



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC

“DESARROLLO Y ESTUDIO DE UNA BEBIDA FERMENTADA CON CULTIVO  
MICROBIANO DE KOMBUCHA Y PULPA DE YACA (*Artocarpus heterophyllus* Lam).”

POR:  
ING. JESÚS ANTONIO BUENO ROJAS

TESIS PROPUESTA A LA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
E INVESTIGACIÓN

COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS DE ALIMENTOS

Directora:  
DRA. MARÍA DE LOURDES GARCÍA MAGAÑA

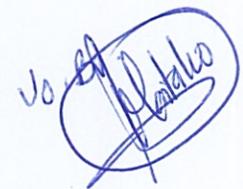
Codirectora:  
DRA. EFIGENIA MONTALVO GONZÁLEZ

Yo Bo.  
Jesús Antonio Bueno Rojas



J.A.B.R.

Yo Bo.  
María de Lourdes García Magaña



Yo Bo.  
Efigenia Montalvo González



Montserrat Calderón S.

Tepic, Nayarit

Mayo, 2022

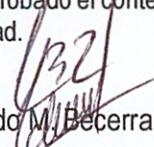


Instituto Tecnológico de Tepic  
División de Estudios de Posgrado e Investigación

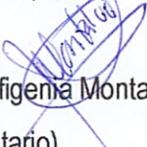
Tepic, Nayarit, 26/mayo/2022  
CONSEJO DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS  
No. Oficio CMCA 2022-16.

**MC LUZ DEL CARMEN ROMERO ISLAS**  
**JEFE DE LA DIV. DE EST. DE POSG. E INV.**  
**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC**  
**P R E S E N T E**

Por este conducto comunico a usted que el Consejo de la Maestría en Ciencias en Alimentos ha designado como revisores de la tesis del alumno **JESÚS ANTONIO BUENO ROJAS** con número de control **M14401152**, cuyo título es **“DESARROLLO Y ESTUDIO DE UNA BEBIDA FERMENTADA CON CULTIVO MICROBIANO DE KOMBUCHA Y PULPA DE YACA (*Artocarpus heterophyllus* Lam)”** a los miembros que a continuación se enlistan, mismos que han evaluado y aprobado el contenido del manuscrito para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Alimentos y que firman de conformidad.

  
Dr. Eduardo M. Becerra Verdín  
(Vocal suplente)

  
Dra. Montserrat Calderón Santoyo  
(Vocal)

  
Dra. Efigenia Montalvo González  
(Secretario)

  
Dra. María de Lourdes García Magaña  
(Presidente)

Agradeciendo de antemano la atención prestada a la presente, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
“Sabiduría tecnológica, Pasión por Nuestro Espíritu”

  
**DR. PORFIRIO GUTIÉRREZ MARTINEZ**  
**PRESIDENTE DEL CONSEJO DE MAESTRÍA EN**  
**CIENCIAS EN ALIMENTOS**

c.c.p. Expediente





Instituto Tecnológico de Tepic

Tepic, Nayarit, 27/mayo/2022

No. Oficio: 25-256-2021

Asunto: Constancia Originalidad de Trabajo de Tesis

**A QUIEN CORRESPONDA:**

Por medio de la presente se CERTIFICA que una vez analizado mediante el uso del Software PLAGIARISM v. 1740, el trabajo de tesis "DESARROLLO Y ESTUDIO DE UNA BEBIDA FERMENTADA CON CULTIVO MICROBIANO DE KOMBUCHA Y PULPA DE YACA (Artocarpus heterophyllus Lam)" para obtener el grado de Maestro (a) en Ciencias en Alimentos del C. I.B.Q. JESÚS ANTONIO BUENO ROJAS con numero de control **M14401152** cuenta con un nivel de **originalidad Excelente** según lo definido en el Procedimiento para Verificación de Originalidad, por lo cual se determina que no constituye un plagio.

Es importante mencionar que de los trabajos de tesis se publican articulos en revistas Indizadas y/o arbitradas por lo que las técnicas utilizadas son citadas frecuentemente.

