

INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE CALKINÍ

**“EVALUACIÓN FÍSICOQUÍMICA, ANTIOXIDANTE Y TOXICIDAD *IN VIVO* DE
LA KOMBUCHA ELABORADA CON UNA INFUSIÓN DE HOJAS DE
BROSIMUM ALICASTRUM”**

TESIS PARA TITULACIÓN INTEGRAL

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

**EGRESADO:
LUIS IGNACIO AKÉ CAHUM**

**DIRECTOR Y CO-DIRECTOR:
DR. VÍCTOR MANUEL MOO HUCHIN
DR. JORGE CARLOS CANTO PINTO**

Calkiní, Campeche, México 2025



Educación
Secretaría de Educación Pública



INSTITUTO TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



Instituto Tecnológico Superior de Calkiní
Subdirección de Planeación y Desarrollo

Instituto Tecnológico Superior de Calkiní
Departamento de Administración y
Apoyo al Estudiante

Calkiní, Campeche **06/03/2025**
P/03/25/606
INGENIERÍA BIOQUÍMICA

CONSTANCIA DE NO INCONVENIENCIA

MODALIDAD: TESIS

C. LUIS IGNACIO AKÉ CAHUM 6834
PASANTE DE LA CARRERA DE
INGENIERÍA BIOQUÍMICA.
PRESENTE

Con relación a lo establecido en el Reglamento de Estudios de Licenciatura, capítulo VII, fracción I, vigente en este Instituto, y una vez emitido el fallo favorable por el director VICTOR MANUEL MOO HUCHIN, y el co-director JORGE CARLOS CANTO PINTO, respectivamente, este Instituto consta de no tener inconveniencia para la realización del acto protocolario de titulación integral de su trabajo profesional titulado: **"EVALUACIÓN FÍSICOQUÍMICA, ANTIOXIDANTE Y TOXICIDAD IN VIVO DE LA KOMBUCHA ELABORADA CON UNA INFUSIÓN DE HOJAS DE BROSIMUM ALICASTRUM"**.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
Sabiduría, Fortaleza de Nuestra Cultura®

Dr. Jorge Alfonso Hau Puc.
Departamento de Administración y
Apoyo al Estudiante.

C.c.p. Archivo



INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR
DE CALKINÍ

"DEPARTAMENTO DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR Y APOYO A
ESTUDIANTES"

CLAVE: 04MSU0013P
CALKINÍ, CAMPECHE, MÉXICO.



2025
Año de
La Mujer
Indígena

Av. Ah Canul S/N por Carretera Federal, Calkiní, Campeche,
C.P. 24900 Tel. 998-8134870,
e-mail: se_dcalkini@tecnm.mx | itescam.edu.mx



Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a mis padres, sin ellos ninguno de mis logros habría sido posible. La culminación de mi carrera y la persona que soy es solo una consecuencia de su gran trabajo de crianza.

Agradecimientos

A lo largo de este trabajo, he contado con el apoyo y guía de personas cuya colaboración ha sido fundamental para la realización de esta investigación.

En primer lugar, a mi director de tesis, el Dr. Víctor Manuel Moo Huchin, le expreso mi más sincero agradecimiento por su orientación, paciencia y valiosas sugerencias, que contribuyeron significativamente al desarrollo de este trabajo.

A mi co-director, el Dr. Jorge Carlos Canto Pinto, por su apoyo y atención.

A mis compañeros de laboratorio y equipo de trabajo, gracias por su apoyo, consejos y por compartir conmigo el entusiasmo por la ciencia. Su colaboración hizo que cada etapa del proceso fuera más enriquecedora y llevadera.

A mi familia y mi pareja, por su amor incondicional, motivación y confianza en mí. Su apoyo ha sido mi mayor fortaleza para continuar adelante en este camino académico.

Finalmente, agradezco a todos aquellos que, de una u otra manera, contribuyeron a la culminación de esta tesis. Sin su ayuda, este logro no habría sido posible.

RESUMEN

En la búsqueda de alternativas innovadoras a la kombucha tradicional, se elaboró una bebida fermentada a partir de una infusión de hojas secas de *Brosimum alicastrum* (ramón) con el objetivo de evaluar sus propiedades fisicoquímicas, antioxidantes, microbiológicas, su toxicidad in vivo y su aceptabilidad sensorial.

La fermentación de la kombucha se realizó durante 12 días en el Instituto Tecnológico de Mérida, Yucatán, utilizando una concentración de 1.5 % p/v de hojas secas de ramón y 100 g/L de azúcar como fuente de carbono. Se analizaron los cambios en sus propiedades a lo largo del proceso, evidenciándose aumentos en la acidez (0.2 % a 0.92 %), azúcares reductores (10.92 mg/mL a 43.74 mg/mL), conteo microbiológico (6 Log UFC/mL), compuestos fenólicos totales (24.34 mg EAG/100 mL), flavonoides totales (11.83 mg EQ/100 mL a 22.16 mg EQ/100 mL) y capacidad antioxidante DPPH (1.72 mM Trolox/100 mL a 2.22 mM Trolox/100 mL). Paralelamente, se registraron disminuciones en el pH (3.45 a 2.46), °Brix (9.25 % a 5.56 %) y azúcares reductores totales (75.78 mg/mL a 15.84 mg/mL). Además, se observó una tonalidad más amarilla en comparación con el inicio de la fermentación.

Los ensayos de toxicidad in vivo con *Galleria mellonella* confirmaron que la kombucha de ramón es segura para el consumo, lo que permitió la realización de la evaluación sensorial. Los resultados demostraron que la kombucha de ramón obtuvo una mayor aceptabilidad general en comparación con una kombucha elaborada con té negro, destacando su potencial como una alternativa innovadora a la tradicional kombucha.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. MARCO TEÓRICO.....	13
2.1. Kombucha.....	13
2.1.1. Generalidades.....	13
2.1.2. Proceso de fermentación	15
2.1.3. Factores que afectan la fermentación.....	17
2.1.3.1 Tiempo.....	17
2.1.3.2. Temperatura	18
2.1.3.3. Sustrato	18
2.1.4. Cambios en los parámetros durante la fermentación.....	19
2.1.4.1. pH	19
2.1.4.2. Acidez titulable.....	21
2.1.4.3. Solidos solubles (°Brix)	23
2.1.5. Composición microbiológica y química de la kombucha.....	24
2.1.6. Nuevos sustratos de fermentación.....	28
2.1.7. Técnicas de preparación de bebida Kombucha.....	30
2.1.8. Propiedades terapéuticas de Kombucha	34
2.1.9. Regulaciones y riesgos de consumo	35
2.2. El árbol Ramón como material alternativo para producir Kombucha	39
2.2.1. Generalidades.....	39
2.2.2. Hojas.....	40
3. OBJETIVOS	42
3.1. Objetivo general.....	42
3.2. Objetivos específicos	42
4. JUSTIFICACIÓN	43
5. MATERIALES Y MÉTODOS	44
5.1. Recolección y obtención de las hojas secas.....	45

5.2. Determinación del tiempo de infusión y de la concentración de hojas de <i>B. alicastrum</i>	45
5.3. Tratamiento de fermentación	45
5.3.1. Preparación de infusión de hojas.....	45
5.3.2. Fermentación y obtención de kombucha y SCOBY	46
5.3.3. Purificación del SCOBY	46
5.4. Métodos analíticos	47
5.4.1. °Brix	47
5.4.2. pH	47
5.4.3. Color instrumental CIELAB	47
5.4.4. Porcentaje de ácido acético	48
5.4.5. Azúcares reductores	48
5.4.6. Azúcares reductores totales por hidrólisis ácido de sacarosa	49
5.5. Evaluación de las propiedades bioactivas	50
5.5.1. Contenido de compuestos fenólicos totales.....	50
5.5.2. Contenido de flavonoides totales	50
5.5.3. Capacidad antioxidante <i>in vitro</i> DPPH•.....	51
5.6. Recuento microbiológico total	51
5.7. Toxicidad <i>in vivo</i> en <i>Galleria mellonella</i>	52
5.8. Aceptabilidad sensorial del producto final de la kombucha.....	53
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
6.1. Determinación del tiempo de infusión y de la concentración de hojas de <i>B. alicastrum</i>	55
6.2. Comportamiento del volumen de la kombucha durante la fermentación.....	56
6.3. Cambios en las propiedades fisicoquímicas durante la fermentación.....	57
6.4. Recuento microbiológico	64
6.5. Cambio de las propiedades bioactivas.....	65
6.6. Toxicidad <i>in vivo</i> en <i>Galleria mellonella</i>	68

6.7. Aceptabilidad sensorial del producto final de la kombucha.....	69
7. CONCLUSIONES.....	71
8. BIBLIOGRAFÍA	72
9. ANEXOS	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Frasco con Kombucha de té negro.	13
Figura 2. Distribución geográfica del consumo global de kombucha, 2021 (Mordor Intelligence, 2023).	15
Figura 3. SCOBY obtenido de kombucha de té negro. A: superficie superior (a la bebida) del SCOBY, B: superficie inferior (a la bebida) del SCOBY.	15
Figura 4. Vía metabólica principal en la producción de kombucha y los metabolitos generados, obtenido de (Ojo & De Smidt, 2023).	16
Figura 5. Diagrama general de la preparación de Kombucha.	31
Figura 6. Composición química de la kombucha (De Oliveira et al., 2023).	34
Figura 7. Árbol de Ramón (<i>Brosimum alicastrum</i>).	39
Figura 8. Extensión geográfica del ramón.	40
Figura 9. Hojas de Ramón (<i>Brosimum alicastrum</i>).	41
Figura 10. Estrategia general de trabajo.	44
Figura 11. Larva de cera (<i>Galleria mellonella</i>).	52
Figura 12. Referencia de la aplicación de las muestras.	53
Figura 13. Estados de <i>G. mellonella</i> . A: Larva viva, B: Larva muerta (melanización total), C: Larva con formación de capullo.	53
Figura 14. Contenido de CFT de infusión a diferentes porcentajes de hoja <i>B. alicastrum</i> y tiempo de infusión	56
Figura 15. Variación del volumen de kombucha durante la fermentación a 30 °C. ...	57
Figura 16. Cambios en los valores de pH de Kombucha durante la fermentación a 30 °C.	58
Figura 17. Variación de los valores de °Brix de la kombucha durante la fermentación a 30 °C.	59
Figura 18. Variación del porcentaje de ácido acético de la kombucha durante la fermentación a 30 °C.	60
Figura 19. Variación de los parámetros de CIE $L^*a^*b^*$ a través del tiempo de fermentación de la kombucha a base de Ramón <i>Brosimum alicastrum</i>	61
Figura 20. Variación de los azúcares reductores durante la fermentación de la kombucha a 30 °C.	63

Figura 21. Variación de los azúcares reductores totales durante la fermentación de la kombucha a 30 °C.....	63
Figura 22. Variación de los microorganismos presentes en la kombucha durante la fermentación a 30 °C.....	65
Figura 23. variación de CFT durante la fermentación de la kombucha a 30 °C: A , variación de CFT sin considerar la disminución del volumen (producto sin aforar). B , variación de CFT considerando la disminución del volumen (producto aforado).	66
Figura 24. Variación de los flavonoides totales durante la fermentación de la kombucha a 30 °C: A , variación de los FT sin considerar la disminución del volumen. B , variación de los FT considerando la disminución del volumen.	67
Figura 25. Variación de la capacidad antioxidante DPPH• a lo largo de la fermentación de la kombucha a 30 °C: A , variación sin considerar la disminución del volumen. B , variación considerando la disminución del volumen.....	68
Figura 26. Graficas del porcentaje de supervivencia de larvas de <i>Galleria mellonella</i> expuestas a diferentes tratamientos de kombucha.	69
Figura 27. Comparación de la aceptabilidad sensorial de kombucha de Ramón y té negro.	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cambios en el pH a lo largo del tiempo de fermentación de diversas kombuchas.....	19
Tabla 2. Cambios en la acidez a lo largo del tiempo de fermentación de diversas kombuchas.	21
Tabla 3. Cambios en los sólidos solubles (°Brix) a lo largo del tiempo de fermentación de diversas kombuchas.....	23
Tabla 4. Composición general del microbioma de la kombucha.	24
Tabla 5. Composición química general de la Kombucha.	26
Tabla 6. Características de los compuestos principales de la kombucha	27
Tabla 7. Uso de materiales alternativos en investigaciones.....	29
Tabla 8. Riesgos y precauciones durante la preparación de kombucha.	32
Tabla 9. Estudios in vivo/in vitro realizados con kombucha.....	35
Tabla 10. Regulaciones aplicables a la kombucha de diferentes países.	37
Tabla 11. Taxonomía del Ramón (<i>Brosimum alicastrum</i>).	40
Tabla 12. Composición bioactiva de las hojas de Ramón (<i>Brosimum alicastrum</i>). ...	41
Tabla 13. Factores de dilución de las muestras para la determinación de azúcares reductores	49
Tabla 14. Factores de dilución de las muestras para la determinación de azúcares reductores totales por hidrólisis ácido de sacarosa.....	50

1. INTRODUCCIÓN

El interés por los alimentos funcionales ha ido en aumento en los últimos años debido a su potencial para mejorar la salud y el bienestar. En este contexto, la kombucha ha ganado popularidad como una bebida fermentada con propiedades probióticas y antioxidantes (Mordor Intelligence, 2023). Tradicionalmente se elabora a partir de una infusión de té negro o verde endulzada y fermentada por un consorcio simbiótico de bacterias ácido acéticas, ácido lácticas y levaduras, dando lugar a una bebida con un perfil sensorial avinagrado, de color café o ambar y que cuenta con beneficios potenciales para la salud (Kapp & Sumner, 2019).

En la búsqueda de nuevos ingredientes que mejoren el valor nutricional y funcional de la kombucha, se ha propuesto el uso de *Brosimum alicastrum* (árbol de rámon) como alternativa al té tradicional. Las hojas de esta planta son ricas en compuestos fenólicos y antioxidantes (Canto Pinto et al., 2024), lo que la convierte en un candidato prometedor para la elaboración de bebidas fermentadas. Sin embargo, aun es necesario evaluar el impacto de su incorporación en la fermentación, así como determinar las condiciones óptimas de extracción de sus compuestos bioactivos.

Por ello, esta investigación tiene como objetivo analizar el efecto del tiempo de fermentación y la concentración de hojas de *B. alicastrum* en las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y bioactivas de la kombucha. Además, se evaluará su toxicidad y aceptabilidad sensorial, proporcionando información relevante para el desarrollo de bebidas funcionales innovadoras con base en ingredientes regionales.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Kombucha

2.1.1. Generalidades

La kombucha es una bebida que se obtiene a través de un proceso de fermentación, para su elaboración tradicional se emplean té negro, té verde u oolong junto con azúcar, como se muestra en la figura 1. Para el proceso de fermentación de la kombucha se emplea un cultivo simbiótico de bacterias y levaduras denominado SCOBY que interactúan para metabolizar el té y el azúcar. La fermentación suele durar entre 7 a 10 días, durante los cuales se producen distintos ácidos orgánicos, azúcares, vitaminas y diversos compuestos fenólicos (Baschali et al., 2017; Kapp & Sumner, 2019).



Figura 1. Frasco con Kombucha de té negro.

La kombucha es originaria del lejano oriente, se tiene registro de su uso a partir del año 220 a.C., el consumo de la kombucha se extendió hasta abarcar Europa del este y Rusia. Su popularidad se debió en gran medida a su reputación como tratamiento para una serie de dolencias, que incluye enfermedades metabólicas, hemorroides y reumatismo. Sin embargo, fue durante la segunda guerra mundial cuando surgieron los primeros estudios científicos sobre dicha bebida, principalmente gracias a médicos rusos. Estos profesionales a través de sus investigaciones destacaron las propiedades medicinales de la kombucha, estableciendo así una base para estudios posteriores y elevando el interés por su consumo (Grenwalt et al., 2000; Kayisoglu & Coskun, 2021).

Se conocen diversos procedimientos y el uso de nuevos ingredientes para la elaboración de la bebida Kombucha; no obstante, (Stevens & Nieto, 2019), reportan una serie de características generales de la Kombucha:

- Sabor. Es agrídulce acercándose mucho a un sabor ácido (avinagrado), con un toque amargo.
- Olor. Intenso y penetrante, que indica una fermentación continua.
- Aspecto. El disco, hongo o SCOBY es de un tono que va de beige a blanco crema, con unas hebras marrones, con burbujas debajo. El líquido corresponde a un tono ámbar o marrón.

En cuanto al mercado, el brote de la pandemia de COVID-19 ocasionó el interés de las personas por procurar su salud y la búsqueda de productos alternativos, de origen natural y con beneficios para sus cuerpos, esto trajo consigo nuevas fronteras para productos como la kombucha que se anuncia como natural, con un alto contenido en enzimas y ácidos producidos por bacterias con la capacidad de reforzar el sistema inmunológico, desintoxicar el cuerpo, reducir algunos dolores, entre otros (Kim & Adhikari, 2020).

Debido a lo anterior, el mercado está experimentando un crecimiento notable. Se proyecta un aumento de manera significativa, pasando de alcanzar los 2.71 millones de dólares en 2023 a un estimado de 4.26 millones de dólares para el año 2028. Este pronóstico presenta una tasa compuesta anual del 9.48 % durante el período comprendido entre 2023 y 2028, según los datos de (Mordor Intelligence, 2023; Nyhan et al., 2022). Siendo los principales consumidores los países del norte como Estados Unidos, Canadá, Rusia, entre otros, como se observa en la figura 2. El interés creciente por la kombucha está demostrando una necesidad de información para generar nuevas fórmulas para bebidas basadas en infusiones de diversos orígenes como lo puede ser la hoja de ramón (*Brosimum alicastrum*) para sí, dejar atrás los sabores más tradicionales y experimentar nuevos aromas y sabores.



Figura 2. Distribución geográfica del consumo global de kombucha, 2021 (Mordor Intelligence, 2023).

2.1.2. Proceso de fermentación

La fermentación que se lleva a cabo para producir la bebida kombucha depende de diversos microorganismos que interactúan de manera simbiótica, estos pueden variar dependiendo del origen del inóculo. Para su elaboración es necesario agregar una cantidad específica de inóculo de kombucha previamente fermentada, además de una sección del consorcio microbiano conocido como "SCOBY". Este consorcio se presenta en forma de una biopelícula de celulosa, como se muestra en la figura 3. El ESCOBY está compuesto por diversos microorganismos, como las bacterias ácido acéticas, ácido lácticas y levaduras (Ojo & De Smidt, 2023).

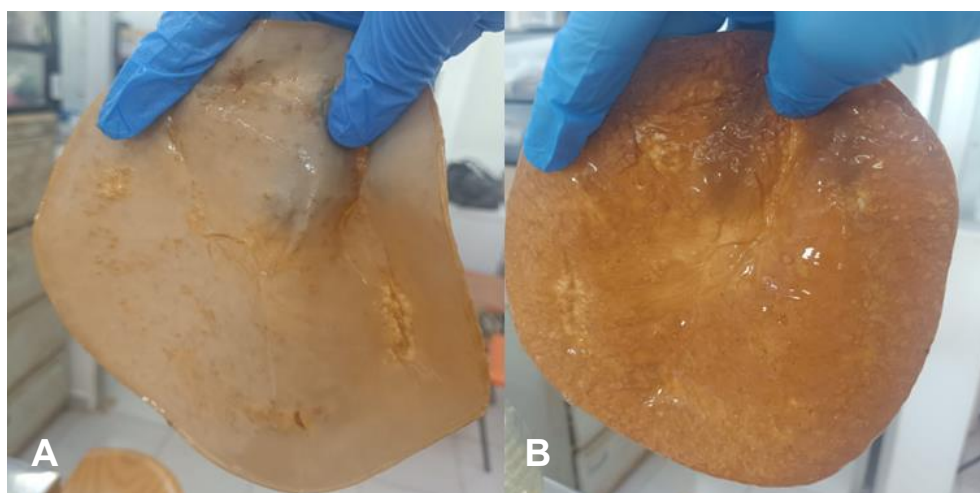


Figura 3. SCOBY obtenido de kombucha de té negro. A: superficie superior (a la bebida) del SCOBY, B: superficie inferior (a la bebida) del SCOBY.

La figura 4 resume las rutas metabólicas que utilizan los microorganismos durante la fermentación de la kombucha. Se destaca el consumo de sacarosa como fuente de carbono y su conversión en glucosa y fructuosa. Además, se observa la producción de celulosa por parte de las bacterias, así como la generación de ácido glucónico, etanol y dióxido de carbono (Laureys et al., 2020). Estos procesos metabólicos son fundamentales para la transformación de los ingredientes iniciales en los compuestos que caracterizan a la kombucha como una bebida fermentada única y beneficiosa.

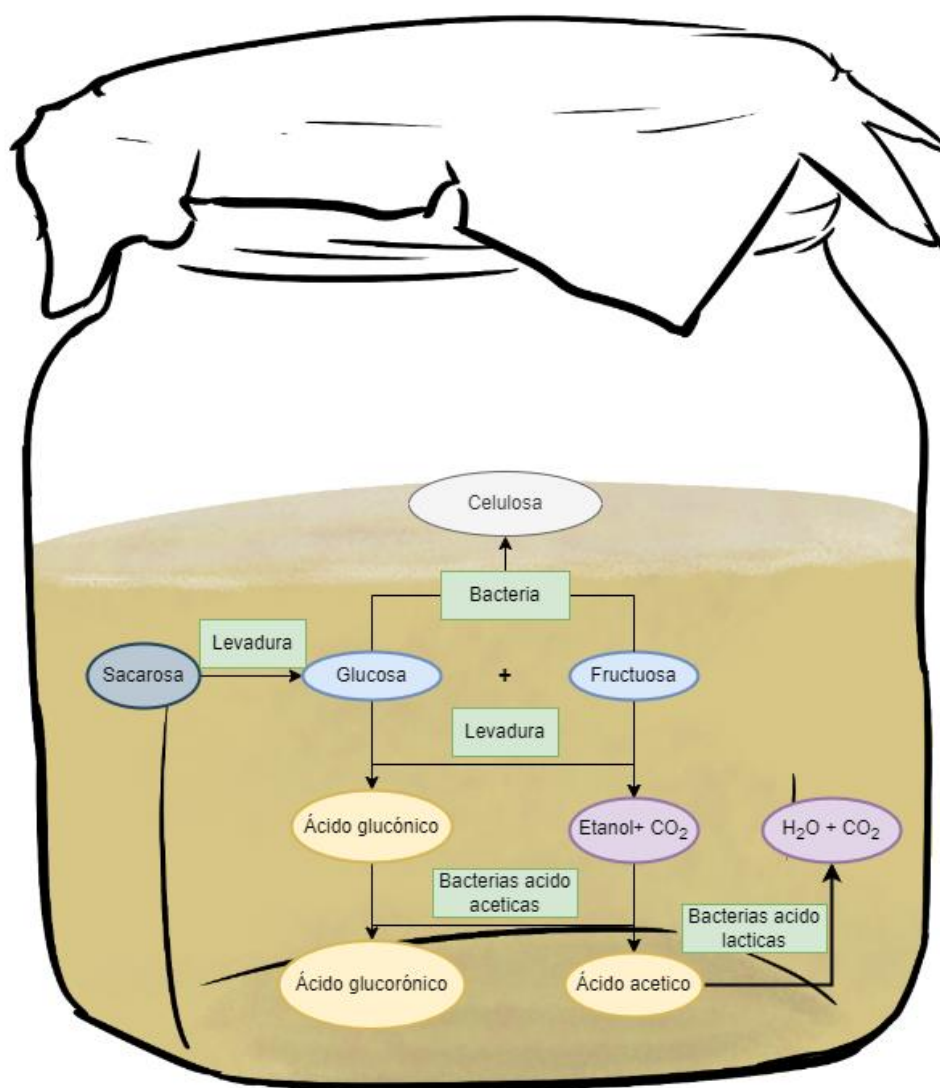


Figura 4. Vía metabólica principal en la producción de kombucha y los metabolitos generados, obtenido de (Ojo & De Smidt, 2023).

La sacarosa se utiliza como el sustrato inicial para la fermentación de kombucha, la invertasa hidroliza la sacarosa en el periplasma de los microorganismos ocasionando un aumento de glucosa y fructosa, que luego se usa para producir celulosa por medio de otros procesos metabólicos del consorcio microbiano, además, la producción de celulosa se ve aumentada con la presencia de cafeína y xantinas (Grenwalt et al., 2000; Laureys et al., 2020; Mamlouk & Gullo, 2013).

Por medio de las levaduras se lleva a cabo la fermentación de la glucosa y la fructosa dando como resultado etanol, dióxido de carbono y glicerol. El etanol resultante del proceso de las levaduras es usado como sustrato por las bacterias para llevar a cabo una reacción que produce ácido acético. Durante el proceso de fermentación de la kombucha se producen diversos residuos como la fructuosa, glucosa y sacarosa, además de diversos metabolitos como el etanol, glicerol, ácido acético, ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido D-sacarido1,4-lactona y en diversos casos ácido láctico (Laureys et al., 2020; Ojo & De Smidt, 2023)

2.1.3. Factores que afectan la fermentación

La fermentación, siendo un proceso biológico complejo, está sujeta a la influencia de diversos factores ambientales y nutricionales. Dichos factores definen las características, así como la eficiencia del proceso de fermentación. Entre los principales factores que afectan dicho proceso se incluyen el tiempo de fermentación, la temperatura, el tipo de sustrato, CO₂ disuelto, el funcionamiento del sistema e incluso la adición de fuentes de nitrógeno y carbono extra (Villarreal-Soto et al., 2018).

2.1.3.1 Tiempo

La fermentación correcta de la kombucha varia entre 7 y 15 días. Este rango de tiempo se considera óptimo para obtener una kombucha de alta calidad, ya que permite el desarrollo adecuado de sus características organolépticas y nutricionales (Bishop et al., 2022; Kim & Adhikari, 2020; Nyhan et al., 2022). En diversos casos, cuando la fermentación se extiende más allá de los 15 días, existe el riesgo de que la acidez en la bebida aumente a niveles que podrían ser perjudiciales para el consumo humano (Villarreal-Soto et al., 2018).

