M., Córdova-Moreno I. (2014). Chemical and sensory evaluation of a functional beverage obtained from infusions of oak leaves (*Quercus resinosa*) inoculated with the kombucha consortium under different processing conditions. *Nutrafoods*. 13, 169-178.

Velićanski A., Cvetković D., Markov S. (2013). Characteristics of Kombucha fermentation on medicinal herbs from Lamiaceae family. *Romanian Biotechnological Letters*. 18 (1), 8034-8042.

Velićanski A. S., Cvetković D.D., Markov S.L., Tumbas V.T., Vulić J.J. (2014). Antioxidant and antibacterial activity of the beverage obtained by fermentation of sweetened lemon balm (*Melissa officinalis* L.) tea with symbiotic consortium of bacteria and yeasts. *Food Technology and Biotechnology*. 52(4), 420-429.

Villarreal-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.

Vitas J., Cvetanovića A., Maškovića P., Švarc-Gajića J., Malbašaa R. (2018). Chemical composition and biological activity of novel types of kombucha beverages with yarrow. *Journal of Functional Foods*. 44, 95-102.

Wang S. Y., Chen K. N., Lo Y. M., Chiang M. L., Chen H. C., Liu J. R., Chen M. J. (2012). Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain. *Food Microbiology*. 32(2), 274-285.

Wong J., (2012). Cuantificación de polifenoles hidrolizables por el método de Folin-Ciocalteu en microplaca. En Medina-Morales M., Rojas-Molina R., Rodríguez-Herrera R., Aguilar C. (Ed). *Manual de Métodos de Laboratorio del Departamento de Investigación en Alimentos de la Universidad Autónoma de Coahuila*.19-20.

Zhang Y., Gan R., Li S., Zhou Y., Li A., Xu D., Li H. (2015). Antioxidant phytochemicals for the prevention and treatment of chronic diseases. *Molecules*. 20(12), 21138-21156.

Zhang H., Tsao, R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*, 8, 33-42.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Formatos empleados en la evaluación sensorial

#### 9.1.1 Cuestionario sobre la frecuencia de consumo de la bebida

##### Evaluación sensorial de bebidas kombucha

Fecha \_\_\_\_\_

Ocupación \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_

Género \_\_\_\_\_

¿Conocía o había escuchado hablar anteriormente de la bebida kombucha?

Si

No

¿Ha consumido anteriormente esta bebida?

Si

No

¿Con que frecuencia consume la bebida?

Al menos una vez a la semana

Al menos una vez al mes

Ocasionalmente

La he probado una o un par de veces

#### 9.1.2 Prueba de aceptabilidad sensorial de las kombuchas

##### Evaluación sensorial de bebidas kombucha

Pruebe las muestras que se presentan a continuación, siguiendo el orden de izquierda a derecha. Indique su nivel de agrado para cada una de las características marcando con una "X" el punto de la escala que mejor describa al producto. Coloque sobre la línea el código de la muestra. Deberá tomar agua al iniciar la prueba y entre cada muestra.

Muestra \_\_\_\_\_

	Me gusta mucho	Me gusta moderadamente	Me gusta poco	No me gusta ni me disgusta	Me disgusta poco	Me disgusta moderadamente	Me disgusta mucho
Color							
Olor							
Sabor							
Acidez							
Dulzor							
Aceptabilidad general							

Comentarios: \_\_\_\_\_



Ordene las bebidas de acuerdo a su preferencia, colocando en primer lugar la de mayor agrado y en último lugar la de menor agrado.

1. \_\_\_\_\_
2. \_\_\_\_\_
3. \_\_\_\_\_

Exponga las razones de su elección número uno

---

---

---

---

Dirección General de Bibliotecas UAQ