Se extiende la presente para los fines que mejor convengan al interesado.

Sin mas por el momento envío saludos cordiales

**ATENTAMENTE**

*Excelencia en Educación Tecnológica®  
Sabiduría Tecnológica, Pasión de nuestro espíritu®*

**MANUEL ANGEL URIBE VÁZQUEZ**  
**DIRECTOR**



OGTM/AN  
Ccp. Archivo DEPI





Instituto Tecnológico de Tepic  
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Tepic, Nayarit, **27/mayo/2022**  
No. Oficio: 25-268-2022  
Asunto: Autorización de impresión

**I.B.Q. JESÚS ANTONIO BUENO ROJAS  
CANDIDATO AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS  
P R E S E N T E**

De acuerdo con los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado en el Tecnológico Nacional de México y las disposiciones en este Instituto, habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora realizó con respecto a su Trabajo de Tesis titulado **“DESARROLLO Y ESTUDIO DE UNA BEBIDA FERMENTADA CON CULTIVO MICROBIANO DE KOMBUCHA Y PULPA DE YACA (*Artocarpus heterophyllus Lam*)”**, la División de Estudios de Posgrado e Investigación de este Instituto, concede la Autorización para que proceda a la impresión del mismo.

Sin otro particular, quedo de Usted:



**ATENTAMENTE**  
*Excelencia en Educación Tecnológica*  
Sabiduría Tecnológica Pasión de Nuestro Espíritu

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA  
INSTITUTO TECNOLÓGICO  
DE TEPIC  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**M.C. LUZ DEL CARMEN ROMERO ISLAS  
JEFE DE DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

ccp. Coordinación de Maestría en Ciencias en Alimentos  
Archivo



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
POSGRADO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

**ASUNTO: CARTA DE SESIÓN DE DERECHOS**

En la ciudad de Tepic, Nayarit., el mes de Junio de 2022, el que suscribe alumno **JESÚS ANTONIO BUENO ROJAS** del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS** con número de control **M14401152**, manifiesta que todos los resultados derivados de sus estudios de posgrado y realizados bajo la dirección de la **DRA. MARÍA DE LOURDES GARCÍA MAGAÑA** pertenecen al Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tepic, por lo que cedo los derechos de los mismos a este instituto con fines académicos y de investigación. Así mismo manifiesto que es de mi conocimiento que si de estos resultados se originan patentes o publicaciones, participaré como coautor y de los beneficios que se deriven.

ATENTAMENTE



IBQ Jesús Antonio Bueno Rojas

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la **Dra. María de Lourdes García Magaña** por permitirme ser parte del equipo de trabajo y desarrollar con éxito este proyecto, por sus enseñanzas y su guía durante este tiempo que me permitió adquirir herramientas valiosas y ser mejor en los ámbitos académico, profesional y personal.

A mi comité tutorial, **Dra. Efigenia Montalvo González, Dra. Montserrat Calderón Santoyo y Dr. Eduardo Mendeleev Becerra Verdín**, gracias por sus valiosas aportaciones que fueron clave en el desarrollo y mejora de este proyecto y de mi aprendizaje.

Al **Tecnológico Nacional de México campus Instituto Tecnológico de Tepic**, por haberme permitido hacer uso de sus instalaciones durante la realización del proyecto de Maestría hasta la obtención del grado.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por haberme brindado la beca económica que me permitió realizar este posgrado.

A mis compañeros de laboratorio, **M.C.A. David Antonio Morelos Flores, Ing. Juan Miguel de Jesús Rodríguez Jiménez y D.C.A. Martha Guillermina Romero**, quienes me brindaron su amistad y me apoyaron en cada una de las etapas que me tocó compartir con ellos durante la realización de este proyecto.

A mis compañeros de posgrado, **M.C. Yolanda Nolasco González, M.C. Brandon Alexis L. Romero y Heidi Rubí Ramírez Concepción** por haberme recibido con amabilidad en su laboratorio y haberme apoyado en el desarrollo de este proyecto.