El período de fermentación típico para la kombucha varía dependiendo de las expectativas del producto final. Si se busca un producto con un nivel específico de dulzura, la fermentación será breve. Por otra parte, si se desea un producto más ácido la fermentación se extenderá (Stevens & Nieto, 2019).

2.1.3.2. Temperatura

El tiempo en conjunto con la temperatura define de manera más acertada la acidez o dulzor de la bebida final, lo anterior se ejemplifica en los resultados obtenidos por (Robles Aedo, 2011), que, compararon ocho tratamientos para la kombucha donde varió la concentración del té negro (4 g/L y 8 g/L), el tiempo de fermentación (36 h y 72 h) y la temperatura (18 °C y 28 °C), usando 100 g/L de sacarosa, sus resultados indicaron que los tratamientos con 36 h a 18 °C dieron sabores dulces, mientras que, los tratamientos con 72 h a 28 °C dieron un sabor más ácido. En síntesis, los resultados indican que una fermentación a mayor temperatura y a un tiempo prolongado presentan una acidez y amargor mayor, que, en su contraparte, un menor tiempo a una baja temperatura presenta mayor dulzor y menor acidez, producto de una fermentación limitada y lenta al no haberse consumido totalmente la fuente de carbono.

A demás, (Laureys et al., 2020; Stevens, 2019) mencionan que, temperaturas entre los 30 y 36 °C benefician el desarrollo de las bacterias ácido acéticas y la liberación de polifenoles.

2.1.3.3. Sustrato

El sustrato está compuesto por una cantidad determinada de un azúcar y una infusión de hojas o frutos. De acuerdo con (Vargas, 2011) el factor determinante para las características organolépticas y fisicoquímicas es el tipo de edulcorante empleado. En su estudio se compararon dos tipos de sustratos azucarados: 100 g/L de sacarosa y sacarosa (50 g/L) + miel de abeja (50 g/L). Con dos concentraciones de té negro (*Camellia sinensis*): 2 g/L y 6 g/L. durante 209 h, se midieron °Brix, pH, acidez, sabor y olor, los resultados indican que el edulcorante utilizado en conjunto con la concentración del té fue el factor que tuvo diferencias significativas en el análisis

estadístico y las bebidas preparadas con 100 g/L de sacarosa y 6 g/L de té negro presentaron mejores resultados.

Por otro lado, la concentración del azúcar en la infusión es determinante para el SCOBY. (Victoriano Huerta et al., 2022) elaboró dos medios de cultivo, ambos con 10 g/L de Té negro (*Camellia sinensis*), 1 g/L de peptona, 10 g/L de extracto de levadura y al segundo medio se le agregó cacao (*Teobroma cacao*), con los medios comparó cuatro concentraciones de sacarosa (5, 10, 15 y 20 %), a 26 °C durante 7 d por medio del índice de orden lateral (LOI), el índice total de cristalinidad (TCI), la intensidad de enlaces de hidrógeno (HBI), así como la fracción α ($f\alpha$). Los resultados obtenidos en ambos medios indican que, a mayor concentración de sacarosa, la celulosa, así como su cristalización aumentan, lo que se traduce en un SCOBY mucho más grande y ancho.

2.1.4. Cambios en los parámetros durante la fermentación

2.1.4.1. pH

El pH es un indicador de acidez o alcalinidad para una sustancia. Se define como el logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno en moles por litro, sus valores se leen a partir del 1 hasta 14 (Morales, 2014).

Es uno de los aspectos fundamentales para garantizar la inocuidad del fermento. Los ácidos formados en el proceso de fermentación como el acético o el glucogénico tienen relación con las actividades antimicrobianas. Los parámetros idóneos para el pH oscilan entre 2.5 a un máximo de 5 (Grenwalt et al., 2000; Villarreal-Soto et al., 2018). Sin embargo, el pH puede variar a lo largo de la fermentación dependiendo de los distintos factores como se puede observar en la tabla 1.

Tabla 1. Cambios en el pH a lo largo del tiempo de fermentación de diversas kombuchas.

Origen de la kombucha	Condiciones	Cambios en el pH	Autores
-----------------------	-------------	------------------	---------

Té negro (<i>Camellia sinensis</i>) hojas secas		6.86 a 2.37	
Té verde hojas secas	- 70 g/L de sacarosa	6.94 a 2.75	
Menta (<i>Mentha piperita</i> L) hojas secas	- 14 d fermentación - 24±1 °C - 1 % de infusión	7.26 a 2.75	(Kayisoglu & Coskun, 2021)
Tilio (<i>Tilia platyphyllos</i>) hojas secas	- 7 mL/L de inóculo de kombucha	7.57 a 2.42	
Salvia (<i>Camelia sinensis</i>) hojas secas		7.74 a 3.225	
Té negro (<i>Camellia sinensis</i>) hojas secas		4.56 a 3.31	
Guanábana (<i>Annona muricata</i>) hojas secas	- 60 g/L de sacarosa - 11 d fermentación - 18 ± 0.76 °C - 0.4 % de infusión	4.73 a 3.33	(Loor García, 2022)
Guayusa (<i>Ilex guayusa</i>) hojas secas	- 2.5 mL/L de inóculo de kombucha	4.67 a 3.34	
Café (<i>Coffea</i>) Grano tostado		4.83 a 3.5	
Té negro (<i>Camellia sinensis</i>) hojas secas	- 100 g/L de sacarosa - 12 d fermentación - 25 °C - 0.2 % de infusión - 100 mL/L de inóculo de kombucha	4.74 a 2.91	
	- 100 g/L de sacarosa - 12 d fermentación - 25 °C - 0.6 % de infusión - 100 mL/L de inóculo de kombucha	4.42 a 2.89	(Vargas, 2011)
	- 50 g/L de sacarosa + 50 g/L Miel - 12 d fermentación - 25 °C - 0.2 % de infusión - 100 mL/L de inóculo de kombucha	4.75 a 2.97	
	- 50 g/L de sacarosa + 50 g/L Miel	4.42 a 2.96	

- 12 d fermentación
- 25 °C
- 0.6 % de infusión
- 100 mL/L de inóculo de kombucha

En todos los procesos de fermentación de la kombucha, se observa una tendencia a la reducción del pH, se resalta que a partir del día 10 el pH alcanza un valor de 3 o menor en todos los casos, lo que indica que el proceso de fermentación se llevó a cabo. (Vargas, 2011) plantea que la disminución del pH depende en mayor medida del tipo y la cantidad de la fuente de carbono, por otra parte (Kayisoglu & Coskun, 2021) resalta el comportamiento del tratamiento con menta (*Mentha piperita*) por su disminución drástica en el pH y el aumento en el contenido de compuestos fenólicos.

2.1.4.2. Acidez titulable

Los grados de acidez son la capacidad de una sustancia para neutralizar una base, expresada como la cantidad de ácido necesaria para alcanzar un pH determinado, este proceso se determina a través de una valoración volumétrica empleando una sustancia básica como el NaOH y el resultado se expresa como un porcentaje del ácido predominante en la bebida (Morales, 2014). La acidez es un indicador importante de la madurez y calidad del producto final, ya que influye en su sabor, conservación y seguridad alimentaria. La tabla 2 presenta distintas condiciones y como estas afectan el nivel de acidez a lo largo de la fermentación de la kombucha.

Tabla 2. Cambios en la acidez a lo largo del tiempo de fermentación de diversas kombuchas.

Origen de la kombucha	Condiciones	Cambios en la acidez (g/L de ácido acético)	Autores
Té negro (<i>Camellia sinensis</i>) hojas secas	- 110 g/L de piloncillo (fuente de carbono) - 8 d fermentación - 24±1 °C - 1 % de infusión	Día 1: 0.55 Día 8: 3.97	(Acevedo Ruiz et al., 2023)

	- 50 mL/L de inóculo de kombucha -160 g/L de SCOBY		
Té negro (<i>Camellia sinensis</i>) hojas secas	- 80 g/L sacarosa - 7 d fermentación - 28±2 °C - 0.8% de infusión - 40 g/L de SCOBY	Día 1: 2.16 Día 3: 7.6	(Robles Aedo, 2011)
Brasilete de la India (<i>Caesalpinia sappan</i>) hojas secas	- 100 g/L sacarosa - 13 d fermentación - 100 mL/L de inóculo de kombucha	Día 4: 0.7445 Día 10: 0.8897 Día 13: 0.8545	(Sinamo et al., 2022)
	- 200 g/L sacarosa - 13 d fermentación - 100 mL/L de inóculo de kombucha	Día 4: 0.7555 Día 10: 0.9239 Día 13: 0.8545	
	- 300 g/L sacarosa - 13 d fermentación - 100 mL/L de inóculo de kombucha	Día 4: 0.7234 Día 10: 0.8401 Día 13: 0.7983	
Rosa mosqueta (<i>Rosa eglanteria</i>) hojas secas	- 90 g/L sacarosa - 21 d fermentación - 25±2 °C	Día 0:0.87 Día 21: 9	(Doğan & Doğan, 2023)
Regaliz (<i>Glycyrrhiza glabra</i>) hojas secas	- 0.4% de infusión - 100 mL/L de inóculo de kombucha	Día 0: 0.33 Día 21: 18	

Se puede esperar que el comportamiento de la acidez durante los proceso de fermentación de la kombucha sigan una tendencia de aumento y que esté correlacionada de forma negativa con el pH de dichas bebidas, esto como consecuencia de la fermentación (Doğan & Doğan, 2023). Sin embargo, resultados como los de (Sinamo et al., 2022) indican que el aumento de la acidez se da hasta cierto punto y luego tiende a disminuir ocasionado por el consumo del sustrato de la kombucha, mencionando a su vez que los resultados pueden cambiar en función del porcentaje de azúcar empleado en la bebida.

2.1.4.3. Sólidos solubles (°Brix)

Los sólidos solubles se refieren al nivel de sacarosa presente en la solución, el cual se cuantifica en unidades de °Brix (representación del porcentaje en masa). (Morales, 2014). A lo largo del proceso de fermentación de la kombucha, es probable que se observe una reducción de los sólidos solubles. Esto se puede apreciar en los distintos resultados presentados en la tabla 3.

Tabla 3. Cambios en los sólidos solubles (°Brix) a lo largo del tiempo de fermentación de diversas kombuchas

Origen de la kombucha	Condiciones	Cambios de los sólidos solubles (°Brix)	Autores
Labrusca (<i>Vitis labrusca</i>) fruto seco	- 100 g/L sacarosa - 21 d fermentación - 24±1 °C - 0.65 % de infusión - 150 mL/L de inóculo de kombucha - 40 g/L de SCOBY	Día 0: 7.60 Día 21: 6.90	(Tomar, 2023)
Morera negra (<i>Morus nigra</i>) fruto seco		Día 0: 9.00 Día 21: 8.20	
Rosal silvestre (<i>Rosa canina</i>) fruto seco		Día 0: 7.60 Día 21: 7.10	
Té negro (<i>Camellia sinensis</i>) hojas secas	- 60 g/L de sacarosa - 11 d fermentación - 18 ± 0.76 °C - 0.4% de infusión - 2.5 mL/L de inóculo de kombucha	Día 1: 5.7 Día 11: 4	(Loor García, 2022)
Guanábana (<i>Annona muricata</i>) hojas secas		Día 1: 5.58 Día 11: 4.95	
Guayusa (<i>Ilex guayusa</i>) hojas secas		Día 1: 5.5 Día 11: 5.48	
Café (<i>Coffea</i>) Grano tostado		Día 1: 5.95 Día 11: 5.65	
Té negro (<i>Camellia sinensis</i>) hojas secas	- 70 g/L de sacarosa - 14 d fermentación - 24±1 °C - 1% de infusión - 7 mL/L de inóculo de kombucha	Día 0: 7.60 Día 14: 5.45	(Kayisoglu & Coskun, 2021)
Té verde hojas secas		Día 0: 7.40 Día 14: 6.75	
Menta (<i>Mentha piperita</i> L) hojas secas		Día 0: 8.10 Día 14: 7.60	

Tilio (<i>Tilia platyphyllos</i>) hojas secas	Día 0: 7.60 Día 14: 6.60
Salvia (<i>Camelia sinensis</i>) hojas secas	Día 0: 7.50 Día 14: 7.05

El comportamiento general de los sólidos solubles durante la fermentación de la kombucha tiende a disminuir. Este fenómeno depende en gran medida del tipo de sustrato utilizado. Por ejemplo, investigaciones como las de (Kayisoglu & Coskun, 2021; Loor García, 2022) han demostrado una disminución significativa de los sólidos solubles cuando se utiliza té negro como sustrato. En contraste, otros sustratos muestran una disminución menor en los sólidos solubles.

Aunque la tendencia general de los sólidos solubles es disminuir durante la fermentación, al inicio de este proceso, los sólidos solubles pueden aumentar. Esto se debe a los productos generados por el metabolismo de las levaduras y bacterias presentes. La presencia de estos metabolitos provoca un incremento en la medida de los grados Brix, además de la sacarosa que aún no se ha hidrolizado (Loor García, 2022).

2.1.5. Composición microbiológica y química de la kombucha

La composición microbiológica de la kombucha es variable; sin embargo, existen ciertas especies que se encuentran en la mayoría de las muestras de kombucha (Tabla 4). Generalmente, está compuesta por levaduras de los géneros *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* y *Dekkera/Brettanomyces*; bacterias ácido acéticas de los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* y *Komagataeibacter*; y en menor medida, bacterias ácido lácticas, entre las que se encuentran principalmente *Oenococcus oeni* y *Lactobacillus nagelii* (Grenwalt et al., 2000; Laureys et al., 2020; Villarreal-Soto et al., 2018).

Tabla 4. Composición general del microbioma de la kombucha.

Microorganismo	Características
----------------	-----------------

Levaduras	Son microorganismos facultativos anaeróbicos, su crecimiento optimo es alrededor de 20 a 30 °C y un pH de 4.5 a 7, se caracterizan por su producción de etanol, dióxido de carbono, vitamina B, aminoácidos y está implicado en la conversión de compuestos fenólicos (Antolak et al., 2021; Laureys et al., 2020) La producción de etanol de las levaduras ayuda a la producción bacteriana de ácido acético y viceversa, además de una alta liberación de polisacáridos (Grenwalt et al., 2000; Villarreal-Soto et al., 2018).
<i>Brettanomyces</i>	
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	
<i>Brettanomyces intermedius</i>	
<i>Candida</i>	
<i>Candida famata</i>	
<i>Mycoderma</i>	
<i>Mycotorula</i>	
<i>Pichia</i>	
<i>Pichia membranaefaciens</i>	
<i>Saccharomyces</i>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<i>Torula</i>	
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	
<i>Zygosaccharomyces</i>	
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	
<i>Zygosaccharomyces rouzii</i>	
Bacterias ácido acéticas	Son bacterias gramnegativas, se desarrollan a temperaturas entre 25 y 30 °C. Se relacionan con la producción de celulosa, oxidación de alcoholes, aldehídos, azúcares, alcoholes de azúcar en presencia de oxígeno, vitamina C y está implicado en la conversión de compuestos fenólicos (Antolak et al., 2021; Laureys et al., 2020)
<i>Acetobacter</i>	
<i>Gluconobacter</i>	
<i>Gluconacetobacter</i>	
<i>Komagataeibacter</i>	Son bacterias grampositivas, no son móviles y son facultativamente anaeróbicos. Además del ácido láctico están relacionadas con la producción de otros metabolitos como etanol, dióxido de carbono, diacetilo, manitol y está implicado en la conversión de compuestos fenólicos (Antolak et al., 2021; Laureys et al., 2020)
Bacterias ácido lácticas	
<i>Oenococcus oeni</i>	
<i>Lactobacillus nagelii</i>	

(Grenwalt et al., 2000; Laureys et al., 2020; Villarreal-Soto et al., 2018).

Además, la composición química de la kombucha está significativamente influenciada por el inóculo, la concentración inicial de azúcar, la fuente de nitrógeno, la duración de la fermentación y la temperatura. Sin embargo, existen una serie de compuestos característicos que se presentan durante todos los procesos de fermentación de la kombucha, principalmente ácidos como el acético, glucónico, glucurónico, azúcares y etanol (tabla 5), (Stevens, 2019; Villarreal-Soto et al., 2018).

Tabla 5. Composición química general de la Kombucha.

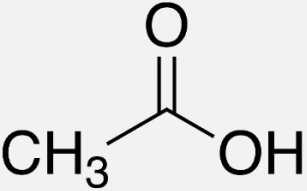
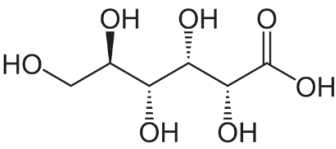
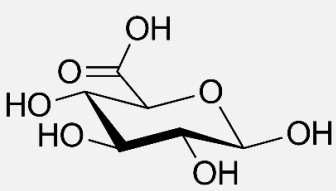
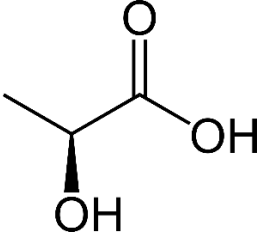
Compuestos	Composición media	Sacarosa inicial	Tiempo de fermentación (días)
Ácidos orgánicos	Ácido acético	5.6 g/L	70 g/L
	Ácido acético	8.36 g/L	100 g/L
	Ácido acético	11 g/L	100 g/L
	Ácido glucónico	39 g/L	100 g/L
	Ácido glucurónico	0.0160 g/L	70 g/L
Vitaminas	Ácido láctico	0.18 g/L	100 g/L
	Vitamina B1	0.74 mg/mL	70 g/L
	Vitamina B2	8 mg/100 mL	70 g/L
	Vitamina B6	0.52 mg/mL	70 g/L
	Vitamina B12	0.84 mg/mL	70 g/L
Compuestos generales	Vitamina B1C	25 mg/L	70 g/L
	Etanol	5.5 g/L	100 g/L
	Proteínas	3 mg/mL	100 g/L
Minerales	Cu, Fe, Mg, Ni, Zn	0.1 a 0.4 µg/mL	70 g/L
Aniones	F ⁻ , Cl ⁻ , Br ⁻ , I ⁻ , NO ₃ ⁻ , HPO ₄ ⁻ , SO ₄ ⁻	0.04 a 3.20 mg/g	100 g/L

(Mousavi et al., 2020; Villarreal-Soto et al., 2018)

La kombucha contiene diversos ácidos orgánicos que son producidos durante la fermentación, el consumo de dichos ácidos tra e consigo diversos beneficios (tabla 6).

La sacarosa, el ácido acético y el ácido glucónico son los principales componentes predominantes en la fermentación, sin embargo, ácidos como cetoglucónico, ácido succínico y ácidos carbónicos están presentes en menores cantidades, generalmente en cantidades inferiores a 1 g/litro, además, el nivel de metabolitos presentes en la bebida está directamente relacionada con la cantidad de edulcorante utilizado (Grenwalt et al., 2000).

Tabla 6. Características de los compuestos principales de la kombucha

Compuesto	Descripción	Estructura
Ácido acético	Tienes capacidades antimicóticas y antibacterianas, además es un intermediario importante en la degradación de grasas y la producción de cuerpos cetónicos (Caceres et al., 2021).	
Ácido glucónico	Es un regulador de la acidez y potenciador de sabores, útil para deficiencia de hierro (Paredes & Espinosa, 2009), su acumulación favorece la disolución de minerales (Mendez, 2013).	
Ácido glucurónico	Puede conjugarse y producir metabolitos solubles fáciles de excretar por medio de la orina, lo que lo dota de capacidades desintoxicantes (Castro, 2019).	
Ácido láctico	Tiene funciones antibacterianas (Ramírez et al., 2011), ayuda a la digestión, refuerza la salud intestinal y contribuye a la resistencia muscular (Torres & Gómez, 2019).	

Otro compuesto de gran importancia para la bebida es el etanol, debido a que es empleado como precursor del ácido acético, además, el consumo de pequeñas cantidades de alcohol, como las presentes en la kombucha, podría reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (De Miranda et al., 2022), sin embargo, una fermentación descontrolada y anaerobia puede implicar una alta concentración del etanol lo que puede asociarse con problemas de salud y está contraindicado para niños y embarazadas, además de que una alta concentración puede sujetar la bebida a diferentes regulaciones (Moccia, 2023).

2.1.6. Nuevos sustratos de fermentación

Los principales ingredientes utilizados como sustrato en la producción de kombucha son la sacarosa (como fuente de carbohidratos) y el té negro (como fuente de nitrógeno). Sin embargo, existen diversos estudios que ponen a prueba varios sustratos como son infusiones de hierbas, jugos de fruta, leche, soya, etc. (Llor García, 2022), compara las infusiones de guanábana, guayusa y café como sustratos para la obtención de la bebida kombucha, reporta que el comportamiento del pH durante la fermentación es descendente en todos los tratamientos y resalta una disminución significativa en los sustratos de té negro y café. Finalmente, el autor destaca los diversos sabores obtenidos gracias al uso de sustratos alternativos.

En el estudio de (López Zazueta, 2022), se monitoreo pH, acidez total titulable y azúcares reductores durante 10 días a una temperatura de 26 °C en tres tipos de infusiones para la kombucha: Té negro 8 g/L, hojas de guayaba y té de limón (no se especifican las concentraciones de los últimos dos). Todas estas con la misma concentración de sacarosa 150 g/L, sus resultados indican que el té verde fue el que presentó un mayor aumento en la acidez titulable, aumentando de 0.07 a 0.82, sin embargo, el pH tuvo una mayor disminución para las infusiones de limón (3.65) y hojas de guayaba (3.42) y en cuanto a los azúcares reductores fue mayor en las infusiones de té de limón y hojas de guayaba, demostrando que los sustratos alternativos tienen potencial para la producción de kombucha. La tabla 7 resume otros trabajos donde se emplearon distintos sustratos resaltando las condiciones y los hallazgos relevantes.

Tabla 7. Uso de materiales alternativos en investigaciones.

Especie	Forma de uso	Condiciones	Hallazgos relevantes	Autores
Guanábana (<i>Annona muricata</i>)	Pulpa	12 g de la especie 170 g sacarosa 7 g de kombucha	El uso del café favoreció el incremento de microorganismos	(Loor García, 2022)
Guayusa (<i>Ilex guayusa</i>)	Hojas deshidratadas	1% SCOBY 11 d de fermentación	totales en la kombucha	
Café (<i>Coffea</i>)	Granos molidos	a 26 °C		
Limoncillo (<i>Melissa officinalis</i> L.)	Hojas deshidratadas	5 g/L de la especie 70 g/L de sacarosa 1% SCOBY 7 d de fermentación a 28 °C	La bebida elaborada con hojas de limoncillo mostró una mayor actividad antioxidante en comparación al té negro	(Velićanski et al., 2014)
Eucalipto (<i>Eucalyptus camaldulensis</i>) Laurel de la cierra (<i>Litsea glaucescens</i>)	Hojas deshidratadas	10 g/L de la especie 10 g/L de sacarosa 0.25 % de SCOBY 7 d de fermentación a 25 °C	Las kombuchas elaboradas con eucalipto y Laurel mostraron una actividad antioxidante alta.	(Gamboa-Gómez et al., 2016)
Rooibos (<i>Aspalanthus linearis</i>)	Hojas deshidratadas	8 g/L de la especie 80 g/L de sacarosa 3 % de SCOBY 14 d de fermentación a 27 °C	El uso de Rooibos como sustrato ocasionó una alta producción de ácido acético antes de alcanzar los 14 días.	(Gaggia et al., 2018)
Cerezo ácido (<i>Prunus cerasus</i>)	Jugo	1 L de la especie 8 g/L de sacarosa 8.7 % de SCOBY 14 d de fermentación a 37 °C	El jugo de cerezo usado como sustrato presentó una alta actividad antioxidante.	(Yavari et al., 2010)
Nopal (<i>Opuntia ficus-indica</i>)	Jugo	300 mL de la especie 3 % de SCOBY 12 d de fermentación a 30 °C	La kombucha elaborada con jugo de nopal presentó una alta actividad antioxidante	(Ayed et al., 2017)
Té verde	Hojas deshidratadas	3 g/L de la especie 10 g/L de sacarosa 4 % de SCOBY	El té verde empleado como sustrato presenta favorece una alta	(Najafpour et al., 2020)

14 d de fermentación a 28 °C	producción de ácido acético antes de los 14 días.
---------------------------------	--

2.1.7. Técnicas de preparación de bebida Kombucha

La kombucha se prepara en un recipiente estéril para evitar la contaminación por mohos u organismos patógenos transportados por el aire. La receta consta de una infusión de alguna clase de té u hoja 3 a 15 g/L, endulzada con sacarosa con 50 a 150 g/L, posteriormente se dejan reposar las hojas durante un breve período de tiempo, para posteriormente retirar dichas hojas (Laureys et al., 2020; Villarreal-Soto et al., 2018). Después de retirar las hojas de té, se deja enfriar a temperatura ambiente, se añade una porción de SCOBY y de inóculo tomado de un lote anterior, luego se cubre con un paño de algodón limpio y se incuba a temperatura ambiente durante 7 a 21 d, finalmente se elimina la colonia microbiana y se obtiene la bebida (Doğan & Doğan, 2023; Grenwalt et al., 2000; Laureys et al., 2020). La figura 5 describe el procedimiento general para la producción de kombucha empleando diversos tipos de sustratos.

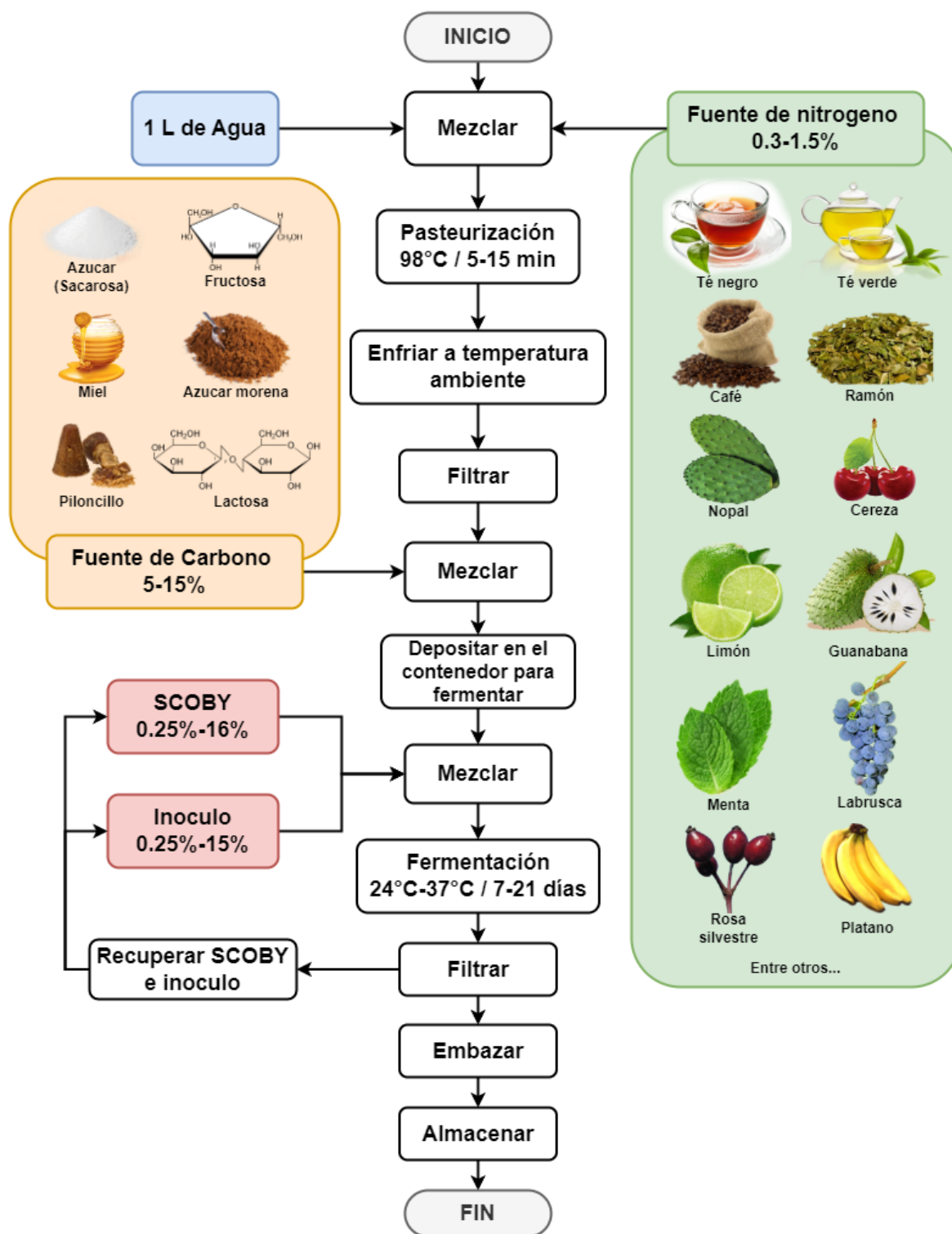


Figura 5. Diagrama general de la preparación de Kombucha.

En términos de riesgos y la correcta preparación de la kombucha (Murphy et al., 2018) emplea los principios de HACCP, para analizar los peligros biológicos, químicos,

físicos y alergénicos, junto con las medidas preventivas recomendadas durante la preparación de la kombucha (Tabla 8).

Tabla 8. Riesgos y precauciones durante la preparación de kombucha.

Clasificación	Riesgos	Precauciones
Biológico	Patógenos asociados con alimentos con bajo contenido de humedad, como especias secas, nueces, té y tisanas	Emplear un proceso de infusión con la fuente de nitrógeno a 100 °C por 5 min como mínimo.
	El enfriamiento prolongado de la infusión lo hace susceptible a la contaminación	Se recomienda que el enfriamiento no se prolongue más de 2 horas a temperatura ambiente
	Un pH mayor o igual a 4 permite la proliferación de algunos microorganismos	Dejar que la fermentación se extienda 10 días o más hasta que se alcance un pH igual o menor a 3 para evitar la proliferación de ciertos microorganismos
	Contaminación de moho en el SCOBY	Higiene y saneamiento a la hora de manipular el SCOBY, inspecciones rutinarias buscando colores anormales (verde, blanco, negro o gris), en caso de anomalías desechar la kombucha.
	Contaminación cruzada durante la elaboración de la kombucha.	Limpiar el área de preparación minuciosamente, emplear utensilios estériles y cubrir la kombucha con paños limpios.
Químico	Contaminación química causada por recipientes esmaltados o con algún residuo químico.	Se recomienda el uso de recipientes de vidrio para la fermentación y para almacenar el producto final, enjuagado con agua destilada y etanol.
	Riesgo de acidosis química por consumo constante, principalmente en mujeres embarazadas, personas con	El consumo diario de kombucha no debe exceder los 125 ml (o ½ taza) para personas sin problemas de salud preexistentes conocidos.

	inmunodeficiencias o alcohólicas. Altos niveles de alcohol por una fermentación de levaduras descontrolada durante el almacenamiento del producto final.	La pasteurización del producto y la adición de 0.1% de benzoato de sodio y 0.1% de sorbato de potasio, puede detener la actividad de la levadura y así prevenir la producción excesiva de alcoholes y dióxido de carbono
Físico	Materias extrañas presentadas por la persona que prepara el té y residuos de partículas después de la infusión.	Se recomienda evitar el uso de joyas o accesorios, además de revisar la kombucha para comprobar la existencia de residuos del mismo té

(Batista et al., 2022; Murphy et al., 2018)

2.1.8. Propiedades terapéuticas de Kombucha

La kombucha se presenta como un alimento funcional, lo que significa que tiene efectos beneficiosos sobre una o más funciones específicas del organismo, además de sus cualidades nutritivas intrínsecas (figura 6). Estos efectos la hacen adecuada para mejorar el estado de salud y bienestar, reducir el riesgo de enfermedades, o ambas cosas (Villagrán et al., 2022).

Los efectos positivos para la salud de la kombucha se atribuyen a dos cosas, el té por sí mismo y los productos generados durante la fermentación, como son el: ácido glucurónico, ácido acético, polifenoles, fenoles, complejos vitamínicos, incluido el ácido fólico y los azúcares (Baschali et al., 2017).

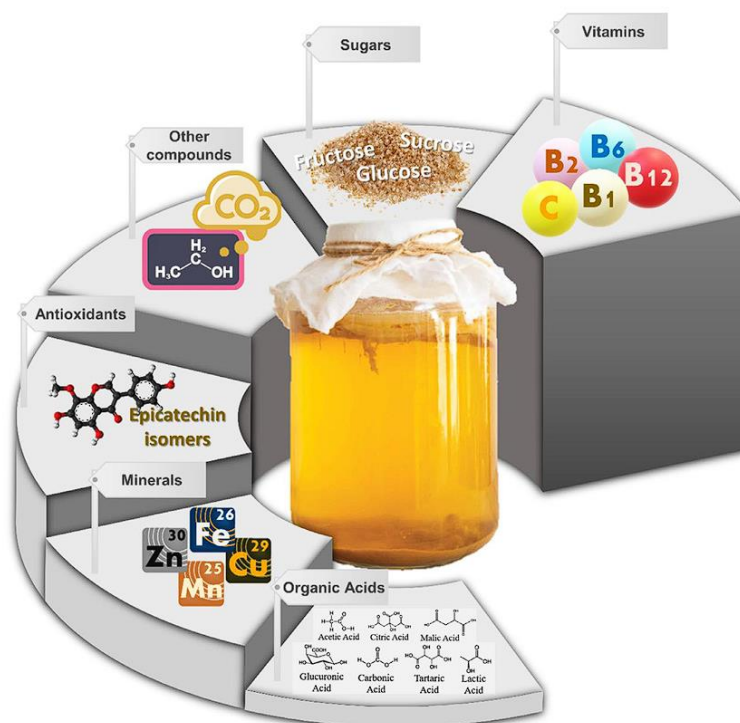


Figura 6. Composición química de la kombucha (De Oliveira et al., 2023).

Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* describen diversas propiedades benéficas para la salud que incluyen propiedades antimicrobianas, apoyo a la función hepática y gastrointestinal, estimulación del sistema inmunológico, desintoxicación, efectos antioxidantes y antitumorales. Además, se han observado efectos profilácticos y de recuperación de la salud mediante la estimulación inmunológica. La kombucha

también puede inhibir el desarrollo y la progresión de diversos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes y enfermedades neurodegenerativas, así como promover el funcionamiento normal del sistema nervioso central (Baschali et al., 2017; Batista et al., 2022; Kapp & Sumner, 2019).

2.1.9. Regulaciones y riesgos de consumo

Numerosas afirmaciones sobre la kombucha sugieren que esta bebida tiene beneficios para la salud, encajando en la definición de alimento funcional. La literatura popular la describe como un "refuerzo inmunológico rico en probióticos," que "puede mejorar la depresión y la ansiedad" y "ayudar en la digestión y la pérdida de peso" (Murphy et al., 2018) Sin embargo, estas afirmaciones se vienen investigando desde hace años por medio de diversos estudios (tabla 9) no solo sobre sus propiedades, sino también sobre los riesgos que implica.

Tabla 9. Estudios *in vivo* y *in vitro* realizados con kombucha.

Estudio	Modelo <i>IN VIVO</i> / <i>IN VITRO</i>	Dosis	Resultados	Referencia
Estudio oral de toxicidad de kombucha (90 días)	Ratas hembra 110-160 g (<i>Rattus norvegicus domestica</i>)	2 mL/kg Kombucha 90 días diario (10 g/L té Lipton red, 100 g/L sacarosa, 50 g/L SCOBY y 8 d fermentación)	No representó ningún riesgo	(Vijayaraghavan et al., 2000)
Fermentación de kombucha en bebida de arándanos (<i>Vaccinium myrtillus</i>) y su efecto gastroprotector	Ratas hembra 20-25 g (<i>Rattus norvegicus domestica</i>)	10 mL/kg Kombucha 16 días (100 g/L arándano, 6 g/L SCOBY y 21 d fermentación)	No tuvo un efecto significativo como gastro protector y en algunos casos ocasionó úlceras.	(Barbosa et al., 2022)
Toxicidad de 2 tipos de kombucha alternativas con (<i>Malvaviscus arboreus</i>) y (<i>Camellia sinensis</i>)	Larvas de polilla 150 mg (<i>Galleria mellonella</i>)	10 µL Kombucha (5g/L hojas, 50 g/L sacarosa, 25 g/L SCOBY, 10 mL/L inóculo y	Ninguno de los tratamientos representó un riesgo	(Silva et al., 2021)

	14 d fermentación)			
	10 µL			
Toxicidad <i>IN VIVO</i> de una kombucha a base de café árabe (<i>Coffea arabica</i> L.)	Larvas de polilla 150 mg (<i>Galleria mellonella</i>)	Kombucha (5 g/L hojas, 50 g/L sacarosa, 50 g/L SCOBY, 100 mL/L inoculo, 15 y 21 d fermentación)	Ninguno de los tratamientos representó un riesgo	(Ferreira De Miranda et al., 2023)
	Medio con Kombucha (5 g/L té verde, 70 g/L sacarosa, 100 mL/L inoculo, 20 d fermentación y 50 g polen multifloral agregado después de la fermentación)			
Veneficios del polen fermentado con kombucha	Células Caco-2 Células de adenocarcinoma de colon humano		El producto en combinación con el polen mostró un efecto antitumoral moderado	(Uțoiu et al., 2018)
Actividad inmunomoduladora de <i>Salmonella</i> TYPHI usando Kombucha a base de jugo de pitaya (<i>Selenicereus undatus</i>) y té negro (<i>Camellia sinensis</i>)	Salmonella TYPHI Inoculado en ratones	0.007 mL/g Kombucha (10 g/L pitaya y té negro, 100 g/L sacarosa, 100g/L SCOBY, 14 d fermentación)	Ambos tratamientos tienen el potencial de utilizarse como inmunomoduladores para evitar las condiciones inestables del sistema inmunológico causadas por <i>Salmonella typhi</i>	(Zubaidah et al., 2020)

La Kombucha es considerada como un producto nutracéutico, dichos productos carecen de regulaciones en la mayoría de países y las pocas que hay son imprecisas (tabla 10). En Latinoamérica dichas regulaciones son muy escasas, sin embargo, existen organizaciones sin fines de lucro como “Kombucha Brewers International” que se dedican a informar sobre la elaboración y el consumo de dicha kombucha. Aunado a lo anterior, es necesario contar con parámetros especializados para la elaboración, almacenamiento y consumo de esta bebida para poder reducir los riesgos para los consumidores.

Tabla 10. Regulaciones aplicables a la kombucha de diferentes países.

Países	Regulaciones
Japón	No cuentan con una restricción para probióticos, sin embargo, las bebidas fermentadas o con ácido acético deben contener una baja cantidad de bacterias ácido lácticas (LAB). Además, clasifican los productos considerados probióticos como “alimentos con declaraciones de función nutritiva” (FNFC), “alimentos con uso específico para la salud” (FOSHU) o “alimentos con declaraciones funcionales” (FFC). Por otro lado, para que un producto sea considerado como FOSHU, es necesario obtener un permiso especial del Ministerio de salud y Bienestar (MHLW) y no se les permite afirmar en sus etiquetas su eficiencia como medicamento.
China	Emplea la Ley de Higiene de los alimentos saludables desde 1995 para aprobar diversos alimentos para su consumo, dicha ley clasifica los nutraceuticos en tres grupos: “suplementos dietéticos” que son las vitaminas, minerales, aminoácidos; dichos productos deben tener la etiqueta “sombrero azul” y ser veraces en su afirmación. La categoría “nuevos recursos alimentarios” no requiere un estudios ni pruebas científicas previas, solo la aprobación de Administración Estatal de Alimentos y Medicamentos (SFDA). Por último, están los “probióticos” al igual que los anteriores solo requieren ser aprobados por la SFDA y no hay limitaciones claras a la hora de su etiquetado, la kombucha entra en esta clasificación.
Estados Unidos	La mayoría de los productos probióticos son importados, estos son clasificados como alimentos o suplementos dietéticos. Son regulados por las comisiones de Ley de Educación y Salud de Suplementos Dietéticos (DSHEA) y la FDA. Cualquier sustancia añadida intencionalmente a los alimentos debe ser revisada y aprobada por la FDA, excepto aquellas que se consideren seguras

	bajo las condiciones de uso previstas. Los productores pueden hacer declaraciones estructurales, nutricionales y de salud en los EE. UU., siempre que vayan acompañadas de una exención de responsabilidad exigida por la FDA que muestre información veraz y fundamentada respaldada por evidencia científica. Cuando la kombucha sufre fermentación alcohólica, la ley federal indica que las bebidas no alcohólicas no deben contener más de 0.5 % de alcohol por volumen en ningún momento de su producción, embotellado y venta. Si excede el límite la Kombucha será regulada por la Oficina de Comercio e Impuestos sobre el Alcohol y el Tabaco.
Brasil	Fue el primer país americano con legislación sobre alimentos funcionales, donde el Ministerio de Salud evalúa las propiedades saludables y las cepas específicas utilizadas como probióticos a través de la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA). En cuanto a la Kombucha, Brasil fue el primer país con legislación sobre Kombucha (Instrução Normativa Nº41), donde se define y clasifica este producto probiótico. El reglamento especifica la información que debe contener la etiqueta, los ingredientes obligatorios y opcionales, el valor máximo de alcohol que se puede incluir, cepas utilizadas y qué otros parámetros analíticos se deben evaluar durante la elaboración.
México	No cuenta con regulaciones específicas para la kombucha, sin embargo, sí se regulan los suplementos alimenticios, donde de acuerdo con su descripción “Productos a base de hierbas, extractos de plantas, alimentos tradicionales, frutas deshidratadas o concentradas, con o sin adición de vitaminas o minerales, que pueden presentarse en forma farmacéutica y cuyo propósito es aumentar la ingesta dietética total, complementarla o suplir alguno

de sus componentes”. La kombucha se considera dentro de esta clasificación.

Estos son regulados por la Ley General De Salud-Artículo 200 Bis a 202; 212, 215 y 216, El reglamento de control sanitario de productos y servicios, el reglamento de la Ley General de Salud en lo referente a publicidad y la Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, que establece las prácticas de higiene para el procesamiento de alimentos, bebidas y suplementos alimenticios.

(Batista et al., 2022; Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, 2016)

2.2. El árbol Ramón como material alternativo para producir Kombucha

2.2.1. Generalidades

Es un árbol perenne que puede medir más de 30 m de altura y su tronco alcanza hasta 5 m de diámetro alcanzando su madurez en un lapso aproximado de 4 años (figura 7), sus raíces son profundas y fuertes, lo que le permite soportar fenómenos naturales como huracanes (Mainers & Sánchez, 2009).

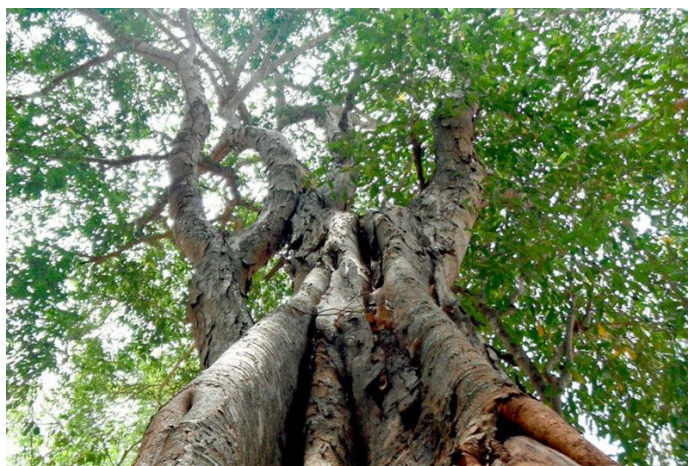


Figura 7. Árbol de Ramón (*Brosimum alicastrum*).

El árbol de Ramón es originario de América Tropical, se extiende por Centroamérica hasta Colombia, Perú y Venezuela (figura 8). Es un árbol predominante en las selvas de México con una extensión desde el sur de Tamaulipas hasta Quintana Roo y desde el sur de Sinaloa hasta Chiapas (Canto, 2015).

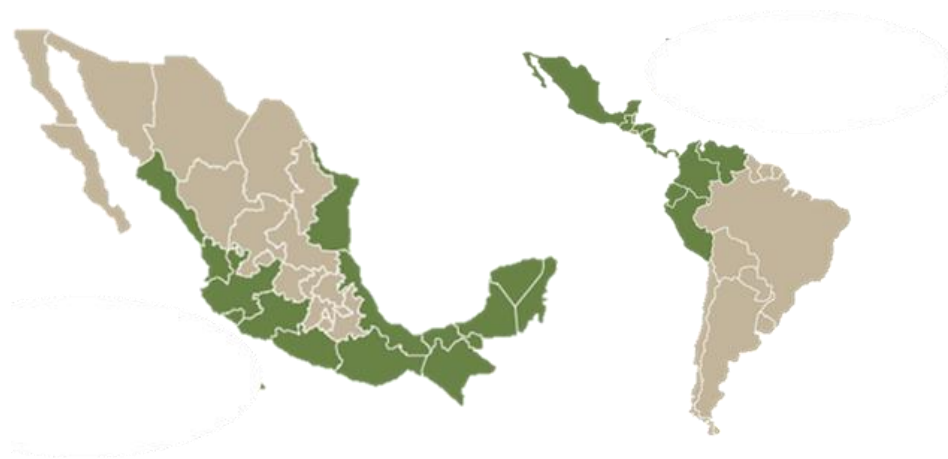


Figura 8. Extensión geográfica del ramón.

Tabla 11. Taxonomía del Ramón (*Brosimum alicastrum*).

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Rosales</i>
Familia	<i>Moraceae</i>
Género	<i>Brosimum</i>
Especie	<i>Brosimum alicastrum</i>

(Canto, 2015).

El *B. alicastrum* es considerado como una planta tropical subexplotada con promisorio valor económico debido a que todas sus partes (hojas, corteza, fruto, etc) tienen una utilidad. La madera se aprovecha en la fabricación de paneles, mangos de herramientas, muebles, combustible y el árbol como tal, es excelente para producir sombra, la semilla sirve como sustituto de café u tortillas, al látex y la corteza se le atribuyen propiedades medicinales, (Canto, 2015; Mainers & Sánchez, 2009).

2.2.2. Hojas

Las hojas son alternas, simples de peciolo cortos, miden de 4 a 18 cm de largo por 2 a 7.5 cm de ancho, se caracterizan por tener una forma de ovulo o lanza (figura 9). Tienen un color verde brillante en el haz y verde grisácea en el envés (Terrence & Sarukhán, 2005). Su follaje es uno de sus principales atributos ya que sirve de base alimenticia para las faunas originarias y criollas mexicanas (Mainers & Sánchez, 2009)



Figura 9. Hojas de Ramón (*Brosimum alicastrum*).

Las hojas son una parte esencial de toda planta, en el caso del Ramón se caracterizan por ser perennes, las hojas en los árboles pueden durar hasta un periodo de tiempo de hasta 40 meses, lo que puede tener una importancia comercial para establecer una producción de forraje y semillas para consumo humano (Chávez et al., 2023).

Tabla 12. Composición bioactiva de las hojas de Ramón (*Brosimum alicastrum*).

Flavonoides	5.19691 $\frac{\text{mg eq Rutina}}{\text{g de materia seca}}$
Flavonas	1.13089 $\frac{\text{mg eq Rutina}}{\text{g de materia seca}}$
Saponinas	445.987 $\frac{\text{mg eq diosgenina}}{\text{g de materia seca}}$
Taninos	0.248598 $\frac{\text{mg eq proantocianidina}}{\text{g de materia seca}}$
Cumarinas	0.220576 $\frac{\text{mg eq umberliferona}}{\text{g de materia seca}}$
Fenoles	0.0376245 $\frac{\text{mg eq ácido galico}}{\text{g de materia seca}}$

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar las propiedades fisicoquímicas, antioxidantes y toxicidad durante la fermentación de la Kombucha elaborada con una infusión de hojas de *Brosimum alicastrum*.

3.2. Objetivos específicos

1. Comparar el efecto del tiempo de fermentación de la kombucha elaborada con hojas de *B. alicastrum* (1.5 %) sobre algunas propiedades físico-químicas y recuento de microorganismos totales.
2. Comparar el efecto del tiempo de fermentación de la kombucha elaborada con hojas de *B. alicastrum* (1.5 %) sobre las propiedades bioactivas.
3. Determinar la toxicidad en un modelo de *Galleria mellonella* y la aceptabilidad sensorial de la kombucha después de 12 d de fermentación.

4. JUSTIFICACIÓN

La kombucha es una bebida fermentada preparada a partir de una infusión azucarada de té (negro o verde) y el uso de un consorcio microbiano denominado como “SCOBY” (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast (por sus siglas en inglés)). Desde la antigüedad, se ha considerado una bebida curativa y hoy en día goza de gran popularidad a nivel mundial. Diversos estudios reportan que esta bebida fermentada presenta efectos antimicrobianos y promotores de la salud, incluyendo propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas, antihipertensivas, antidiabéticas y hepatoprotectoras. Aunque la kombucha se elabora por medio de una fermentación aerobia de forma artesanal, es necesario comprender las implicaciones y las respuestas bioquímicas durante la fermentación de la kombucha para poder innovar la bebida con el uso de nuevos ingredientes.

Actualmente, existe información sobre el potencial bioactivo de diversas plantas locales que podrían utilizarse como ingredientes alternativos para maximizar los sabores y aromas, además de las propiedades físico-químicas y antioxidantes de la kombucha. En este contexto, las hojas de té negro se han sustituido por infusiones elaboradas a partir de hojas de plantas locales, frutos y subproductos agroindustriales. Una propuesta es utilizar la infusión de hojas de Ramón (*Brosimum alicastrum*) para mejorar su sabor y aroma, además de las propiedades físico-químicas y bioactivas de la kombucha. La literatura respalda el alto contenido de compuestos fenólicos (15.54 mg GAE/g) (Canto Pinto et al., 2024) y la capacidad antioxidante de las hojas (42.05 mM trolox/100 g) (Canto Pinto et al., 2024) de *B. alicastrum*, lo que las hace atractivas para la producción de kombucha. Sin embargo, se necesitan investigaciones que proporcionen información sobre cómo el tiempo de fermentación y el uso de hojas de Ramón afectan los cambios físico-químicos y antioxidantes en las bebidas de kombucha. Asimismo, este estudio podría añadir valor agregado mediante el uso de las hojas del árbol Ramón.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

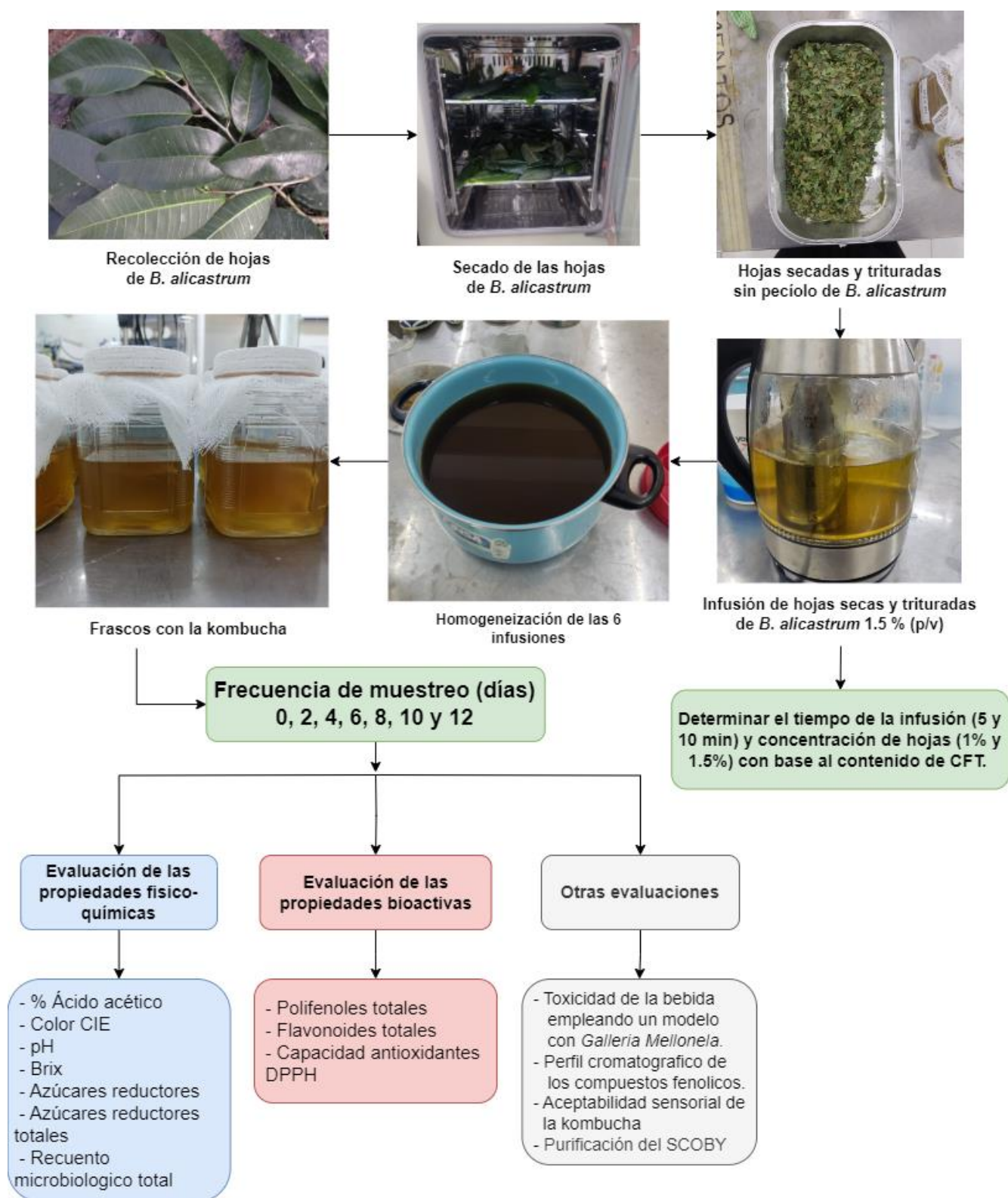


Figura 10. Estrategia general de trabajo.