A la **M.C. Luz del Carmen Romero Islas** por haberme brindado su apoyo durante mi estancia en el posgrado.

Agradezco a todos los **docentes** que me brindaron su enseñanza, la cual es muy valiosa y fue muy importante para mi formación académica.

A mis padres **Lucio Bueno García y Ma. de la Luz Rojas Álvarez** por ser el pilar de todo mi desarrollo profesional, sin ellos no hubiera podido concluir lo que he logrado. Les debo todo y siempre estaré agradecido con ustedes. Esta tesis va con dedicatoria para mis padres.

A mis hermanos **Lucio y Mariela** quienes a la distancia siempre me brindan su apoyo en todos mis proyectos de vida, y en especial a mi hermana **Daniela** por haberme apoyado no solo en lo anímico sino también en el desarrollo experimental de este proyecto.

A todas esas personas que tuve el honor de conocer a lo largo de este posgrado, y que de alguna manera me brindaron su amistad y apoyo. Muchas gracias.

## RESUMEN

El Estado de Nayarit es el principal productor de yaca (*Artocarpus heterophyllus* L.) a nivel nacional. Este fruto es una rica fuente de compuestos bioactivos como los compuestos fenólicos y carotenoides; además, por la concentración de azúcar que contiene (16-25%) lo convierte en un fruto potencial para la fabricación de bebidas fermentadas.

Las bebidas de frutas fermentadas son productos prometedores, debido a la tendencia positiva de aceptación del consumidor. De la misma forma, la kombucha es una bebida obtenida a partir de la fermentación de té negro o verde endulzado con sacarosa, mediante un cultivo simbiótico de bacterias y levaduras (Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeasts, SCOBY) que le confiere, según diversos autores, efectos positivos a la salud. Con base en lo anterior, la preparación de kombucha con la adición de pulpa de yaca es un proceso que permite preservar y mejorar el valor nutricional y las propiedades funcionales, así como reducir las pérdidas postcosecha del fruto.

El objetivo de esta investigación fue desarrollar y analizar una bebida con potencial funcional a base de kombucha y pulpa de yaca (*Artocarpus heterophyllus* L.).

La metodología se dividió en 2 etapas. En la etapa 1 se caracterizó la kombucha de té verde y de té negro, se determinó el tipo de té y la concentración de pulpa de yaca a utilizar para el desarrollo de la bebida kombucha, así como el crecimiento microbiano en las formulaciones de kombucha con pulpa de yaca lixiviada, culminándose esta etapa con un análisis sensorial. Para su preparación se realizaron infusiones de té verde y té negro por separado y cada infusión se dividió en dos partes para procesarlas diferente. En el primer proceso se añadió sacarosa (50 g/L) a cada infusión, se disolvió y enfrió hasta temperatura ambiente (25 °C). Enseguida, las infusiones fueron colocadas en fermentadores, se añadieron 80 mL/L de kombucha realizada con anterioridad, se inoculó el medio con 3 % (p/v) de SCOBY e incubó en la oscuridad a 25 °C. Al culminar la 1ª fermentación, se retiró el SCOBY, el producto se filtró y trasvasó a otros recipientes. Posteriormente, se añadieron diferentes concentraciones de pulpa de yaca molida (50 y 60 g/L) y se almacenaron (2ª fermentación). En el otro proceso se hicieron lixiviados de 50 y 60 g/L de pulpa de yaca en cada infusión, se agregó la sacarosa y se enfriaron. La inoculación, fermentación y trasvase se realizó como se describió anteriormente. Enseguida se añadió sacarosa (6 g/L). Se evaluaron parámetros fisicoquímicos (sólidos solubles totales, pH y acidez titulable), el contenido de etanol, proteínas, grupos aminos libres (GAL), carbohidratos solubles totales (CST), el contenido de fenoles solubles totales (FST), la capacidad antioxidante (DPPH, FRAP y ABTS), el crecimiento microbiano (peso seco y densidad óptica de crecimiento) y el análisis sensorial. En la etapa 2 se caracterizaron las formulaciones seleccionadas en la etapa 1, se seleccionó la forma de inclusión de la pulpa de yaca en la bebida, se evaluó su calidad microbiológica y se realizó un análisis sensorial comparándolas con una kombucha comercial. El diseño experimental utilizado en la etapa 1 fue un diseño factorial 2x3 (uno para pulpa lixiviada y otro para pulpa molida). En la etapa 2 se utilizó un diseño unifactorial (forma de inclusión pulpa de yaca).