5.1. Recolección y obtención de las hojas secas

Las hojas se recolectaron al azar de forma manual a partir de árboles localizados en el Instituto Tecnológico de Mérida y se colocaron en bolsas ziploc® para su traslado al laboratorio en posgrado. Las hojas se remojaron con una solución de Microdyn® en agua destilada (3.5 mL/L) durante 5 min y, luego se lavaron con sólo agua potable. Las hojas se secaron en un horno de convección ECOSHEL 9052 a 45 °C durante 48 h y finalmente, las hojas secas se trituraron manualmente (~5 mm) y se retiró el pecíolo. Las hojas trituradas se mantuvieron a -20 °C en bolsas Ziploc® hasta la preparación de la infusión.

5.2. Determinación del tiempo de infusión y de la concentración de hojas de *B. alicastrum*

Se prepararon infusiones utilizando dos concentraciones de hojas secas de *B. alicastrum*: 1 % y 1.5 % (p/v). Cada concentración fue sometida a dos tiempos de extracción (5 y 10 min). Para la preparación de cada infusión se empleó 1 L de agua purificada a 90 °C con los tiempos y porcentajes de hojas establecidos. Las infusiones resultantes fueron pasadas por un colador de acero inoxidable, del cual se tomaron ~50 mL de muestra de cada infusión y se centrifugaron a 3, 500 rpm durante 10 min.. Finalmente se evaluó el contenido de CFT (ver sección 5.5.1.) de las muestras de infusiones centrifugadas.

5.3. Tratamiento de fermentación

5.3.1. Preparación de infusión de hojas

La infusión se preparó usando 1 L de agua purificada y 15 g/L de hojas deshidratadas, lo cual fue infundido en agua a 90 °C durante 10 min. Después del tiempo de infusión, las hojas se removieron con un colador de acero inoxidable y tomando 100 mL del filtrado para el **tratamiento control sin azúcar (TCSA)**. Al resto del filtrado (previamente se mide su volumen), se adicionaron y mezclaron 100 g/L de azúcar estándar marca Great Value y luego, la infusión se enfrió a 25 °C, tomando una muestra de 100 mL para el **tratamiento control con azúcar (TCCA)**. La infusión se preparó seis veces para obtener un solo lote de 6 L y entonces, se dividieron en 300

mL en frascos de vidrio (13.5 cm de alto y 8 cm de diámetro). A cada frasco, se adicionaron 9 g de SCOBY y 30 mL de inóculo de una kombucha previamente preparada de té negro. Los frascos con la infusión fueron cubiertos con gasa para protección al ingreso de insectos y bajo oscuridad.

5.3.2. Fermentación y obtención de kombucha y SCOBY

La bebida no se pasteurizó y la fermentación se realizó a 30 °C durante 12 d (para alcanzar un pH ~ y % ácido acético~) en una incubadora Ecoshel. El volumen evaporado durante la fermentación de la kombucha se midió para efectos de realizar los cálculos de concentraciones de compuestos. Se tomaron muestras a cero, dos, cuatro, seis, ocho, diez y doce días después de la fermentación. Las bebidas kombucha se filtraron con un colador de metal y del filtrado se tomaron 100 mL (~50 mL para analizar propiedades físico-químicas y otros ~50 mL se centrifugaron a 3,500 rpm durante 10 min para analizar las propiedades bioactivas). Las muestras se almacenaron a -20°C para su análisis. **Para el estudio de la toxicidad se utilizaron las muestras que corresponden TCSA, día cero y 12 después de fermentación.**

El SCOBY obtenido de la filtración se removió, se pesó (se midió la biomasa fresca), y finalmente se almacenaron a -20°C en frascos de plástico.

5.3.3. Purificación del SCOBY

Se pesaron 2 g de SCOBY resultado de la fermentación de la Kombucha de *B. alicastrum* por cada frecuencia (2, 4, 6, 8, 10 y 12) y se lavaron dos veces con 100 mL de agua destilada bajo agitación constante a 100 rpm durante 5 min, posteriormente fueron secados con papel (pesados).

El SCOBY recuperado y lavado se colocó en un vaso precipitado que contenía 50 mL de hidróxido de sodio 1.0 M. La muestra fue tratada a 90 °C durante 1 h (con agitación magnética a 100 rpm). Después del tiempo, se retiró la celulosa de la solución de NaOH y fue lavado con agua destilada 6 veces utilizando 100 mL de agua destilada hasta que el agua de lavado alcanzó un pH= 7.0 (bajo agitación magnética lenta a 100 rpm). La muestra fue secada con papel nuevamente, colocada en una caja Petri (previamente se pesó la caja Petri vacía) y almacenada en un horno de convección

“ECOSHEL 9052” durante 48 h a 45 °C, después del tiempo se retiraron las cajas Petri, estas fueron pesadas (restando el peso de la caja petri) y se almacenaron en bolsas ziploc® pequeñas.

5.4. Métodos analíticos

5.4.1. °Brix

Los sólidos solubles totales (°Brix) se analizó utilizando un refractómetro Atago RX-5000. El refractómetro fue previamente calibrado utilizando agua destilada de acuerdo con las instrucciones del instrumento. Una alícuota de kombucha filtrada (sin centrifugar) fue colocada en el visor del equipo y se registró °Brix a 25 °C (Gómez-Díaz et al., 2012).

5.4.2. pH

El pH fue determinado usando un potenciómetro “HANNA intruments 2210” siguiendo la metodología para medir el pH de bebidas y alimentos de la norma (NMX-F-317-NORMEX-2013). Se realizó la calibración del potenciómetro con las soluciones reguladoras de pH 4 y 7. Se tomó una alícuota de la muestra filtrada y se sumergió el electrodo en la alícuota. Se registró la medición del pH hasta que la medición se mantuviera constante. El electrodo fue retirado y lavado con agua destilada. El valor del pH de la muestra se registró por duplicado.

5.4.3. Color instrumental CIELAB

Para medir el color se usó el colorímetro digital marca FRU WR10QC 8 mm Portable Digital Colorimeter. Se depositaron 26 mL de las muestras filtradas (por duplicado) en frascos cilíndricos de 2.5 cm de diámetro y 6.8 cm de alto. El visor del colorímetro se colocó sobre la muestra y se registró los valores de L*, a* y b*. El ángulo de tono (°hue) y la cromaticidad (C*) se calcularon utilizando las siguientes ecuaciones:

Ángulo de tono (°hue)

$$^{\circ}hue = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right)$$

Cromaticidad (C*)

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$

5.4.4. Porcentaje de ácido acético

Se tomaron 5 mL de Kombucha filtrada y se mezclaron con 20 mL de agua destilada en un matraz de 50 mL. La solución se aforó con agua destilada a 50 mL y se mezcló, dicha solución se dividió (25 mL) en 2 matraces de Erlenmeyer de 125 mL y se agregaron a cada matraz cinco gotas de fenolftaleína (1 % en etanol 96 %, p/v) y se realizó una titulación empleando NaOH 0.1 N hasta alcanzar un pH de 8.4 (HANNA instruments 2210) (Vargas, 2011).

El resultado se representó en % de ácido acético y se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} & \% \text{ de ácido acético} \\ &= \frac{(\text{mL gastados de NaOH } 0.1 \text{ N})(\text{Volumen aforado} = 50 \text{ mL})(N \text{ de NaOH})(\text{meq de ácido acético} = 0.06)}{(\text{volumen analizado} = 25 \text{ mL})(\text{Volumen inicial de la muestra} = 5 \text{ mL})} * 100 \end{aligned}$$

5.4.5. Azúcares reductores

Sé tomó una alícuota (~1.0 mL) por duplicado de bebida Kombucha (previamente centrifugada) y se diluyó con agua destilada de acuerdo con la (tabla 13). De la solución diluida se tomaron 0.5 mL y se mezcló en un vortéx con 0.5 mL del reactivo DNS (ácido dinitrosalicílico) en un tubo de ensayo. Los tubos con la mezcla se colocaron a 95 °C durante 10 min en un baño de agua con control de temperatura y luego, la solución se enfrió durante 20 min a 25 °C. A cada tubo con la muestra se adicionaron 5 mL de agua destilada y la solución fue agitada en vórtex, dejando reposar durante 15 min para medir la absorbancia a 540 nm (longitud de onda máxima) con el espectrofotómetro UV-VIS OPTIZEN POP usando como blanco agua destilada. Para el cálculo de la concentración de azúcar reductor se utilizó una curva de calibración preparada con diferentes concentraciones de glucosa anhidra (500 ppm a 4000 ppm).

Tabla 13. Factores de dilución de las muestras para la determinación de azúcares reductores

Muestra	Factor de dilución
Blanco sin azúcar	Sin factor de dilución
Blanco con azúcar	Sin factor de dilución
Día 0	10
Día 2	10
Día 4	10
Día 6	20
Día 8	20
Día 10	50
Día 12	200

5.4.6. Azúcares reductores totales por hidrólisis ácido de sacarosa

Una alícuota de 5 mL de bebida Kombucha (centrifugada), se mezcló con 1 mL de HCl (37 %) en un tubo de ensayo utilizando un vórtex y se sometió a calentamiento en un baño de agua a 95 °C durante 30 min. Después de enfriar (15 min en inmersión agua corriente), la solución se neutralizó (pH= 7.0) con una solución de NaOH (40 % p/v) (~ 1.0 mL). La solución resultante se filtró empleando papel filtro Whatman No. 2 y el filtrado fue centrifugado a 3,500 rpm durante 10 min. El sobrenadante se depositó en un tubo de 15 mL y fue aforado a 10 mL con agua destilada (primera dilución). Se realizó una segunda dilución (~0.5 mL) con agua destilada (Tabla14). De la segunda dilución se tomaron por duplicado 0.5 mL y se mezcló con 0.5 mL del reactivo DNS en un tubo de ensayo. Los tubos con la mezcla se sometieron a 95 °C durante 10 min en un baño de agua con control de temperatura y luego, se enfriaron durante 20 min a 25 °C (en inmersión de agua corriente). A cada tubo con muestra se adicionaron 5 mL de agua destilada, la solución fue agitada en vórtex, dejando reposar durante 15 min para medir la absorbancia a 540 nm con el espectrofotómetro UV-VIS OPTIZEN POP usando como blanco agua destilada. Para el cálculo de la concentración de azúcar reductor total se utilizó una curva de calibración preparada con diferentes concentraciones de glucosa anhidra.

Tabla 14. Factores de dilución de las muestras para la determinación de azúcares reductores totales por hidrólisis ácido de sacarosa.

Muestra	Factor de dilución (considerando el primer factor de dilución 2)
Blanco sin azúcar	Sin factor de dilución
Blanco con azúcar	80
Día 0	80
Día 2	80
Día 4	80
Día 6	80
Día 8	80
Día 10	80
Día 12	200

5.5. Evaluación de las propiedades bioactivas

5.5.1. Contenido de compuestos fenólicos totales

El contenido de CFT se determinó de acuerdo con el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton y Rossi (1965), modificado por Gonzales-Aguilar et al. (2007). Se tomó una alícuota de 50 μ L de kombucha y fueron mezclados con 3 mL de agua destilada más 250 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu (1 N) usando un vórtex. La solución se mantuvo en reposo durante 5 min a 25 °C. Posteriormente, se adicionaron 750 μ L de solución de carbonato de sodio (20 %, p/v en agua destilada) más 950 μ L de agua destilada y se mezcló en un vórtex. Tras la incubación de la mezcla durante 30 min, se midió la absorbancia de la solución a 765 nm contra un blanco de agua destilada utilizando un espectrofotómetro UV-VIS OPTIZEN POP. Los resultados fueron expresados como g equivalentes de ácido gálico (EAG) / 100 mL.

5.5.2. Contenido de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales se determinó en base al método descrito por González-Aguilar et al. (2007). Se tomó una alícuota de 1 mL de kombucha y se mezcló con 4 mL de agua destilada y 300 μ L de nitrito de sodio NaNO_2 (5 % v/v, H_2O) en un vórtex, dejando reposar durante 5 min. Posterior al tiempo de equilibrio, 300 μ L de la disolución de cloruro de aluminio AlCl_3 (10 % v/v, en metanol) se adicionó a la mezcla

(usar vórtex). Después de 1 min, se adicionaron 2,000 μ L de hidróxido de sodio NaOH 1 M y 2,400 μ L de agua destilada, la mezcla se homogeneizó en vórtex y fue leída a una absorbancia de 415 nm con un espectrofotómetro UV-Vis OPTIZEN POP. La concentración de flavonoides totales se expresó como mg equivalentes de Quercetina (EQ)/100 mL utilizando una curva de calibración con patrones de quercetina con diferentes concentraciones (entre 25 y 300 ppm).

5.5.3. Capacidad antioxidante *in vitro* DPPH•

La capacidad antioxidante de las infusiones se determinó empleando la metodología de Brand- Williams et al. (1995). La solución stock se preparó mezclando 2.5 mg de radical DPPH• con 90 ml de metanol absoluto (durante 30 min en parrilla de agitación). Se midió la absorbancia del radical, y se ajustó agregando a la solución cantidades de 15 mL de metanol hasta diluir y alcanzar la absorbancia de 0.7 ± 0.02 . Tras ajustar el blanco con metanol, una alícuota de 100 μ L de kombucha fue añadida a 3.9 mL de solución de DPPH•. La absorbancia de la muestra fue leída después de 40 min a 515 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis OPTIZEN POP. Se calculó el porcentaje de inhibición como $(\text{absorbancia control} - \text{absorbancia muestra}) / \text{absorbancia control} \times 100$ y el resultado fue expresado como mM equivalentes a trolox (ET)/100 mL, usando una curva de calibración con concentraciones entre 100 y 1000 μ M ET/mL.

5.6. Recuento microbiológico total

Se realizaron cuatro diluciones seriadas en base diez a cada una de las muestras filtradas empleando una solución (3.4 g / 50 mL, solución diluida) de fosfato de sodio monobásico (0.125 % v/v de la solución diluida) con un pH de 7.2 ± 0.1 . Se prepararon las diluciones 1×10^{-2} , 1×10^{-3} y 1×10^{-4} para todas las muestras. Las diluciones fueron sembradas por duplicado en un medio para recuento microbiano total (agar para métodos estándar, MCD LAB). Las cajas inoculadas fueron almacenadas en un horno de convección “ECOSHEL 9052” durante 48 h a 35 °C. Las cajas se seleccionaron con base en las colonias contables o sin desplazamientos en los bordes; el recuento se realizó de forma manual, marcando con un plumón cada colonia observada, los resultados fueron expresados como Log UFC/mL.

5.7. Toxicidad *in vivo* en *Galleria mellonella*

Las larvas de *G. mellonella* se adquirieron comercialmente de Cesar's Food (México). Se seleccionaron las larvas que presentaban pesos iguales o mayores a 0.150 g y con un largo mínimo de 2 cm (figura 11).



Figura 11. Larva de cera (*Galleria mellonella*).

Las larvas fueron almacenadas sin alimento a 15 °C durante 24 h antes de la prueba (Tsai et al., 2016), posteriormente se desecharon las larvas con manchas negras o muertas durante la refrigeración. Se formaron tres grupos de 10 larvas al azar y se pesaron individualmente para obtener un valor de peso promedio por tratamiento (Megaw et al., 2015). Por cada frecuencia (0 y 12) se hicieron 2 grupos de 10 larvas en cajas Petri, además de 2 cajas control negativo con sólo PBS (Búfer de solución salina con fosfato), 2 cajas para una kombucha de té negro, 2 cajas para el control sin azúcar, 2 cajas para un control positivo con Metanol y 2 cajas para un control negativo (larvas sin tratamiento).

Previo a la aplicación de los tratamientos se realizó la asepsia de las larvas con hisopo y etanol al 70 %, posteriormente se inocularon 10 µL de cada muestra en la pata trasera izquierda usando una jeringa de insulina BD Ultra-Fine 6 mm con capacidad de 0.3 mL (Ferreira De Miranda et al., 2023).



Figura 12. Referencia de la aplicación de las muestras.

Las larvas fueron incubadas a 37 °C y monitoreadas todos los días durante 5 días para verificar cambios en la pigmentación, muerte larvaria y formación de capullos para determinar el porcentaje de supervivencia (Figura 13.) (Ferreira De Miranda et al., 2023; Megaw et al., 2015). Los resultados fueron presentados como porcentaje de supervivencia.

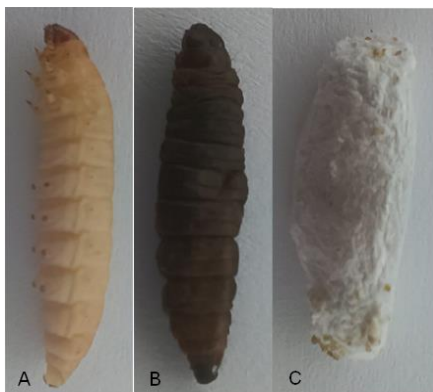


Figura 13. Estados de *G. mellonella*. A: Larva viva, B: Larva muerta (melanización total), C: Larva con formación de capullo.

5.8. Aceptabilidad sensorial del producto final de la kombucha

El análisis sensorial fue realizado con 23 consumidores no entrenados (pero que consumen alguna bebida o jugo) para evaluar una bebida kombucha con base en hojas de *B. alicastrum* (1.5 p/v) fermentado durante 12 d y de té negro como control (1.5 % p/v) fermentado durante 21 d. Cada consumidor recibió 10 mL de cada bebida fría (15 °C). Las muestras fueron codificadas con 3 dígitos, y evaluada para la aceptabilidad

general, color, dulzor, acidez y olor. Los consumidores puntuaron cada muestra utilizando una escala hedónica con variantes de borde para cada atributo que van desde 1 (fuertemente desagradable) a 9 (fuertemente agradable). Además, se les pidió indicar cuál de las dos muestras les gustaría adquirir si tuviera el precio adecuado. Los resultados se presentaron en una gráfica de barra donde se analiza por cada favor la puntuación.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Determinación del tiempo de infusión y de la concentración de hojas de *B. alicastrum*

La figura 14 muestra el contenido de CFT de infusiones de *B. alicastrum* a diferentes niveles de hojas (1 % y 1.5 %, p/v) y tiempos de infusión (5 y 10 min). A diferentes niveles de hojas en la infusión, se encontró un mayor contenido CFT (29.87 mg EAG/100 mL y 37.8 mg EAG/100 mL) después de 10 min en comparación a los 5 min de infusión (26.65 EAG/100 mL y 33.50 EAG/100 mL). En otro resultado, a mayor concentración de hojas en la infusión para ambos tiempos también se observó un aumento en el contenido CFT. Por lo tanto, la mayor concentración de CFT de la infusión se obtuvo con una concentración de 1.5 % de hojas y 10 min de infusión (37.8 mg EAG/100 mL). El incremento de temperatura independientemente de la relación sólido:disolvente puede favorecer un incremento de la solubilidad de los compuestos y la transferencia de masa, de esta forma mejorando la penetración del disolvente dentro de la matriz de la muestra (Pasadakis et al., 2020). Lo que puede ser respaldado con los resultados obtenidos por (Gullian Klanian & Sánchez Solís, 2024), realizaron infusiones de Ramón (*B. alicastrum*) con una temperatura de 100 °C extendiendo el tiempo de infusión (1, 5, 10, 15, 20, and 25 min) evaluando los CFT, observaron que el aumento de los CFT está relacionado con el tiempo de infusión y la temperatura.

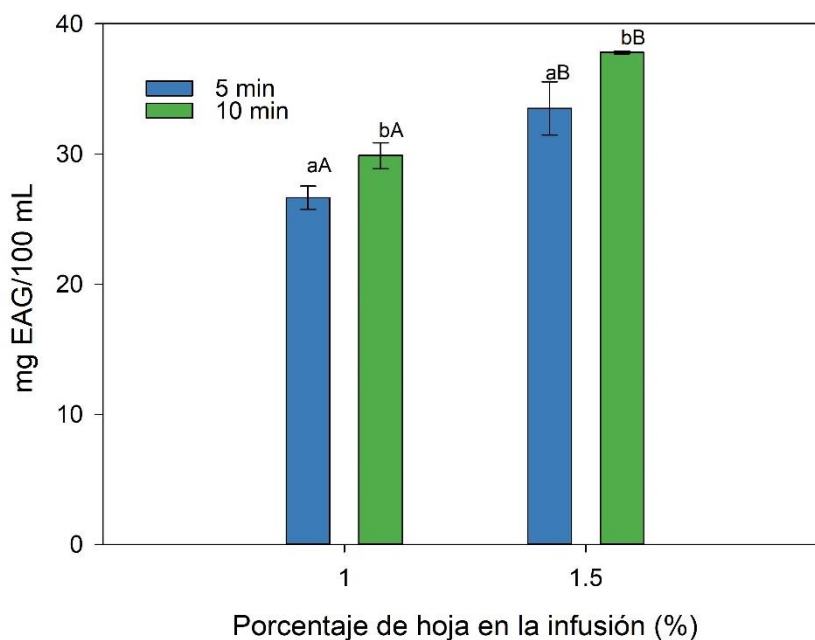


Figura 14. Contenido de CFT de infusión a diferentes porcentajes de hoja *B. alicastrum* y tiempo de infusión

6.2. Comportamiento del volumen de la kombucha durante la fermentación

Durante la fermentación, el volumen de bebida kombucha disminuyó (~6 veces) para todos los tratamientos debido a la pérdida de agua durante la fermentación a 30°C (figura 15). La información de la disminución del volumen fue usada para efectos de cálculos para la expresión de los resultados. Desde un punto de vista de energético, las fuerzas intermoleculares producen una barrera de potencial la cual retiene en su lugar a las moléculas, con una temperatura constante (30 °C) algunas de estas moléculas vencen las fuerzas atractivas que existen en el estado líquido, lo que ocasiona la perdida constante del volumen durante la fermentación (Manzur & Cardoso, 2015).

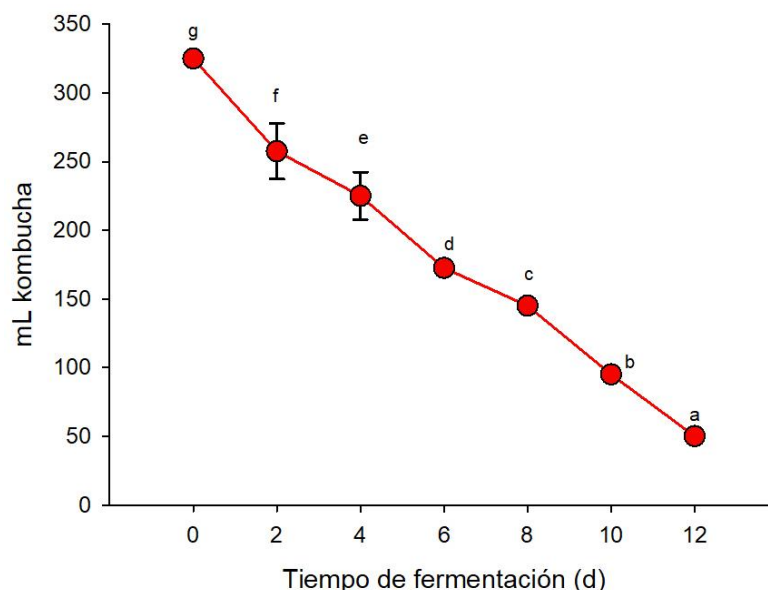


Figura 15. Variación del volumen de kombucha durante la fermentación a 30 °C.

6.3. Cambios en las propiedades fisicoquímicas durante la fermentación

Se encontró diferencias significativas en los valores de pH de kombucha durante 12 d de fermentación a 30 °C (figura 16). El valor inicial de pH de la bebida fue de 3.45 y se exhibió una disminución significativa a partir de 4 d hasta alcanzar un valor de pH=2.46 (12 d). La disminución del pH es ocasionada por el metabolismo de bacterias del género *Komagataeibacter* y *Gluconacetobacter* que oxidan el etanol producido por las levaduras y lo transforman en ácido acético, además de otros ácidos orgánicos producidos a partir de glucosa y enzima glucosa oxidasa (Laavanya et al., 2021).

La disminución reportada en este trabajo concuerda con los resultados obtenidos por (Loor García, 2022) que, empleó guanábana, guasaya y granos de café como fuentes de nitrógeno alternativas para elaborar kombucha, el pH promedio inició con ~4.54 y disminuyó hasta ~3.1 (11 d). A su vez, el trabajo reportado por (Kayisoglu & Coskun, 2021) produjo diferentes kombuchas a base de Menta, Tilio y Salvia, demostrando una disminución de 6.7 (0 d) a 3.1.(14 d) del pH demostrando que la disminución del pH es independientemente del tiempo y temperatura de fermentación, el aumento está relacionado con el metabolismo de los microorganismos presentes durante la fermentación

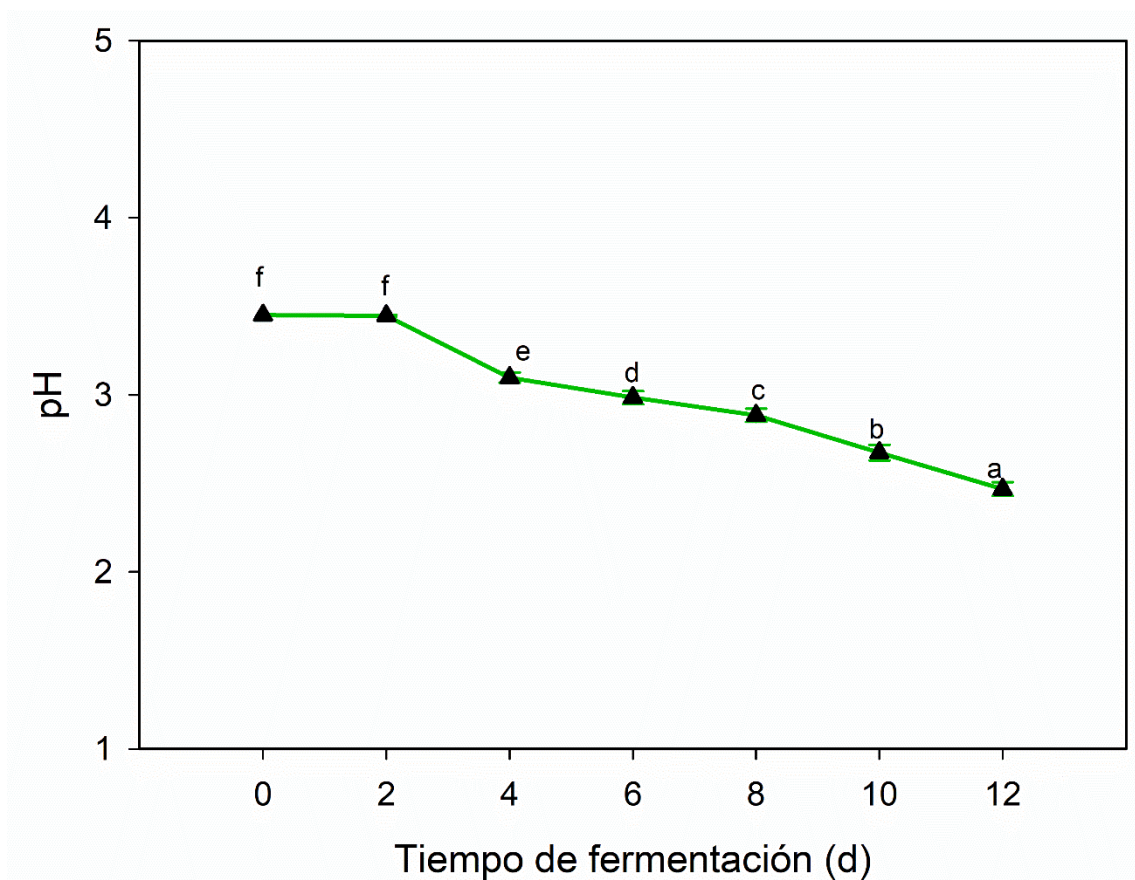


Figura 16. Cambios en los valores de pH de Kombucha durante la fermentación a 30 °C.

En otro resultado, se reporta la variación de los valores de °Brix durante la fermentación de la kombucha (Figura 17). Los valores de °Brix disminuyeron significativamente de 0 (9.25 %) a 12 d (5.56 %) de fermentación de la kombucha. Esta disminución se puede atribuir a las actividades metabólicas de levaduras presentes en la kombucha, la sacarosa se hidroliza en glucosa y fructosa por acción de la enzima invertasa, estos azúcares son empleados para obtener etanol y dióxido de carbono, lo que ocasiona la disminución de los °Brix (Laavanya et al., 2021), además las condiciones de temperatura pueden ocasionar una evaporación constante de agua y otros compuestos volátiles. Trabajos como el de (Llor García, 2022) concuerdan con los resultados obtenidos, observaron disminuciones de los °Brix del 0 d (5.6 %) hasta 11 d (4.1 %) empleando sustratos alternativos (guanábana, guasaya y granos de café) a temperatura ambiente ~20 °C.

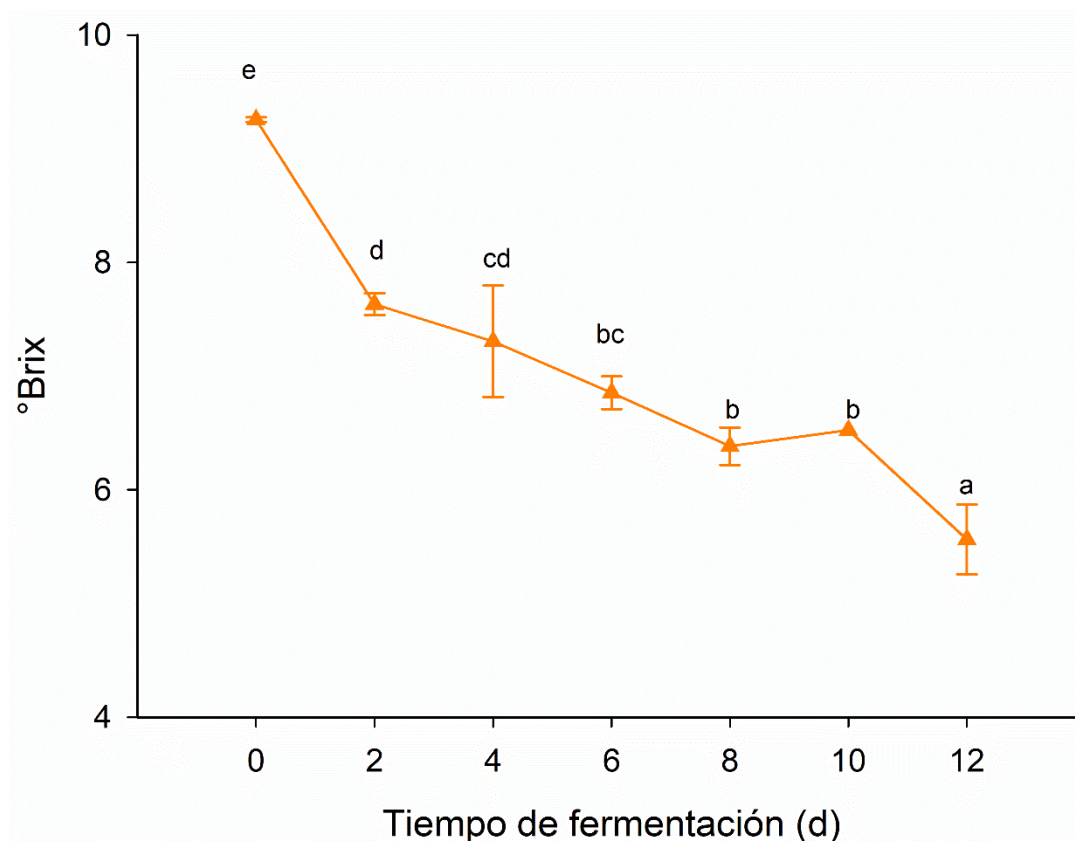


Figura 17. Variación de los valores de °Brix de la kombucha durante la fermentación a 30 °C.

La variación del porcentaje de ácido acético en la bebida de kombucha durante la fermentación se puede apreciar en la figura 18. El porcentaje de ácido acético mostró un aumento significativo a lo largo de los 12 d de fermentación. El porcentaje de ácido acético fue de 0.92 %, siendo 4.5 veces mayor que al inicio de la fermentación (0.2 %). El aumento del % ácido acético indica una estabilización en la producción de ácido acético hacia las etapas finales de la fermentación, lo que podría estar asociado con la actividad metabólica de las bacterias ácido acéticas (*Komagataeibacter* y *Gluconacetobacter*) que oxidan el etanol producido por las levaduras, mediante un proceso anaeróbico, además se producen otros ácidos (glucónico y glucurónico) consumiendo la glucosa y fructosa (Coelho et al., 2020). El aumento del % ácido acético concuerda con los resultados obtenidos usando hojas de brislete de la india (*Caesalpinia sappan*) como fuente de nitrógeno, llegando a un % final de 0.93 % (13 d) (Sinamo et al., 2022), similar a los valores alcanzados en este estudio.

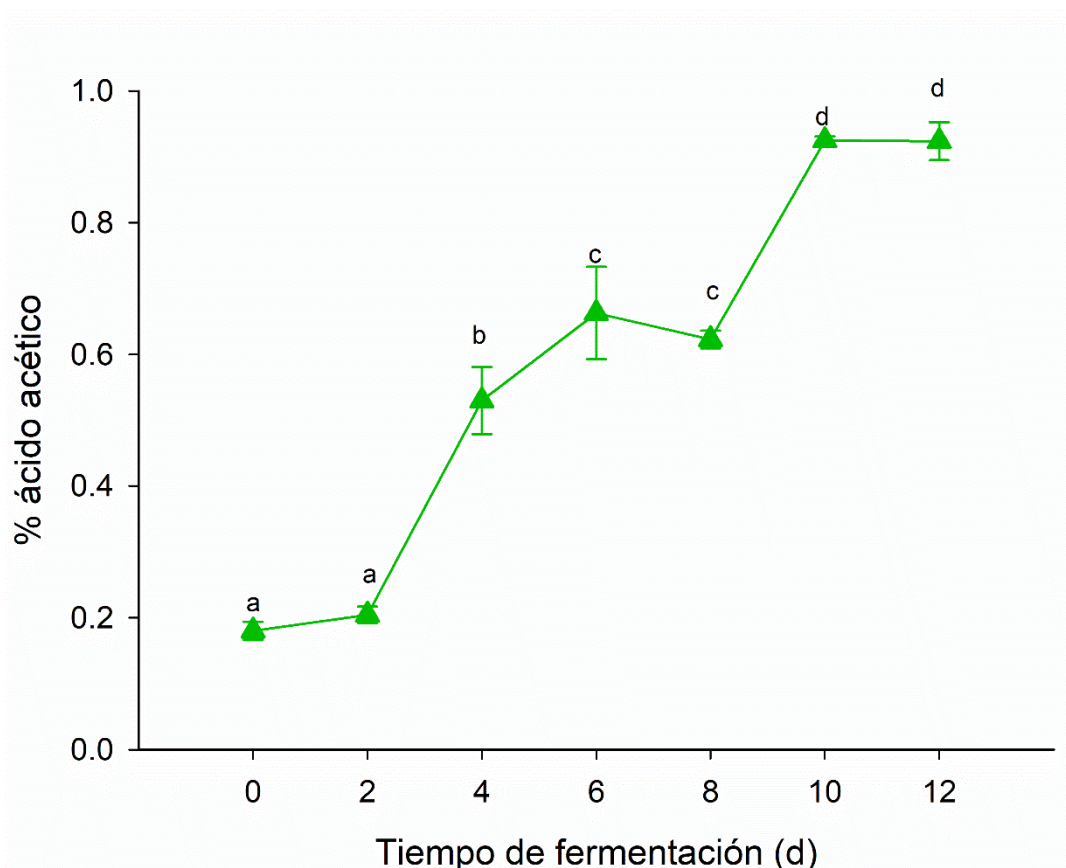


Figura 18. Variación del porcentaje de ácido acético de la kombucha durante la fermentación a 30 °C.

La figura 19 exhibió los cambios en el color CIE durante la fermentación de kombucha de Ramón. El color rojo a^* (valores entre 11 y 11.1) y la luminosidad (valores entre 33.2 y 34.0) de la bebida resultaron con poca variación durante la fermentación, sin diferencia significativa entre el inicio y el término de la fermentación (figura 19 A y C).

Al comparar los tiempos de fermentación, después de 6 d se observó un aumento significativo de los parámetros b^* (18.46), C^* (21.1) y el ángulo de tono (59.12) de la kombucha.

Considerando los parámetros de color, se pudo observar que, al finalizar la fermentación, la bebida obtuvo un color más amarillo al comparar con el inicio de la fermentación.

Los cambios de color están asociados con los compuestos fenólicos que se extraen del sustrato durante la infusión, el color café inicial de la kombucha es explicado por medio de la fermentación u oxidación de la enzima polifenol oxidasa (Bishop et al.,

2022). Un estudio informa que el cambio significativo del color durante la fermentación de la kombucha puede estar relacionado con el aumento progresivo de flavonoides y la disminución del pH, observando que a medida que disminuye el pH, la luminosidad (L^*), el enrojecimiento y el amarilleo (a^* y b^*) aumentaban y que, además los cambios de color no reducen la actividad antioxidante de la bebida (Tran et al., 2020; Wang et al., 2022)

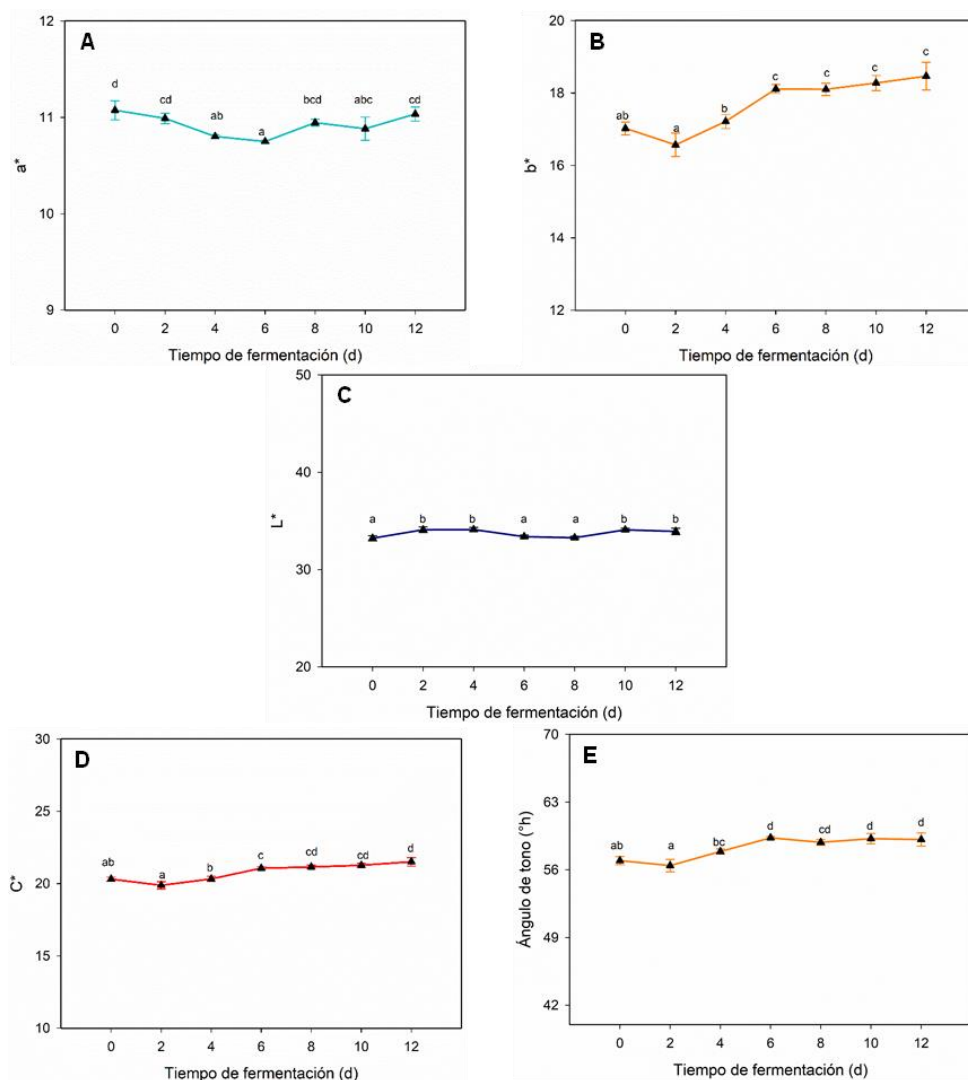


Figura 19. Variación de los parámetros de CIE $L^*a^*b^*$ a través del tiempo de fermentación de la kombucha a base de *Ramón Brosimum alicastrum*.

Durante los 12 días de fermentación, los azúcares reductores AR mostraron un aumento, que se puede observar en la figura 20. Se encontró un aumento significativo de AR a partir del 4 d (10.92 mg/mL) presentando un aumento pronunciado al final de

la fermentación (43.74 mg/mL). Contrario al aumento, el contenido de los azúcares reductores totales experimentó una disminución significativa (figura 21), desde el 0 d (75.78 mg/mL) y hasta el final de la fermentación (15.84 mg/mL). En otro estudio también se encontró una disminución de ~4 veces (respecto al día 0) el contenido de azúcares reductores totales después de 12 d de fermentación de infusión de cáscara de piña (*Ananas comosus*):té negro (*Camellia sinensis*) proporción 60:40 v/v) (Kitwetcharoen et al., 2025). A su vez, el estudio realizado con yerba mate (1.2 % p/v) como fuente de nitrógeno confirma el comportamiento observado, Lopes et al.(2021) mostraron un aumento en el contenido de azúcares reductores (9 mg/mL a 14 mg/mL) y una disminución en el contenido de azúcares reductores totales (45 mg/mL a 17 mg/mL) durante la fermentación de Kombucha durante 12 d a 30 °C

El aumento de los azúcares reductores y la disminución de la sacarosa es explicado mediante la actividad metabólica de las levaduras, que descomponen los azúcares complejos (sacarosa) en azúcares simples (glucosa y fructosa) por medio de una hidrólisis catalizada por la enzima invertasa (Mousavi et al., 2020; Nyhan et al., 2022; Villarreal-Soto et al., 2018)

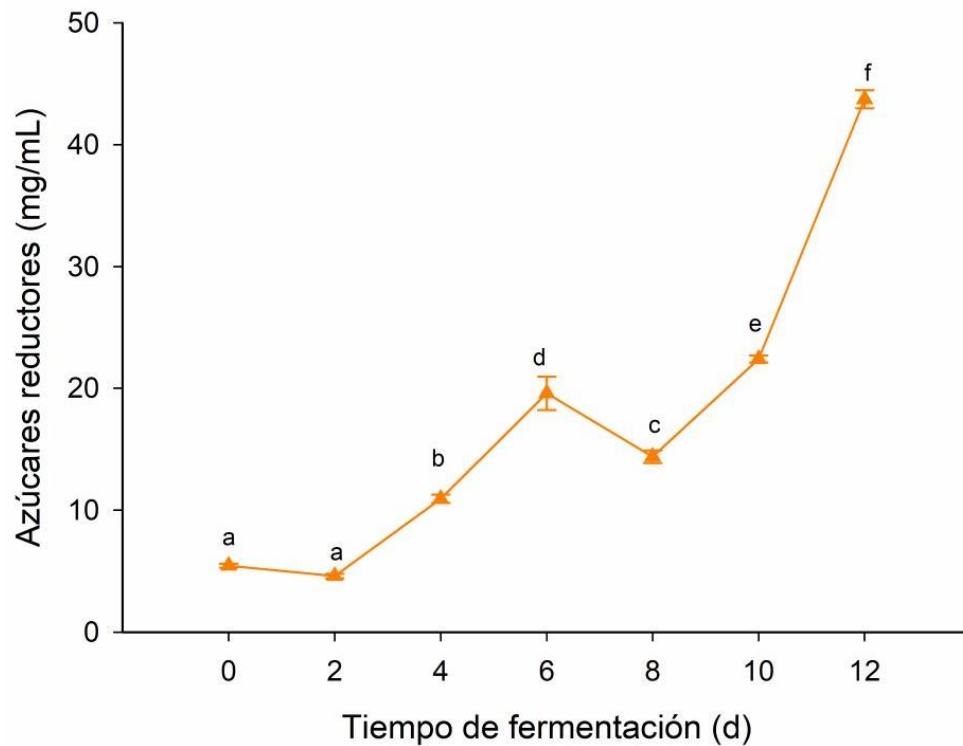


Figura 20. Variación de los azúcares reductores durante la fermentación de la kombucha a 30 °C.

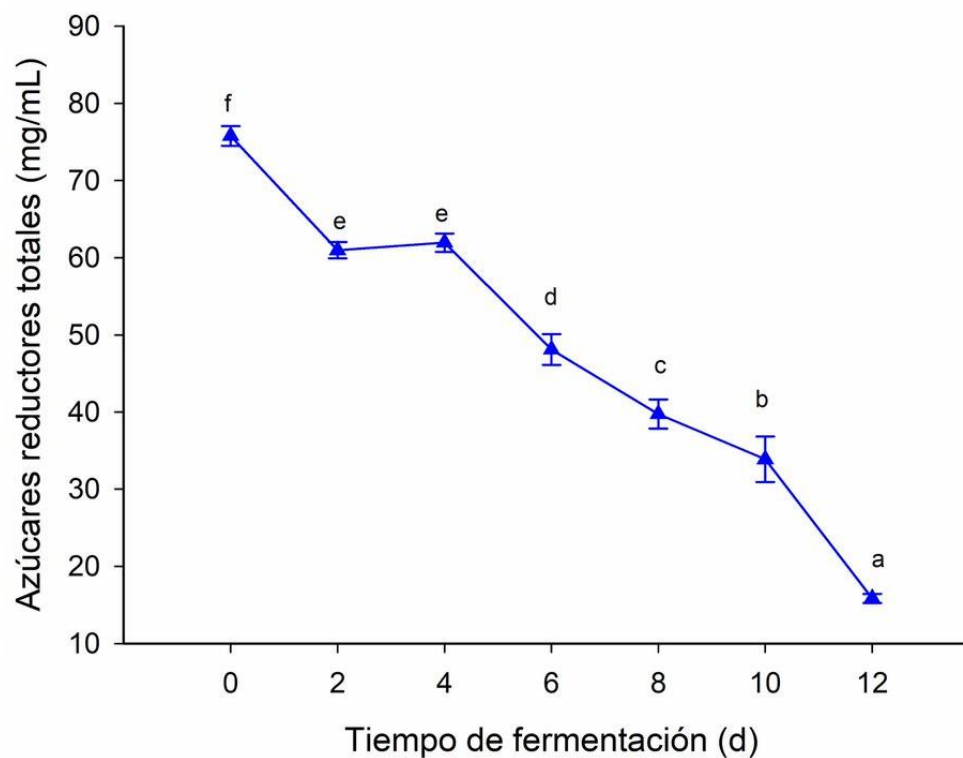


Figura 21. Variación de los azúcares reductores totales durante la fermentación de la kombucha a 30 °C.

6.4. Recuento microbiológico

El comportamiento microbiológico durante la fermentación de la kombucha de Ramón se muestra en la figura 22. Se observó presencia de microorganismos desde el 0 d (4 Log UFC/mL), que aumentó significativamente al 2 d (6 Log UFC/mL) y se mantuvo estable hasta el final de la fermentación con un ligero descenso después de 12 d (5.2 Log UFC/mL). Situación similar se encontró en un estudio realizado por (Aung & Eun, 2022). Estos autores observaron una actividad microbiológica desde el 0 d (1.5 UFC/mL), aumento que se estabilizó los siguientes días hasta el 12 d (1.25 CFU/mL) empleando un extracto de alga (*Porphyra dentata*) como fuente de nitrógeno (20 mL/L).

El crecimiento inicial de los microorganismos puede explicarse debido a la abundancia de nutrientes en el medio, como la sacarosa que es convertida rápidamente en azúcares reductores por levaduras, mientras que la estabilización posterior podrían atribuirse a factores como la competencia microbiana, la acumulación de metabolitos secundarios (como el ácido acético), y la disminución de la disponibilidad de sustratos, lo que limita el crecimiento en las etapas intermedias y finales de la fermentación (Mousavi et al., 2020; Sinamo et al., 2022).

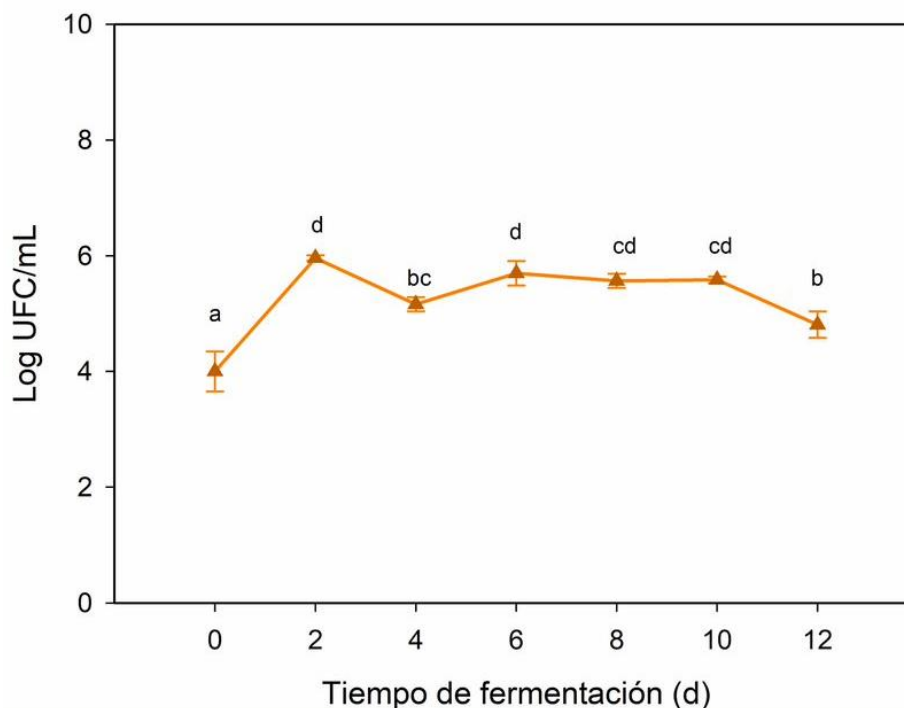


Figura 22. Variación de los microorganismos presentes en la kombucha durante la fermentación a 30 °C.