Los datos de cada variable fueron expresados como la media  $\pm$  desviación estándar (n=3) y se analizaron mediante el software STATISTICA.

Los resultados de la etapa 1 indicaron que 60 g/L de pulpa de yaca (lixiviada y molida) tienen el mismo efecto que la sacarosa (sustrato ideal), por lo que el SCOBY podría ser afín a la pulpa de yaca, esto se reafirmó con el crecimiento microbiano donde no hubo diferencias entre las muestras. El bajo pH fue debido a la producción de ácidos orgánicos a partir de los azúcares fermentables de la pulpa. La producción de ácido acético de kombuchas con pulpa de yaca mostraron diferencias significativas con respecto a los controles, atribuyéndola a la adición de pulpa. El contenido de etanol estuvo dentro del rango establecido para este tipo de bebidas (1.38 y 2.61 %). El contenido final de FST fue mayor en muestras de kombucha de té verde con pulpa de yaca lixiviada y molida. En el ensayo de FRAP, las muestras de kombucha con té verde y 60 g/L de pulpa lixiviada y molida mostraron diferencias con respecto a las demás.

En conclusión, la adición de pulpa de yaca es un sustrato alternativo para la preparación de kombucha, mejorando propiedades fisicoquímicas, antioxidantes y sensoriales. Asimismo, la adición de 60 g/L de pulpa de yaca lixiviada y molida en la fermentación de té verde incrementó la concentración de FST en un periodo de 10 días, presentando la mayor capacidad antioxidante por el ensayo FRAP, concluyendo que posiblemente los FST de la bebida tienen una alta capacidad reductora por transferencia de electrones. La muestra KV60P presentó mejor estabilidad, calidad microbiológica y aceptabilidad por parte de los potenciales consumidores, pudiendo ser una alternativa con alto valor agregado para los productores en la diversificación de productos con potencial bioactivo a base de yaca, además que podría ser una bebida competitiva contra bebidas similares que ya existen en el mercado.

Palabras claves: pulpa de yaca, capacidad antioxidante, compuestos bioactivos, kombucha, SCOBY.

## SUMMARY

The State of Nayarit is the main producer of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* L.) at the national level. This fruit is a rich source of bioactive compounds such as phenolic compounds and carotenoids; in addition, due to the concentration of sugar it contains (16-25%) it becomes a potential fruit for the manufacture of fermented beverages.

Fermented fruit drinks are promising products, due to the positive trend of consumer acceptance. In the same way, kombucha is a drink obtained from the fermentation of black or green tea sweetened with sucrose, through a symbiotic culture of bacteria and yeasts (Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeasts, SCOBY) that gives it, according to various authors, positive health effects. Based on the above, the preparation of kombucha with the addition of jackfruit pulp is a process that allows preserving and improving the nutritional value and functional properties, as well as reducing post-harvest losses of the fruit.

The objective of this research was to develop and analyze a beverage with functional potential based on kombucha and jackfruit pulp (*Artocarpus heterophyllus* L.).