6.5. Cambio de las propiedades bioactivas

Los valores del contenido de CFT se mantuvieron relativamente estables durante la fermentación de la kombucha alcanzando un valor promedio al final de la fermentación de 24.34 mg EAG/100 mL (Figura 23, **B**). Sin embargo, los valores observados sin considerar la pérdida de volumen durante la fermentación demostraron un aumento significativo desde el 0 d (23.38), alcanzando un valor final de 141.14 mg EAG/100 mL (figura 23, **A**). El comportamiento estable puede explicarse mediante el sustrato usado, las levaduras y bacterias del SCOBY puede romper enlaces en la matriz vegetal, liberando CF que antes estaban unidos a proteínas o carbohidratos, además de transformar flavonoides y taninos en formas más simples y solubles (Sinamo et al., 2022). Además, la degradación oxidativa por la exposición al oxígeno, reacciones con ácidos orgánicos y proteínas en el medio y de la posible retención en los compuestos fenólicos en el SCOBY pueden ocasionar una disminución de CFT, en las últimas etapas (Coelho et al., 2020; De Miranda et al., 2022).

El estudio de una bebida kombucha utilizando hojas secas de oliva (*Olea europaea*) con una concentración de 1.2 % (p/v) demostraron un comportamiento comparable al obtenido en este trabajo, se observó una estabilidad durante la fermentación sin grandes cambios entre el 0 d y 12 d (38.2 mg GAE/100 mL a 36.8 mg GAE/100 mL) (Lazzaroli et al., 2023).

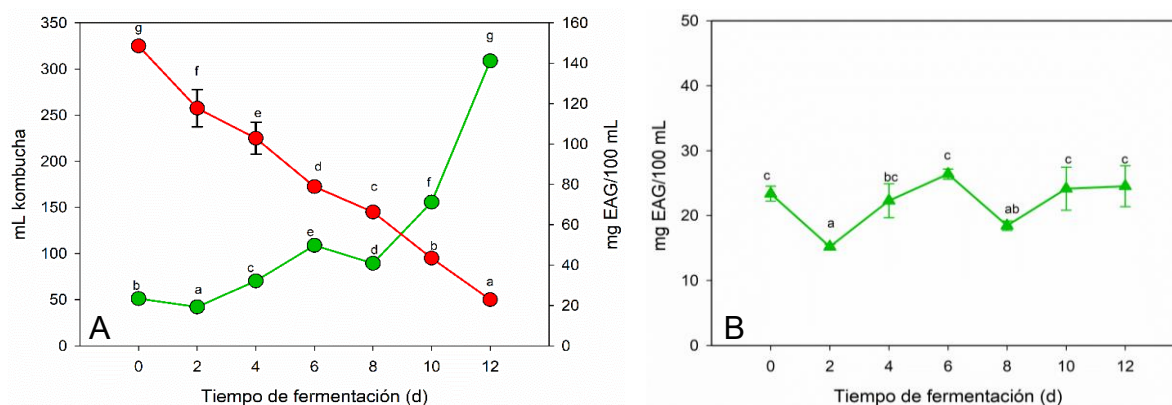


Figura 23. variación de CFT durante la fermentación de la kombucha a 30 °C: **A**, variación de CFT sin considerar la disminución del volumen (producto sin aforar). **B**, variación de CFT considerando la disminución del volumen (producto aforado).

La variación general de los flavonoides demostró aumentos significativos en ambos casos (volumen sin y con aforado) (figura 24). Se observó un aumento desde el 0 d (11.83 mg EQ/100 mL), alcanzando un valor final de 22.16 mg EQ/100 mL en los 12 d (figura 24 **B**); sin embargo, la concentración de los flavonoides aumentó ~6.5 para el 12 d (144.05 mg EQ/100 mL) cuando no se considera el volumen perdido a causa de la temperatura de fermentación (30 °C), (figura 24 **A**). La actividad enzimática de la kombucha puede descomponer componentes del té, liberando flavonoides que estaban previamente ligados o inaccesibles, lo que podría aumentar su concentración en la bebida (De Miranda et al., 2022).

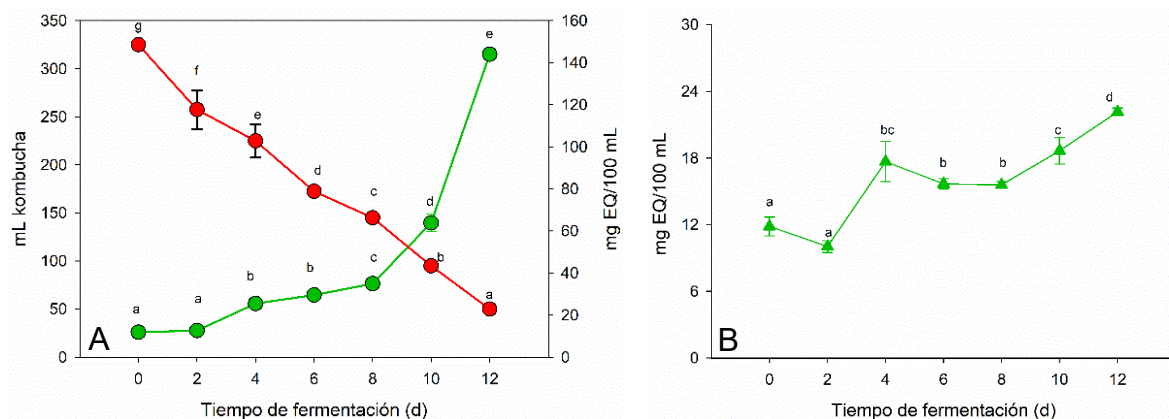


Figura 24. Variación de los flavonoides totales durante la fermentación de la kombucha a 30 °C: **A**, variación de los FT sin considerar la disminución del volumen. **B**, variación de los FT considerando la disminución del volumen.

La figura 25 exhibe el aumento de la capacidad antioxidante analizado con el ensayo DPPH durante la fermentación de la kombucha. Se exhibió una capacidad antioxidante desde el 0 d (1.72 mM Trolox/100 mL), que aumento hasta 2.22 mM Trolox/100 mL considerando el volumen perdido (figura 25 **B**); sin embargo, cuando no se considera el volumen evaporado la capacidad antioxidante alcanza 14.4 mM Trolox/100 mL a los 12 d (figura 25 **A**). Durante la fermentación de la kombucha se da la conversión de compuestos fenolicos en moléculas de menor peso molecular y con mayor capacidad antioxidante, como la conversión de epicatequinas y catequinas en ácido gálico y otros derivados bioactivos (Mousavi et al., 2020).

El aumento se apoya de la idea de la conversión de compuestos fenólicos, ya que son transformados en moléculas de menor peso molecular con mayor capacidad antioxidante como la conversión de epicatequinas y catequinas en ácido gálico y otros derivados bioactivos. También, se reporta que la disminución del pH ayuda a estabilizar los compuestos fenólicos y prevenir su degradación oxidativa (Mousavi et al., 2020; Nyhan et al., 2022).

De igual manera, usando un sustrato alternativo como las hojas secas de oliva (*Olea europaea*) demostraron un aumento similar al reportado en este trabajo, llegándose a reportar una capacidad antioxidante final el 12 d de 3.4 mM Trolox/100 mL, aumentando 2.5 veces comparado con el 0 d.

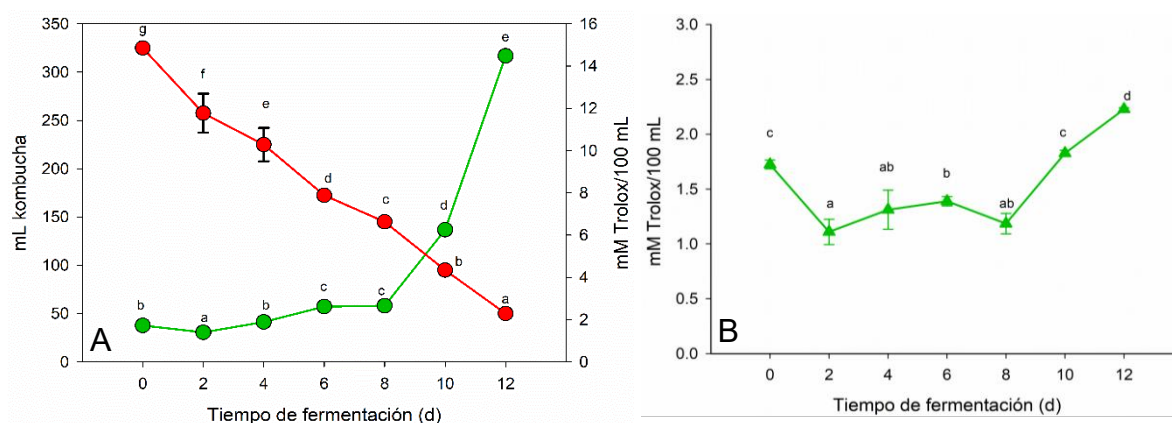


Figura 25. Variación de la capacidad antioxidante DPPH• a lo largo de la fermentación de la kombucha a 30 °C: **A**, variación sin considerar la disminución del volumen. **B**, variación considerando la disminución del volumen.

6.6. Toxicidad *in vivo* en *Galleria mellonella*

Para la evaluación de toxicidad *in vivo* se usaron las muestras centrifugadas que corresponden TCSA, día cero y 12 después de fermentación, además de un positivo (Metanol absoluto), una solución salina como negativo (PBS) y un control sin ningún tratamiento. Los controles negativos, control sin azúcar y el control sin ningún tratamiento demostró una supervivencia del 100 %, mientras que el control positivo mostró 0 % de supervivencia a partir del día 1 (Figura 26 A). A su vez, los tratamientos con kombucha de Ramón (0 d y 12 d) observados en la gráfica 26 B presentaron una supervivencia del 100 % al final del estudio, caso contrario al tratamiento con té negro (80 % supervivencia).

La supervivencia a los tratamientos con kombucha de ramón (0 y 12 d) demuestran que su consumo no representaría un riesgo para el consumidor. Sin embargo, el consumo diario no debería exceder una taza por día (250 mL) debido al nivel de acidez presente en este tipo de bebida (Batista et al., 2022).

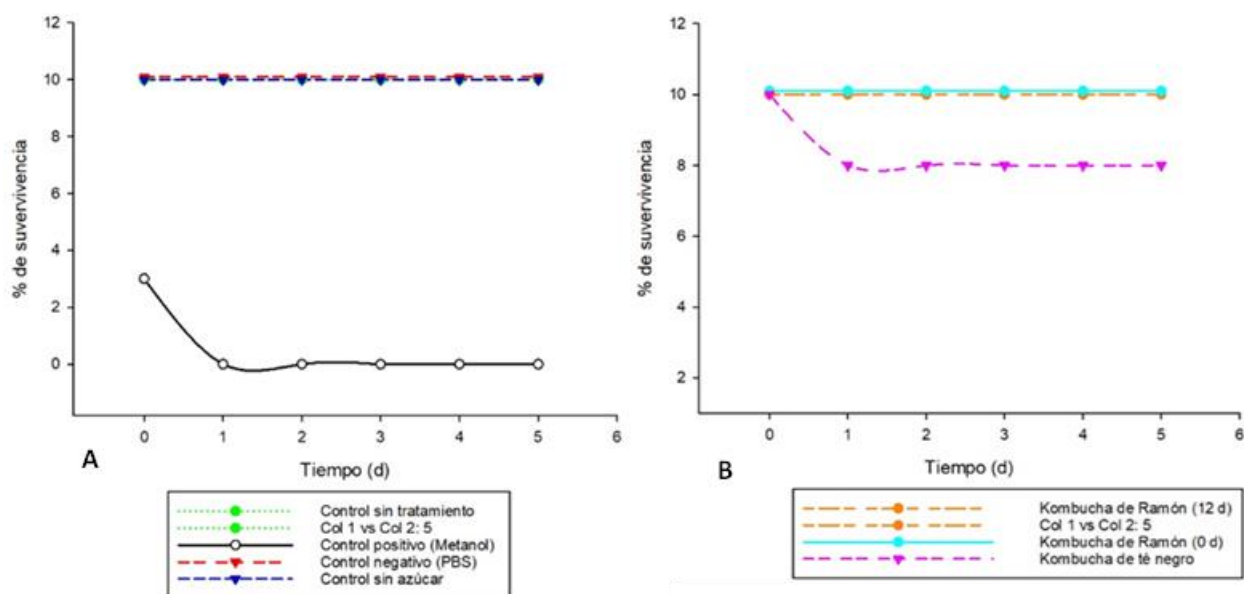


Figura 26. Graficas del porcentaje de supervivencia de larvas de *Galleria mellonella* expuestas a diferentes tratamientos de kombucha.

6.7. Aceptabilidad sensorial del producto final de la kombucha

Se evaluaron dos tipos de kombucha para determinar su aceptabilidad sensorial: una kombucha de 12 d de fermentación con base en Ramón con un porcentaje de acidez de 1.02 %, y una kombucha de 21 d de fermentación con base en té negro, con un 3.56 % de acidez. Ambas fueron comparadas en cuanto a color, dulzor, acidez, olor y aceptabilidad general.

La kombucha de Ramón obtuvo mayor puntuación ($p \leq 0.05$) sensorial en dulzor, acidez, olor y aceptabilidad general en comparación a las características de la kombucha de té negro (figura 27). En cuanto al color, no se observaron diferencias significativas entre ambas bebidas. De los 23 participantes en la evaluación, 19 indicaron que estarían dispuestos a comprar una kombucha de Ramón con las características descritas, prefiriéndola por encima de la kombucha de té negro tradicional. El sabor de la kombucha es una mezcla compuesta de azúcares residuales durante la fermentación, además de diversos ácidos (acético, glucónico, glucurónico, etc.) y diversos compuestos fenólicos (Júnior et al., 2022).

En un estudio sensorial se pusieron a prueba diversas kombuchas a partir de mezclas de diferentes infusiones: Jamaica con manzanilla y romero (JMR), hierbabuena con zacate de limón y hojasén (HLH), y té negro (TN). Se fermentaron durante 12 d a 30 °C con un pH aproximado de 2.6, se evaluó color, olor, sabor, acidez y aceptabilidad general. Las kombucha con fermentos alternativos (JMR y HLH) demostraron una aceptabilidad general mayor al del TN, lo que demuestra el interés por nuevos sabores a los tradicionales (Vázquez, 2021).

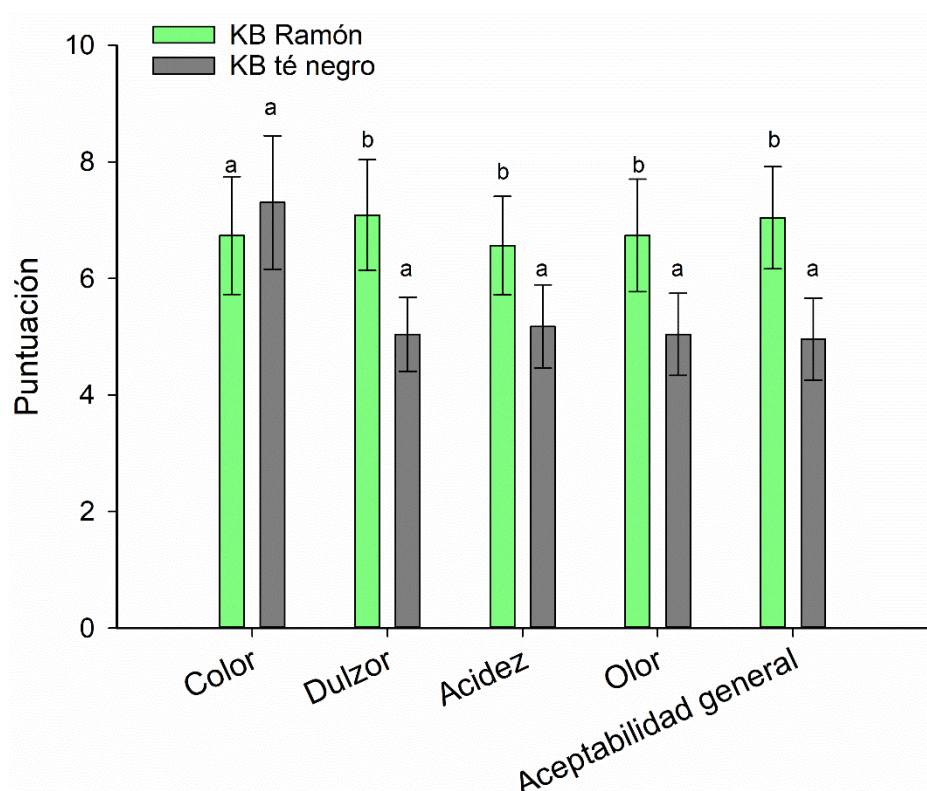


Figura 27. Comparación de la aceptabilidad sensorial de kombucha de Ramón y té negro.

7. CONCLUSIONES

La fermentación de la kombucha de Ramón (*Brosimum alicastrum*) demostró cambios significativos en sus propiedades fisicoquímicas, bioactivas y sensoriales. Se observaron aumentos del % de acidez, azúcares reductores, compuestos fenólicos totales (CFT), flavonoides totales (FT) y capacidad antioxidante DPPH. Mientras que, el pH, °Brix y azúcares reductores totales disminuyeron. Estos cambios están relacionados con la actividad microbiológica observada a lo largo del desarrollo de la kombucha.

Al final de la fermentación el tono amarillo de la kombucha aumentó, dando un tono amarillo claro. Por otro lado, la prueba de toxicidad in vivo comprobó que la kombucha de ramón no representa un riesgo para la salud y que por ende puede ser consumida de forma segura.

Sensorialmente, la kombucha demostró una aceptabilidad general mayor comparada con una kombucha de té negro. Por lo que, esta bebida representa una alternativa innovadora con beneficios funcionales y un perfil atractivo, destacando la importancia de controlar el tiempo de fermentación para controlar sus características.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo Ruiz, M., Albino García, D., Montoya Ortega, J., Ramírez Manríquez, H., Rivas García, I., & Solorzano Olivares, R. (2023). *Análisis bromatológicos de bebidas fermentadas con alto contenido de probióticos a base de kombucha*. 21.
- Antolak, H., Piechota, D., & Kucharska, A. (2021). Kombucha Tea—A Double Power of Bioactive Compounds from Tea and Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts (SCOBY). *Antioxidants*, 10(10), 1541. <https://doi.org/10.3390/antiox10101541>
- Aung, T., & Eun, J.-B. (2022). Impact of time and temperature on the physicochemical, microbiological, and nutraceutical properties of laver kombucha (*Porphyra dentata*) during fermentation. *LWT*, 154, 112643. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112643>
- Ayed, L., Ben Abid, S., & Hamdi, M. (2017). Development of a beverage from red grape juice fermented with the Kombucha consortium. *Annals of Microbiology*, 67(1), 111-121. <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1242-2>
- Barbosa, E. L., Netto, M. C., Bendel Junior, L., De Moura, L. F., Brasil, G. A., Bertolazi, A. A., De Lima, E. M., & Vasconcelos, C. M. (2022). Kombucha fermentation in blueberry (*Vaccinium myrtillus*) beverage and its in vivo gastroprotective effect: Preliminary study. *Future Foods*, 5, 100129. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100129>
- Baschali, A., Tsakalidou, E., Kyriacou, A., Karavasiloglou, N., & Matalas, A.-L. (2017). Traditional low-alcoholic and non-alcoholic fermented beverages consumed in

-
-
- European countries: A neglected food group. *Nutrition Research Reviews*, 30(1), 1-24. <https://doi.org/10.1017/S0954422416000202>
- Batista, P., Penas, M. R., Pintado, M., & Oliveira-Silva, P. (2022). Kombucha: Perceptions and Future Prospects. *Foods*, 11(13), 1977. <https://doi.org/10.3390/foods11131977>
- Bishop, P., Pitts, E. R., Budner, D., & Thompson-Witrick, K. A. (2022). Chemical Composition of Kombucha. *Beverages*, 8(3), 45. <https://doi.org/10.3390/beverages8030045>
- Caceres, J., Caycedo, L., & Trujillo, D. (2021). *Efecto bactericida del ácido acético presente en el vinagre, una alternativa a desinfectantes sintéticos o químicos. Revisión sistemática*. 11(1), 440-451.
- Canto Pinto, J. C., Pat Mareno, N. I., Moo-Huchin, V. M., Pérez-Pacheco, E., Chay-Canul, A. J., Estrada-León, R. J., Sauri-Duch, E., & Rios-Soberanis, C. R. (2024). Comparison of proximate composition, phytochemical contents, antioxidant capacity and polyphenols in brosimum alicastrum leaf, fruit and seed. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 34(4), 875-885. <https://doi.org/10.36899/JAPS.2024.4.0772>
- Canto, R. E. A. (2015). *Análisis de la diversidad gnética del ramón (Brosimum alicastrum) en los estados de Yucatán y Campeche*. <https://vdocuments.mx/download/instituto-tecnolgico-de-anlisis-de-la-diversidad-gentica-del-ramn-brosimum.html>
- Castro, M. (2019). *POLIFENOLES: COMPUESTOS BIOACTIVOS CON EFECTOS BENÉFICOS EN LA PREVENCIÓN DE DIABETES TIPO 2*. 1(3).

-
-
- Chávez, R., Soto, R., Vergara, S., Martínez, N., Tucuch, C., & Larqué, A. (2023). *Brosimum alicastrum: Sexado, producción de flores, semillas y reguladores de crecimiento*. 14(4).
- Coelho, R. M. D., Almeida, A. L. D., Amaral, R. Q. G. D., Mota, R. N. D., & Sousa, P. H. M. D. (2020). Kombucha: Review. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 22, 100272. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100272>
- Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. (2016). *Marco jurídico para suplementos alimenticios*. <https://www.gob.mx/cofepris/acciones-y-programas/marco-juridico-para-suplementos-alimenticios>
- De Miranda, J. F., Ruiz, L. F., Silva, C. B., Uekane, T. M., Silva, K. A., Gonzalez, A. G. M., Fernandes, F. F., & Lima, A. R. (2022). Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. *Journal of Food Science*, 87(2), 503-527. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16029>
- De Oliveira, P. V., Da Silva Júnior, A. H., De Oliveira, C. R. S., Assumpção, C. F., & Ogeda, C. H. (2023). Kombucha benefits, risks and regulatory frameworks: A review. *Food Chemistry Advances*, 2, 100288. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100288>
- Doğan, C., & Doğan, N. (2023). Kombucha Beverage: Comparative Study Based on Bioactive Properties and Antimicrobial Potentials of Different Plant Infusion. *Journal of Advanced Research in Natural and Applied Sciences*, 9(1), 15-27. <https://doi.org/10.28979/jarnas.1140573>
- Ferreira De Miranda, J., Martins Pereira Belo, G., Silva De Lima, L., Alencar Silva, K., Matsue Uekane, T., Gonçalves Martins Gonzalez, A., Naciuk Castelo Branco,

-
-
- V., Souza Pitangui, N., Freitas Fernandes, F., & Ribeiro Lima, A. (2023). Arabic coffee infusion based kombucha: Characterization and biological activity during fermentation, and in vivo toxicity. *Food Chemistry*, 412, 135556. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135556>
- Gaggìa, F., Baffoni, L., Galiano, M., Nielsen, D., Jakobsen, R., Castro-Mejía, J., Bosi, S., Truzzi, F., Musumeci, F., Dinelli, G., & Di Gioia, D. (2018). Kombucha Beverage from Green, Black and Rooibos Teas: A Comparative Study Looking at Microbiology, Chemistry and Antioxidant Activity. *Nutrients*, 11(1), 1. <https://doi.org/10.3390/nu11010001>
- Gamboa-Gómez, C. I., González-Laredo, R. F., Instituto Tecnológico de Durango, Felipe Pescador 1830 Ote., 34080 Durango, Mexico, Gallegos-Infante, J. A., Instituto Tecnológico de Durango, Felipe Pescador 1830 Ote., 34080 Durango, Mexico, Larrosa Pérez, M. D. M., Nuria E. Rocha-Guzmán, Moreno-Jiménez, M. R., Instituto Tecnológico de Durango, Felipe Pescador 1830 Ote., 34080 Durango, Mexico, Flores-Rueda, A. G., Instituto Tecnológico de Durango, Felipe Pescador 1830 Ote., 34080 Durango, Mexico, Rocha-Guzmán, N. E., & Nuria E. Rocha-Guzmán. (2016). Antioxidant and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity of Eucalyptus camaldulensis and Litsea glaucescens Infusions Fermented with Kombucha Consortium. *Food Technology and Biotechnology*, 54(3). <https://doi.org/10.17113/ftb.54.03.16.4622>
- Gómez-Díaz, D., Navaza, J. M., & Quintáns-Riveiro, L. C. (2012). Physicochemical characterization of Galician Honeys. *International Journal of Food Properties*, 15(2), 292-300. <https://doi.org/10.1080/10942912.2010.483616>

-
-
- Grenwalt, C. J., Steinkraus, K. H., & Ledford, R. A. (2000). *Kombucha, the Fermented Tea: Microbiology, Composition, and Claimed Health Effects*. 63(7), 976-981.
- Gullian Klanian, M., & Sánchez Solís, M. J. (2024). Impact of infusion time and ultrasound-assisted extraction on bioactive compounds and antioxidant capacity of foods prepared from seeds and leaves of Ramon tree (*Brosimum alicastrum*). *International Food Research Journal*, 31(3), 588-600. <https://doi.org/10.47836/ifrj.31.3.05>
- Júnior, J. C. D. S., Meireles Mafaldo, Í., De Lima Brito, I., & Tribuzy De Magalhães Cordeiro, A. M. (2022). Kombucha: Formulation, chemical composition, and therapeutic potentialities. *Current Research in Food Science*, 5, 360-365. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.01.023>
- Kapp, J. M., & Sumner, W. (2019). Kombucha: A systematic review of the empirical evidence of human health benefit. *Annals of Epidemiology*, 30, 66-70. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2018.11.001>
- Kayisoglu, S., & Coskun, F. (2021). Determination of physical and chemical properties of kombucha teas prepared with different herbal teas. *Food Science and Technology*, 41(suppl 1), 393-397. <https://doi.org/10.1590/fst.12720>
- Kim, J., & Adhikari, K. (2020). Current Trends in Kombucha: Marketing Perspectives and the Need for Improved Sensory Research. *Beverages*, 6(1), 15. <https://doi.org/10.3390/beverages6010015>
- Kitwetcharoen, H., Chamnipa, N., Thanonkeo, S., Klanrit, P., Tippayawat, P., Klanrit, P., Klanrit, P., Yamada, M., & Thanonkeo, P. (2025). Enhancing kombucha functionality: Utilizing dried pineapple peels and cores as an alternative

-
-
- ingredient for improved antioxidant and antimicrobial properties. *LWT*, 216, 117358. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2025.117358>
- Laavanya, D., Shirkole, S., & Balasubramanian, P. (2021). Current challenges, applications and future perspectives of SCOBY cellulose of Kombucha fermentation. *Journal of Cleaner Production*, 295, 126454. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126454>
- Laureys, D., Britton, S. J., & De Clippeleer, J. (2020). Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 78(3), 165-174. <https://doi.org/10.1080/03610470.2020.1734150>
- Lazzaroli, C., Sordini, B., Daidone, L., Veneziani, G., Esposto, S., Urbani, S., Selvaggini, R., Servili, M., & Taticchi, A. (2023). Recovery and valorization of food industry by-products through the application of *Olea europaea* L. leaves in kombucha tea manufacturing. *Food Bioscience*, 53, 102551. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102551>
- Loor García, F. J. (2022). *Evaluación del crecimiento del cultivo simbiótico de celulosa (SCOBY) y características sensoriales en kombucha obtenida a partir de diferentes sustratos*. Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí.
- López Zazueta, A. C. (2022). Estandarización química de una bebida fermentada de Kombucha a base de té verde, té de limón y e infusión hojas de guayaba. *Revista de Investigación Académica Sin Frontera: División de Ciencias Económicas y Sociales*, 38. <https://doi.org/10.46589/rdiasf.vi38.507>
- Mainers, M., & Sánchez, C. (2009). El ramón: Fruto de nuestra cultura y raíz para la conservación. *CONABIO*.

-
-
- Mamlouk, D., & Gullo, M. (2013). Acetic Acid Bacteria: Physiology and Carbon Sources Oxidation. *Indian Journal of Microbiology*, 53(4), 377-384.
<https://doi.org/10.1007/s12088-013-0414-z>
- Manzur, A., & Cardoso, J. (2015). *Velocidad de evaporación del agua*. 61(1), 31-34.
- Megaw, J., Thompson, T. P., Lafferty, R. A., & Gilmore, B. F. (2015). *Galleria mellonella as a novel in vivo model for assessment of the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids*. *Chemosphere*, 139, 197-201.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.026>
- Mendez, J. (2013). *Producción de ácido glucónico aplicando cinética de crecimiento microbiano a partir de aspergillus niger y como medio de cultivo, dulce de atado*. Universidad de El Salvador.
- Moccia, T. (2023). *Variabilidad microbiana y fisicoquímica en kombuchas argentinas y su relación con características sensoriales*. Universidad nacional del Comahue.
- Morales, L. (2014). *Desarrollo, elaboración y optimización bromatológica de una bebida de té negro fermentada a base de manchurian fungus (kombucha) y evaluación de su actividad como potencial alimento funcional*. [ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO FACULTAD DE CIENCIAS].
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/3422/1/56T00441.pdf>
- Mordor Intelligence. (2023). *Análisis de tamaño y participación del mercado de Kombucha tendencias y pronósticos de crecimiento (2023—2028)*.
<https://www.mordorintelligence.com/es/industry-reports/kombucha-market>
- Mousavi, S. M., Hashemi, S. A., Zarei, M., Gholami, A., Lai, C. W., Chiang, W. H., Omidifar, N., Bahrani, S., & Mazraedoost, S. (2020). Recent Progress in

-
-
- Chemical Composition, Production, and Pharmaceutical Effects of Kombucha Beverage: A Complementary and Alternative Medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2020/4397543>
- Murphy, T., Walia, K., & Farber, J. (2018). *Aspectos de seguridad y orientación para los consumidores sobre la preparación, manipulación y almacenamiento seguros de Kombucha, una bebida de té fermentada*. 38(5), 329-337.
- Najafpour, A., Rajabi Khorrami, A., Aberoomand Azar, P., & Saber Tehrani, M. (2020). Study of heavy metals biosorption by tea fungus in Kombucha drink using Central Composite Design. *Journal of Food Composition and Analysis*, 86, 103359. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103359>
- NMX-F-317-NORMEX-2013. (2013). *Determinación de pH en alimentos y bebidas no alcohólicas-método potenciométrico-método de prueba*.
- Nyhan, L. M., Lynch, K. M., Sahin, A. W., & Arendt, E. K. (2022). Advances in Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Applied Microbiology*, 2(1), 73-101. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol2010005>
- Ojo, A. O., & De Smidt, O. (2023). Microbial Composition, Bioactive Compounds, Potential Benefits and Risks Associated with Kombucha: A Concise Review. *Fermentation*, 9(5), 472. <https://doi.org/10.3390/fermentation9050472>
- Paredes, M., & Espinosa, D. (2009). *Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: Una revisión crítica*. 28(1).
- Pasadakis, N., Antoniou, E., & Karonis, D. (2014). Optimization of Light Cycle Oil (LCO) Solvent Extraction: Impact of Temperature and Solvent to Feed Ratio. *Petroleum*

-
-
- Science and Technology*, 32(21), 2566-2574.
<https://doi.org/10.1080/10916466.2013.853676>
- Ramírez, J., Rosas, P., Velázquez, M., Ulloa, J., & Arce, F. (2011). *Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud*. 27.
- Robles Aedo, V. (2011). *Determinación de parámetros de fermentación para la producción de kombucha utilizando una población mixta de microorganismos denominados fermento de té* [Universidad nacional Micaela Bastidas de Apurímac].
https://repositorio.unamba.edu.pe/bitstream/handle/UNAMBA/418/T_0029.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Silva, K. A., Uekane, T. M., Miranda, J. F. D., Ruiz, L. F., Motta, J. C. B. D., Silva, C. B., Pitangui, N. D. S., Gonzalez, A. G. M., Fernandes, F. F., & Lima, A. R. (2021). Kombucha beverage from non-conventional edible plant infusion and green tea: Characterization, toxicity, antioxidant activities and antimicrobial properties. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 34, 102032.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102032>
- Sinamo, K. N., Ginting, S., & Pratama, S. (2022). Effect of sugar concentration and fermentation time on secang kombucha drink. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 977(1), 012080. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/977/1/012080>
- Stevens, N. (2019). *Kombucha, Los secretos de esta bebida fermentada probiótica*. SIRIO S.A.

-
-
- Stevens, N., & Nieto, K. (2019). *Kombucha: Los secretos de esta bebida fermentada probiótica. Descubre sus propiedades depurativas, antioxidantes, energéticas y reconstituyentes*. SIRIO S.A.
- Terrence, P., & Sarukhán, J. (2005). *Brosimum alicastrum* (3.^a ed.). FCE.
- Tomar, O. (2023). Determination of some quality properties and antimicrobial activities of kombucha tea prepared with different berries. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 47(2), 252-262. <https://doi.org/10.55730/1300-011X.3083>
- Torres, M., & Gómez, S. (2019). *Ácido láctico: Una revisión sobre los métodos de determinación y purificación*. 14(2), 149-175.
- Tran, T., Grandvalet, C., Verdier, F., Martin, A., Alexandre, H., & Tourdot-Maréchal, R. (2020). Microbiological and technological parameters impacting the chemical composition and sensory quality of kombucha. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 2050-2070. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12574>
- Tsai, C. J.-Y., Loh, J. M. S., & Proft, T. (2016). *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*, 7(3), 214-229. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1135289>
- Uțoiu, E., Matei, F., Toma, A., Diguță, C., Ștefan, L., Mănoiu, S., Vărăjmașu, V., Moraru, I., Oancea, A., Israel-Roming, F., Cornea, C., Constantinescu-Aruxandei, D., Moraru, A., & Oancea, F. (2018). Bee Collected Pollen with Enhanced Health Benefits, Produced by Fermentation with a Kombucha Consortium. *Nutrients*, 10(10), 1365. <https://doi.org/10.3390/nu10101365>

-
-
- Vargas, M. F. J. (2011). *Elaboración de una bebida refrescante fermentando la simbiosis kombucha con el objeto de mejorar la calidad de vida de los consumidores de bebidas no alcohólicas*. UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO.
- Velićanski, A. S., Cvetković, D. D., Faculty of Technology, University of Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, RS-21000 Novi Sad, Serbia, Tumbas Šaponjac, V. T., Faculty of Technology, University of Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, RS-21000 Novi Sad, Serbia, Vulić, J. J., & Faculty of Technology, University of Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, RS-21000 Novi Sad, Serbia. (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. <https://doi.org/10.17113/ftb.52.04.14.3611>
- Victoriano Huerta, N., Alcántara Iniesta, S., Soto Cruz, B., Zaca Morán, P., Orduña Díaz, A., Arcila Lozano, L., & Rojas López, M. (2022). *Efecto de la sacarosa en la síntesis de celulosa bacteriana por fermentación de Kombucha en té negro (Camellia Sinensis)*. 14. <https://www.revistafronterabioteconologica.cibatlaxcala.ipn.mx/volumen/vol22/pdf/vol-22-2.pdf>
- Vijayaraghavan, R., Rao, P., Kumar, P., & Bhattacharya, R. (2000). *Estudios de toxicidad oral subaguda (90 días) de kombucha te*. 13, 293-299.

-
-
- Villagrán, Z., González, S., González, M., García de Alba-Verduzco, J. E., Ramírez, B., & Anaya, L. (2022). *Alimentos funcionales y su impacto en la salud humana*. 10(20).
- Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J., & Taillandier, P. (2018). Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of Food Science*, 83(3), 580-588. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>
- Wang, X., Wang, D., Wang, H., Jiao, S., Wu, J., Hou, Y., Sun, J., & Yuan, J. (2022). Chemical Profile and Antioxidant Capacity of Kombucha Tea by the Pure Cultured Kombucha. *LWT*, 168, 113931. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113931>
- Yavari, N., Assadi, M., Larijani, K., & Moghadam, M. B. (2010). *Response Surface Methodology for Optimization of Glucuronic Acid Production Using Kombucha Layer on Sour Cherry Juice*. 4(8). <file:///C:/Users/akelu/Downloads/36.pdf>
- Zubaidah, E., Valencia, V., Rifa'i, M., Srianta, I., & Tewfik, I. (2020). Investigating chemical changes during Snake fruit and Black tea Kombucha fermentation and the associated immunomodulatory activity in *Salmonella typhi*-infected mice. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 14, 995-1000. <https://doi.org/10.5219/1416>

9. ANEXOS

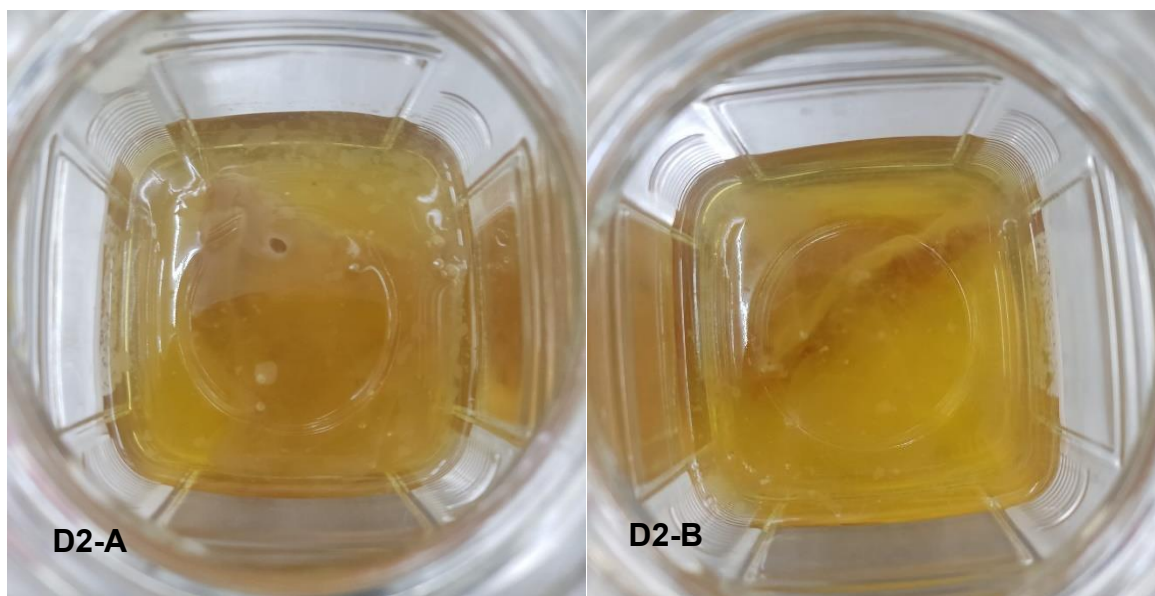
Anexo 1. Kombucha de Ramón D0-A Y D0-B



Anexo 2. Kombucha de Ramón D2-A Y D2-B



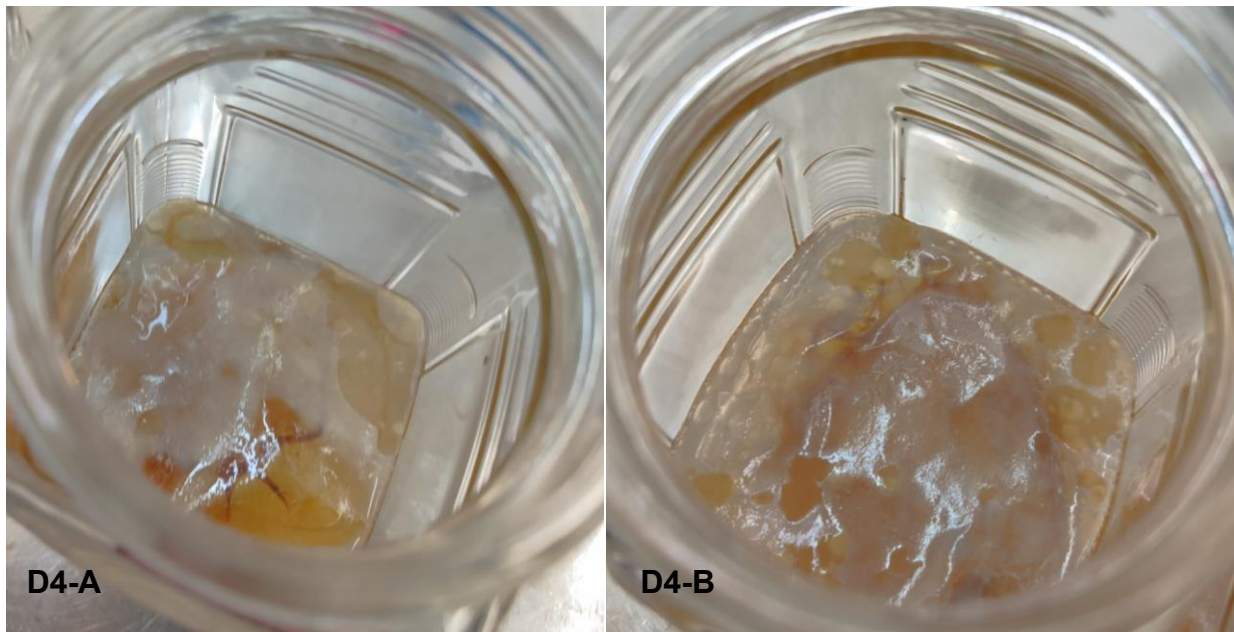
Anexo 3. SCOBY observado en la kombucha de Ramón D2-A y D2-B



Anexo 4. Kombucha de Ramón D4-A Y D4-B



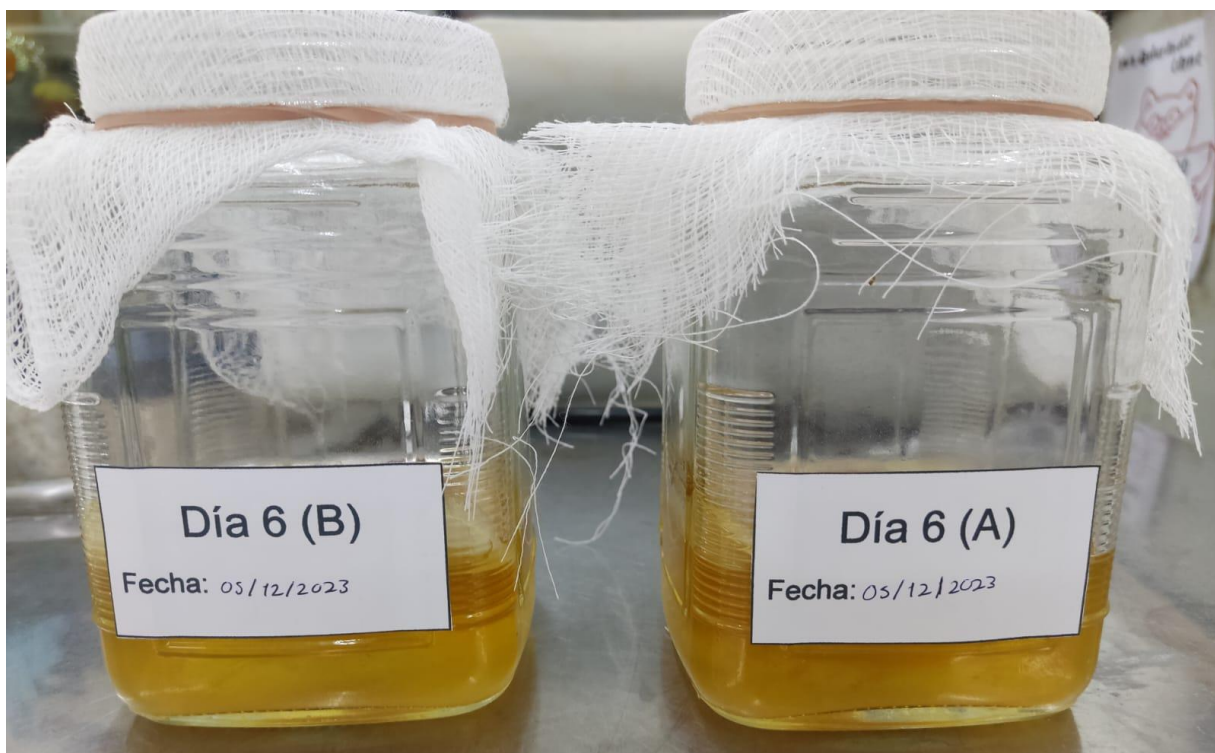
Anexo 5. SCOBY observado en la kombucha de Ramón D4-A y D4-B



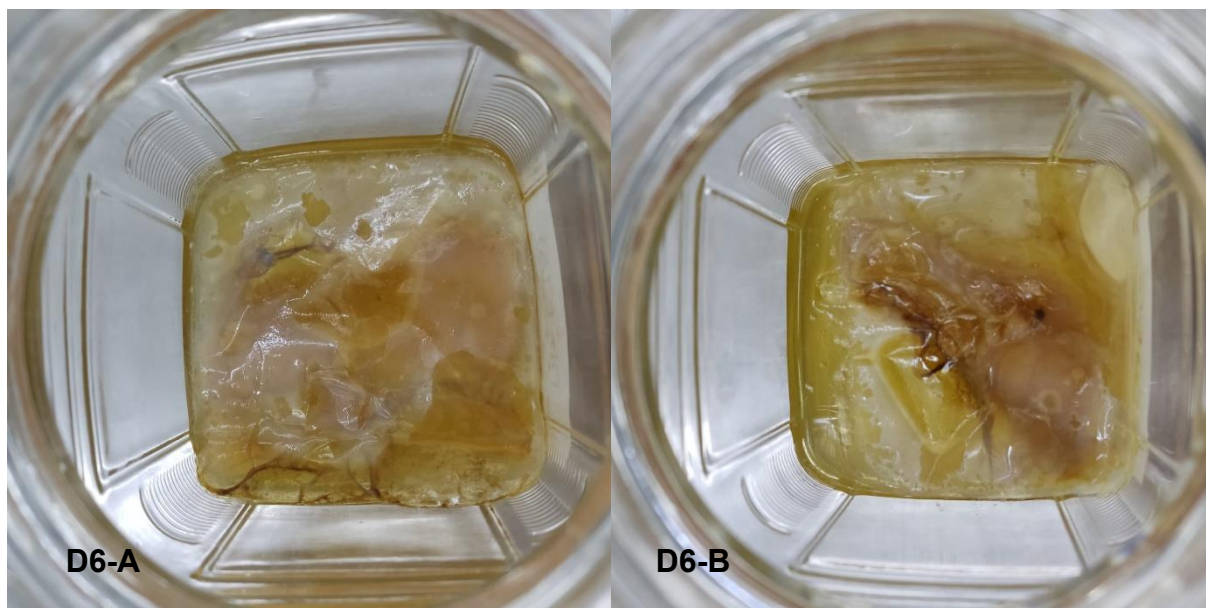
Anexo 6. SCOBY extraído de la kombucha de Ramon D4-A y D4-B



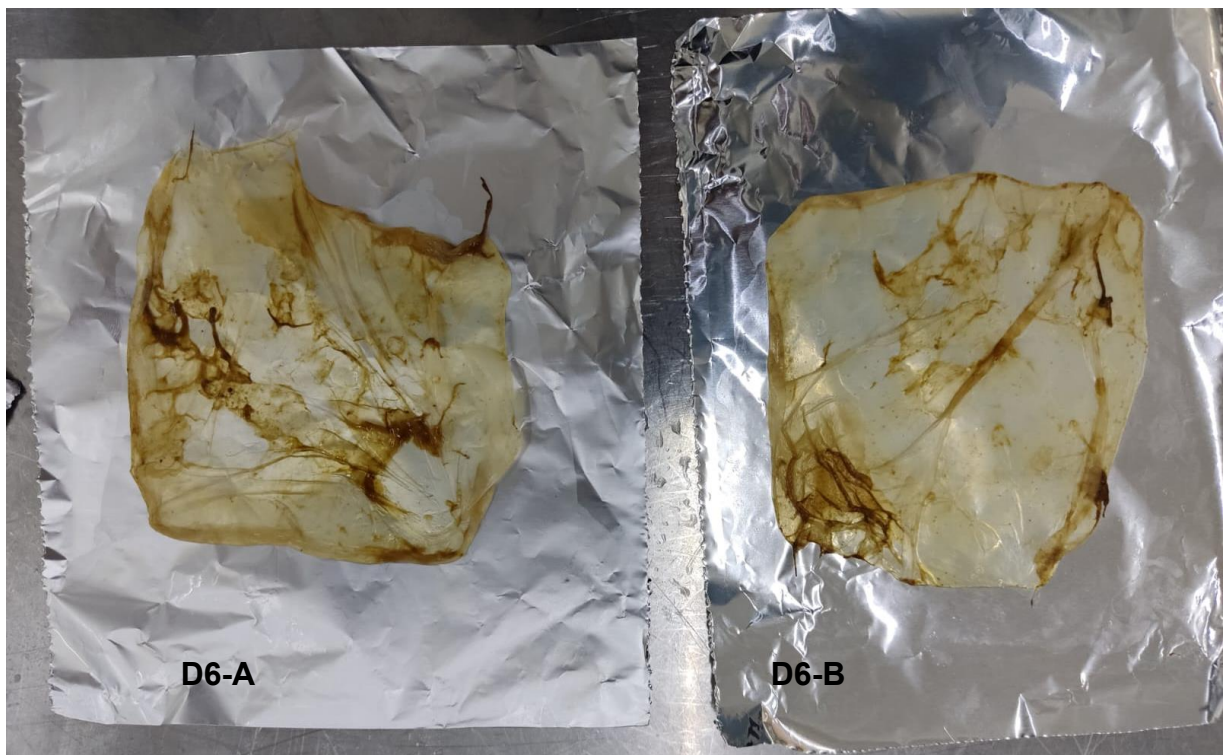
Anexo 7. Kombucha de Ramón D6-A Y D6-B.



Anexo 8. SCOBY observado en la kombucha de Ramón D6-A y D6-B.



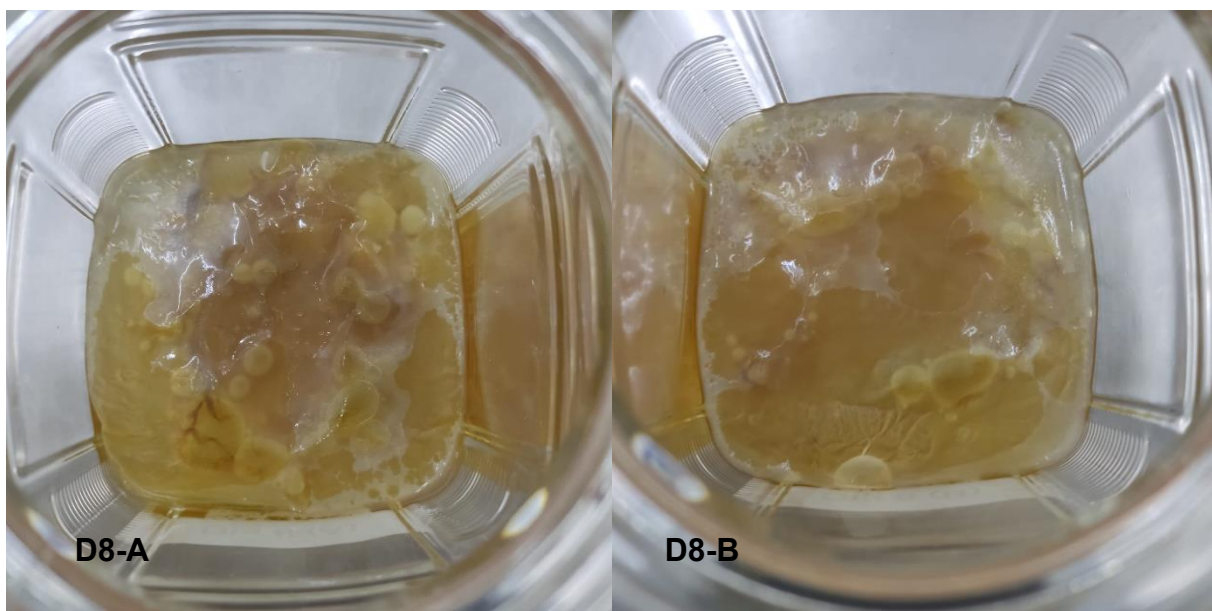
Anexo 9. SCOBY extraído de la kombucha de Ramon D6-A y D6-B.