The methodology was divided into 2 stages. In stage 1, the green tea and black tea kombucha were characterized, the type of tea and the concentration of jackfruit pulp to be used for the development of the kombucha drink were determined, as well as the microbial growth in the kombucha formulations with leached jackfruit pulp, culminating this stage with a sensory analysis. For its preparation, infusions of green tea and black tea were made separately, and each infusion was divided into two parts to process them differently. In the first process, sucrose (50 g/L) was added to each infusion, dissolved, and cooled to room temperature (25 °C). Next, the infusions were placed in fermenters, 80 mL/L of kombucha made previously were added, the medium was inoculated with 3% (w/v) of SCOBY and incubated in the dark at 25 °C. At the end of the 1st fermentation, the SCOBY was removed, the product was filtered and transferred to other containers. Subsequently, different concentrations of ground jackfruit pulp (50 and 60 g/L) were added and stored (2nd fermentation). In the other process, leachates of 50 and 60 g/L of jackfruit pulp were made in each infusion, sucrose was added, and they were cooled. Inoculation, fermentation, and transfer were carried out as described above. Sucrose (6 g/L) was then added. Physicochemical parameters (total soluble solids, pH and titratable acidity), ethanol content, proteins, free amino groups (GAL), total soluble carbohydrates (TSC), total soluble phenols content (TSP), antioxidant capacity (DPPH, FRAP and ABTS), microbial growth (dry weight and growth optical density) and sensory analysis. In stage 2, the formulations selected in stage 1 were characterized, the form of inclusion of the jackfruit pulp in the drink was selected, its microbiological quality was evaluated, and a sensory analysis was carried out comparing them with a commercial kombucha. The experimental design used in stage 1 was a 2x3 factorial design (one for leached pulp and one for ground pulp). In stage 2, a unifactorial design was used (jackfruit pulp inclusion form). The data for each variable were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (n=3) and were analyzed using the STATISTICA software.

The results of stage 1 indicated that 60 g/L of jackfruit pulp (leached and ground) have the same effect as sucrose (ideal substrate), so the SCOBY could be related to jackfruit pulp, this was reaffirmed. with microbial growth where there were no differences between the samples. The low pH was due to the production of organic acids from the fermentable sugars in the pulp. The acetic acid production of kombuchas with jackfruit pulp showed significant differences with respect to the controls, attributing it to the addition of pulp. The ethanol content was within the range established for this type of beverage (1.38 and 2.61%). Final TSP content was higher in samples of green tea kombucha with leached and ground jackfruit pulp. In the FRAP test, the kombucha samples with green tea and 60 g/L of leached and ground pulp showed differences with respect to the others.

In conclusion, the addition of jackfruit pulp is an alternative substrate for the preparation of kombucha, improving its physicochemical, antioxidant and sensory properties. Likewise, the addition of 60 g/L of leached and ground jackfruit pulp in the fermentation of green tea increased the concentration of FST in a period of 10 days, presenting the highest antioxidant capacity by the FRAP test, concluding that possibly the FST of the drink have a high reducing capacity by electron transfer. The KV60P sample presented better stability, microbiological quality, and acceptability by potential consumers, and could be an alternative with high added value for producers in the diversification of jackfruit-based products with bioactive potential, in addition to being a competitive beverage against similar drinks that already exist on the market.

Keywords: jackfruit pulp, antioxidant capacity, bioactive compounds, kombucha, SCOBY.

## CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	I
RESUMEN	III
SUMMARY	V
LISTA DE CUADROS	4
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE ABREVIATURAS	8
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	11
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	12
2.1 Generalidades de la yaca ( <i>Artocarpus heterophyllus</i> L.)	12
2.1.1 Origen y producción de la yaca	12
2.1.2 Características del fruto de la yaca	13
2.1.3 Composición nutrimental y fitoquímica de la yaca	14
2.2 Bebidas fermentadas	19
2.2.1 Generalidades y normatividad de la producción de bebidas fermentadas	19
2.2.2 Bebidas fermentadas a base de frutos	20
2.3 Bebida fermentada denominada kombucha	22
2.3.1 Propiedades y características de la bebida kombucha	23
2.3.2 Efectos biológicos de la bebida kombucha	25
2.3.2.1 Actividad antimicrobiana de la kombucha	29
2.3.3 Kombucha con frutas	31
CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN	34
CAPÍTULO 4. OBJETIVOS	35
4.1 Objetivo general	35
4.2 Objetivos específicos	35