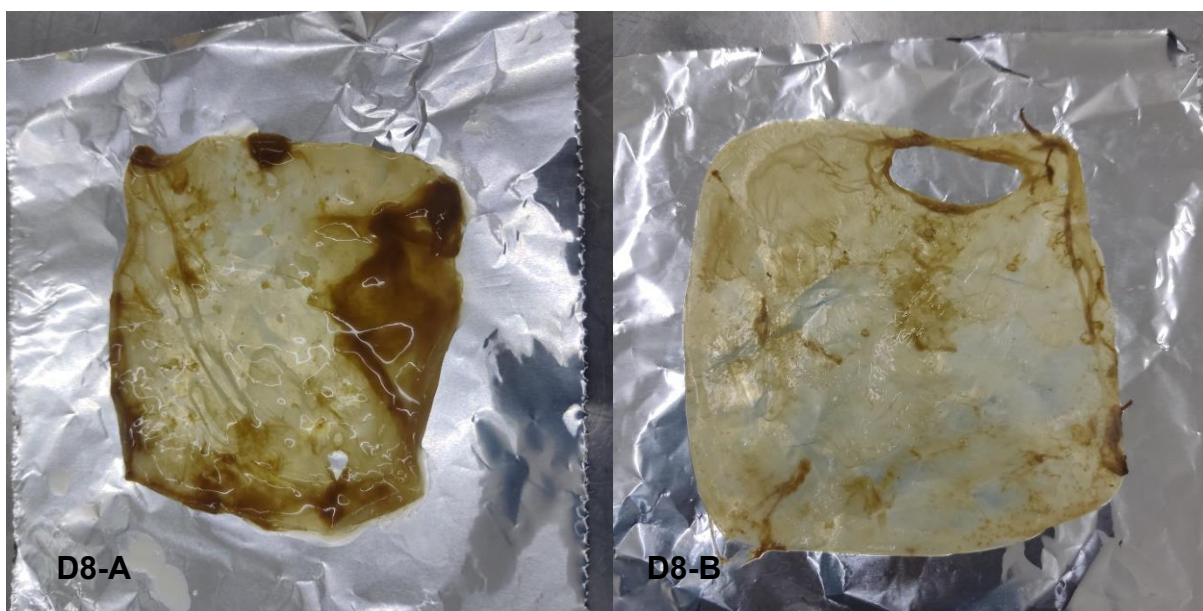
Anexo 10. Kombucha de Ramón D8-A Y D8-B.



Anexo 11. SCOBY observado en la kombucha de Ramón D8-A y D8-B.



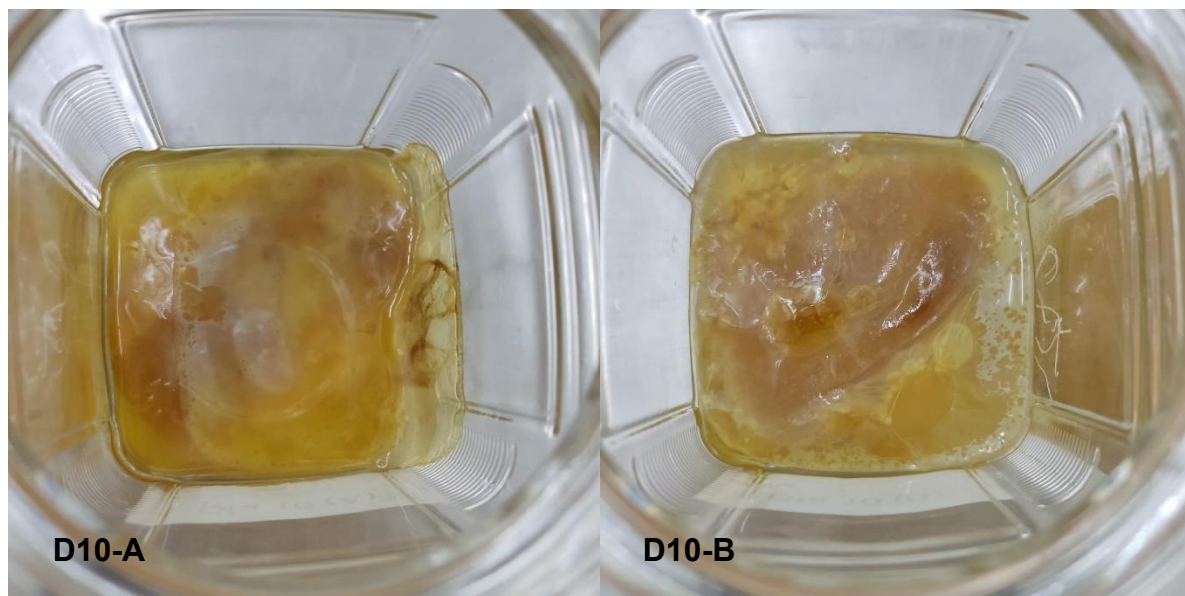
Anexo 12. SCOBY extraído de la kombucha de Ramon D8-A y D8-B.



Anexo 13. Kombucha de Ramón D10-A Y D10-B.



Anexo 14. SCOBY observado en la kombucha de Ramón D10-A y D10-B.



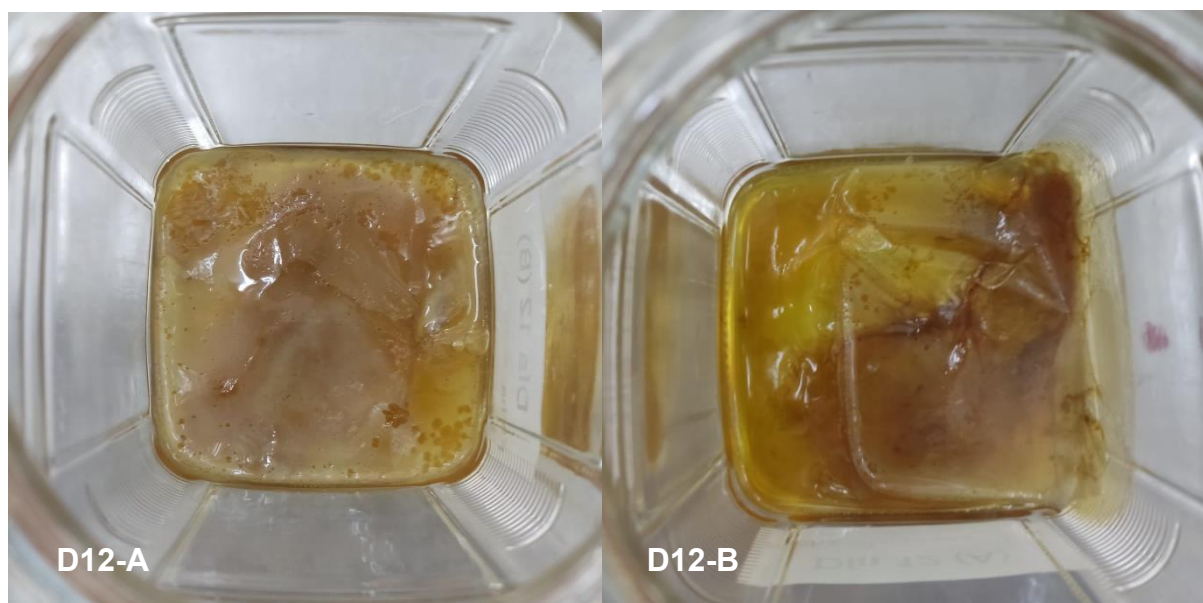
Anexo 15. SCOBY extraído de la kombucha de Ramon D10-A y D10-B



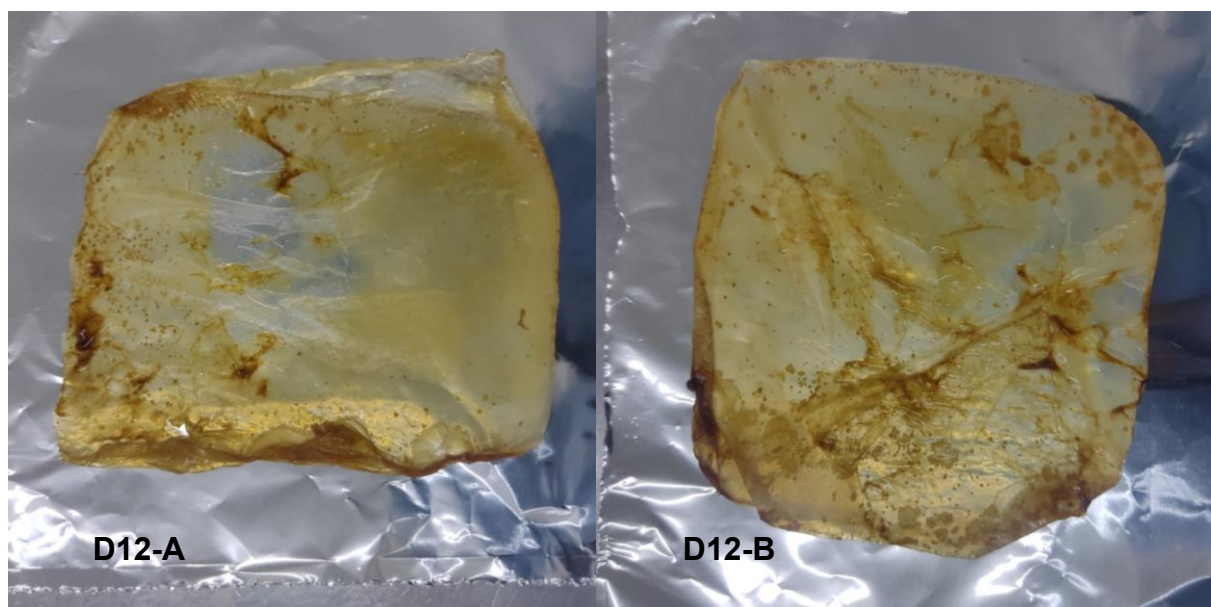
Anexo 16. Kombucha de Ramón D12-A Y D12-B.



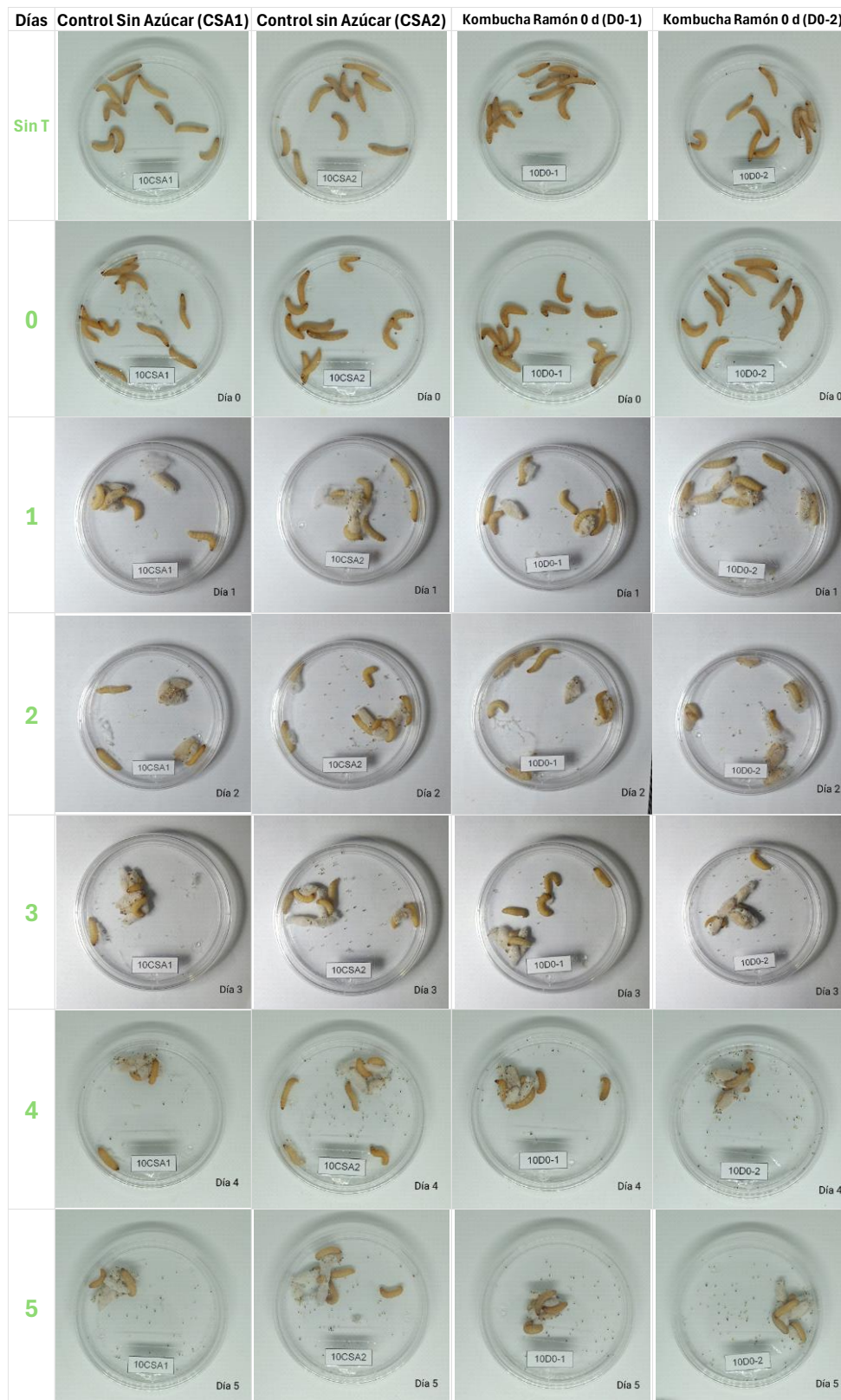
Anexo 17. SCOBY observado en la kombucha de Ramón D12-A y D12-B.



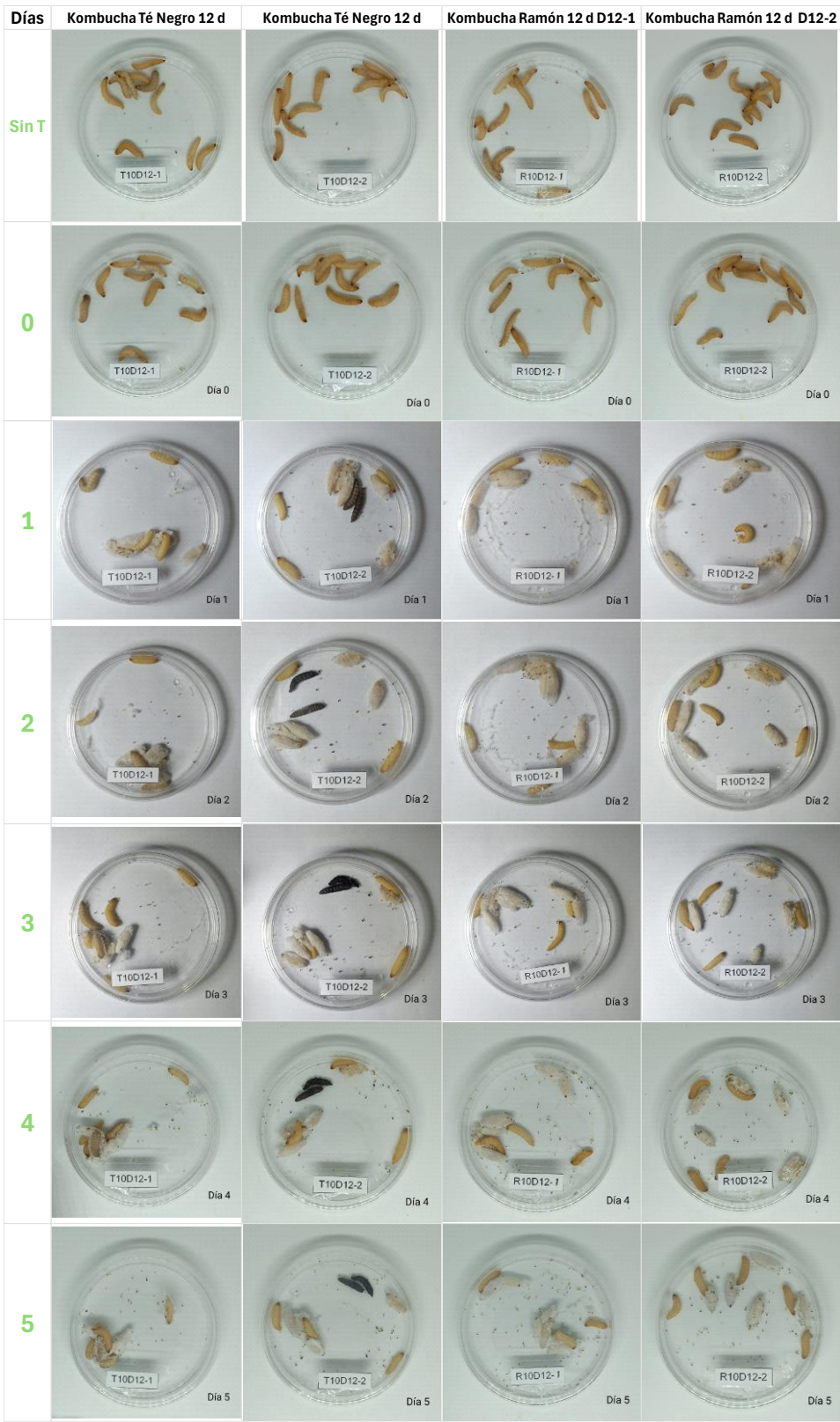
Anexo 18. SCOBY extraído de la kombucha de Ramon D12-A y D12-B.



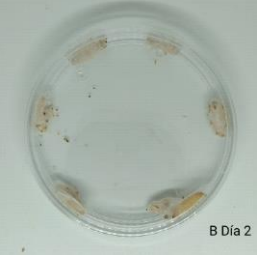
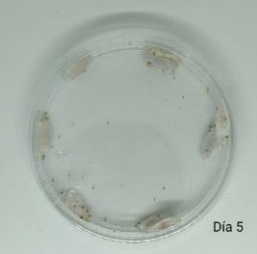
Anexo 19. Seguimiento de la prueba de toxicidad *in vivo* en *Galleria mellonella*



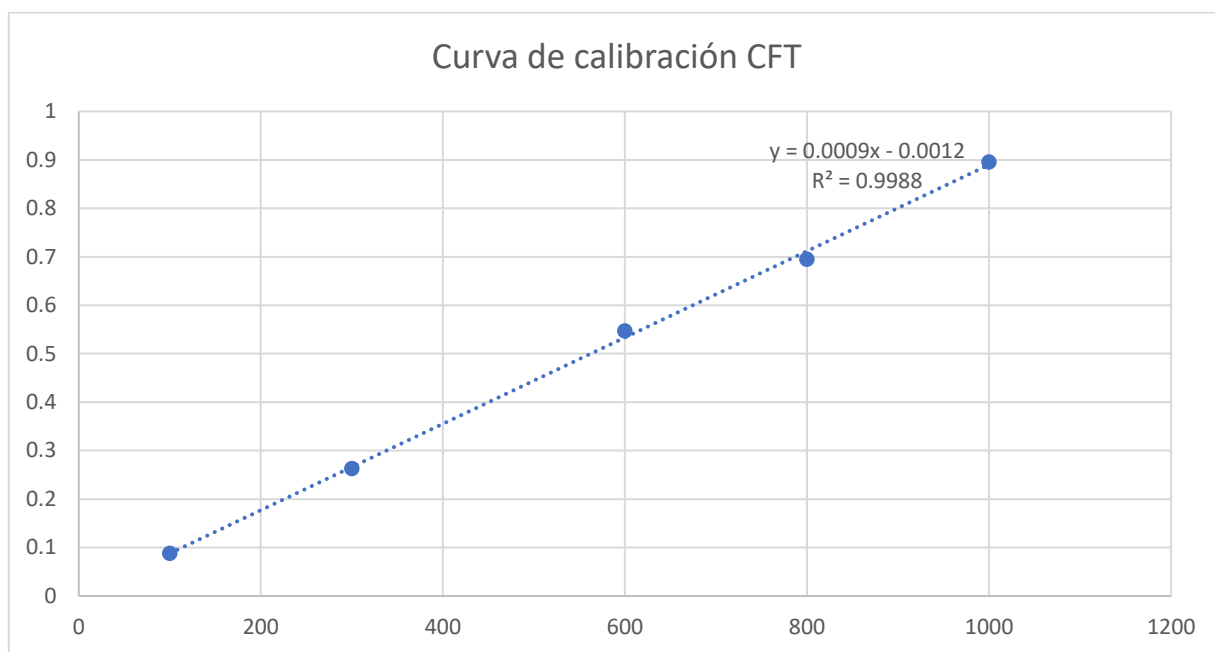
Anexo 20. Seguimiento de la prueba de toxicidad *in vivo* en *Galleria mellonella*.



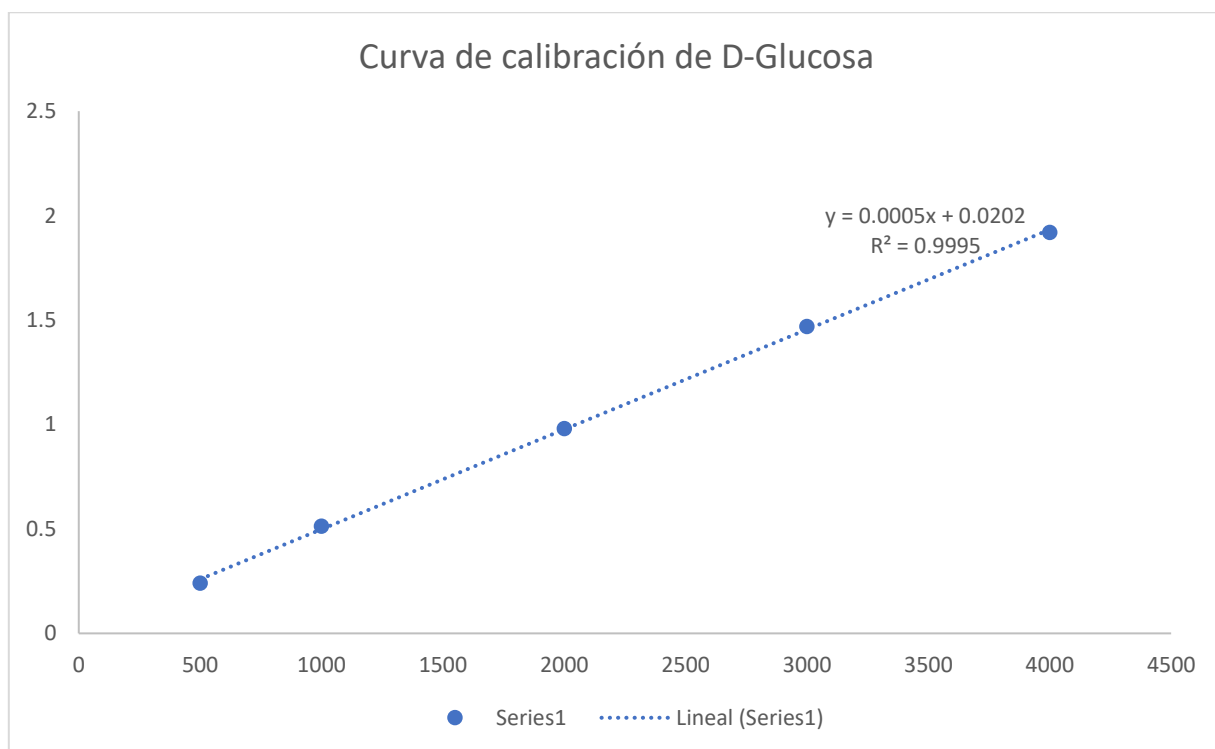
Anexo 21. Seguimiento de la prueba de toxicidad *in vivo* en *Galleria mellonella*.

Días	Control sin tratamiento	Control positivo	Control negativo
0	 B Día 0	 10CM1 Día 0	 10CN2 Día 0
1	 B Día 1	 10CM1 Día 1	 10CN2 Día 1
2	 B Día 2	 10CM1 Día 2	 10CN2 Día 2
3	 B Día 3	 10CM1 Día 3	 10CN2 Día 3
4	 B Día 4	 10CM1 Día 4	 10CN2 Día 4
5	 Día 5	 10CM1 Día 5	 10CN2 Día 5

Anexo 22. Curva de calibración CFT.



Anexo 23. Curva de calibración D-Glucosa.



Anexo 24. Formato de la evaluación sensorial de kombucha.

Evaluación sensorial de Kombucha

Fecha:..... Edad:..... Género:

Utilizando la siguiente escala, por favor evalúe la aceptabilidad (X) de cada atributo de la Kombucha. Concéntrese en la muestra, evalúe todos los atributos de cada muestra y luego recién prueba la siguiente.

Muestra 113

	Disgusta	→								Gusta
Color	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
Dulzor	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
Acidez	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
Olor	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
Aceptación general	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	

¿Cuál de las siguientes afirmaciones describe mejor la intención de compra de este producto si el precio fuera adecuado?

Definitivamente no lo compraría	
Probablemente no lo compraría	
Tal vez sí, tal vez no lo compraría	
Probablemente lo compraría	
Definitivamente lo compraría	

Muestra 245

	Disgusta	→								Gusta
Color	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
Dulzor	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
Acidez	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
Olor	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
Aceptación general	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	

¿Cuál de las siguientes afirmaciones describe mejor la intención de compra de este producto si el precio fuera adecuado?

Definitivamente no lo compraría	
Probablemente no lo compraría	
Tal vez sí, tal vez no lo compraría	
Probablemente lo compraría	
Definitivamente lo compraría	

Comentarios: _____



MUCHAS GRACIAS POR TU PARTICIPACIÓN!!!!