CAPÍTULO 5. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN	36
CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS	37
6.1 Etapa 1. Caracterización de kombucha de té verde y de té negro, determinación del tipo de té y la concentración de pulpa de yaca a utilizar en el desarrollo de la bebida kombucha y crecimiento microbiano en las formulaciones de kombucha con pulpa de yaca lixiviada	37
6.1.1 Material biológico	37
6.1.2 Obtención y análisis de la kombucha de té verde y té negro	37
6.1.3 Procedimiento	38
6.2 Etapa 2. Desarrollo de bebida kombucha con pulpa de yaca	40
6.2.1 Metodología para el desarrollo de kombucha de té verde con pulpa de yaca lixiviada y molida	40
6.2.2 Desarrollo de la bebida de kombucha con pulpa de yaca	40
6.3 Análisis fisicoquímicos	40
6.4 Elaboración de cinéticas de producción de etanol, proteínas, grupos aminos libres, carbohidratos solubles totales, presencia de fenoles solubles totales (FST) y capacidad antioxidante (CaOX) durante el proceso de fermentación de las formulaciones	42
6.5 Crecimiento microbiano	45
6.5.1 Densidad óptica de crecimiento (D.O.)	46
6.5.2 Crecimiento de biopelícula (peso seco)	46
6.5.3 Parámetros de crecimiento microbiano	46
6.6 Análisis sensorial (etapa 1)	47
6.7 Calidad microbiológica	47
6.8 Análisis sensorial (prueba de ordenamiento por rangos)	47
6.9 Diseño experimental y análisis estadístico	48
CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
7.1 Etapa 1. Caracterización básica de la kombucha de té verde y de té negro, determinación del tipo de té, de la concentración de pulpa de yaca lixiviada y molida a utilizar en el desarrollo de la bebida kombucha, desarrollo de las cinéticas de crecimiento microbiano en las formulaciones de kombucha con pulpa de yaca lixiviada y análisis sensorial.	49
7.1.1 Obtención de kombucha con pulpa de yaca	50
7.1.2 Evaluación de sólidos solubles totales (SST)	50

7.1.3 Determinación de pH	52
7.1.4 Determinación de acidez titulable	54
7.1.5 Evaluación del contenido de etanol	57
7.1.6 Determinación del contenido de proteínas	60
7.1.7 Cuantificación de grupos aminos libres ( $\alpha$ -NH <sub>2</sub> )	62
7.1.8 Determinación de carbohidratos solubles totales	64
7.1.9 Fenoles solubles totales (FST) y capacidad antioxidante (CaOX)	67
7.1.10 Crecimiento microbiano	76
7.1.10.1 Densidad óptica de crecimiento (D.O.)	76
7.1.10.2 Crecimiento de biopelícula (peso seco)	78
7.1.10.3 Parámetros de crecimiento microbiano	80
7.1.11 Análisis sensorial (etapa 1)	81
7.2 Etapa 2. Caracterización de dos formulaciones de kombucha con pulpa de yaca seleccionadas en la etapa anterior, determinación de la forma de inclusión de la pulpa de yaca, evaluación de su calidad microbiológica y análisis sensorial de las formulaciones desarrolladas en comparación con una kombucha comercial	84
7.2.1 Caracterización de dos formulaciones de kombucha con pulpa de yaca	84
7.2.2 Determinación de la forma de inclusión de la pulpa de yaca en la kombucha con base a su calidad microbiológica	85
7.2.3 Análisis sensorial (prueba de ordenamiento por rangos)	87
CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES	89
CAPÍTULO 9. REFERENCIAS	90
ANEXOS	107

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 2.1	Producción agrícola de yaca por ciclos perennes en México del año 2019	12
Cuadro 2.2	Producción agrícola de yaca por ciclos perennes en Nayarit del año 2019	12
Cuadro 2.3	Composición nutrimental de pulpa de yaca en base húmeda	14
Cuadro 2.4	Concentración de carotenoides en pulpa de yaca ( $\mu\text{g}/100$ g de peso fresco)	17
Cuadro 2.5	Prevención de enfermedades de compuestos antioxidantes de pulpa de yaca	17
Cuadro 2.6	Especificaciones de la calidad del vino	19
Cuadro 2.7	Efecto de la fermentación sobre compuestos bioactivos de frutos y vegetales	20
Cuadro 2.8	Composición microbiana de la colonia de kombucha	22
Cuadro 2.9	Parámetros fisicoquímicos de kombucha	24
Cuadro 2.10	Composición química de la kombucha	25
Cuadro 6.1	Factores y niveles para evaluar en la etapa 1 del estudio	48
Cuadro 7.1	Caracterización básica de la pulpa de yaca y las infusiones de té verde y té negro	49
Cuadro 7.2	Formulaciones desarrolladas de kombucha	50
Cuadro 7.3	Fenoles solubles totales de kombucha con pulpa de yaca lixiviada	68
Cuadro 7.4	Fenoles solubles totales de kombucha con pulpa de yaca molida	68
Cuadro 7.5	Capacidad antioxidante (DPPH) de kombucha con pulpa de yaca lixiviada	71
Cuadro 7.6	Capacidad antioxidante (DPPH) de kombucha con pulpa de yaca molida	71
Cuadro 7.7	Capacidad antioxidante (FRAP) de kombucha con pulpa de yaca lixiviada	73
Cuadro 7.8	Capacidad antioxidante (FRAP) de kombucha con pulpa de yaca molida	74
Cuadro 7.9	Capacidad antioxidante (ABTS) de kombucha con pulpa de yaca lixiviada	76
Cuadro 7.10	Capacidad antioxidante (ABTS) de kombucha con pulpa de yaca molida	76

Cuadro 7.11	Velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ), velocidad específica de consumo de sustrato (qS), velocidad específica de producción de un metabolito (qP) y rendimiento efectivo (%) de las muestras fermentadas de kombucha	81
Cuadro 7.12	Caracterización de formulaciones de kombucha con pulpa de yaca	85
Cuadro 7.13	Recuento en placa de coliformes totales, mesofílicos aerobios y mohos y levaduras en muestras de kombucha	85
Cuadro 7.14	Suma de rangos de las muestras de kombucha (prueba de ordenamiento)	88

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Fruto de yaca	13
Figura 2.2	Fruto de yaca (corte longitudinal)	13
Figura 6.1	Diagrama de flujo del procedimiento para la determinación del tipo de té y la concentración de pulpa de yaca utilizar en el desarrollo de la bebida kombucha	39
Figura 6.2	Diagrama de flujo para el desarrollo de kombuchas de té verde con 60 g/L de pulpa de yaca lixiviada y con 60 g/L de pulpa de yaca molida	41
Figura 7.1	Cinéticas del contenido de sólidos solubles totales durante el desarrollo de la kombucha: a) con pulpa de yaca lixiviada y b) con pulpa de yaca molida	51
Figura 7.2	Cinéticas del comportamiento del pH durante el desarrollo de la kombucha: a) con pulpa de yaca lixiviada y b) con pulpa de yaca molida	53
Figura 7.3	Cinéticas de la producción de ácido acético durante el desarrollo de la kombucha: a) con pulpa de yaca lixiviada y b) con pulpa de yaca molida	55
Figura 7.4	Cinéticas de producción de etanol durante el desarrollo de la kombucha: a) con pulpa de yaca lixiviada y b) con pulpa de yaca molida	58
Figura 7.5	Concentración de proteína durante el desarrollo de la kombucha: a) con pulpa de yaca lixiviada y b) con pulpa de yaca molida	61
Figura 7.6	Concentración de grupos aminos libres durante el desarrollo de la kombucha: a) con pulpa de yaca lixiviada y b) con pulpa de yaca molida	63
Figura 7.7	Concentración de carbohidratos solubles totales durante el desarrollo de la kombucha: a) con pulpa de yaca lixiviada y b) con pulpa de yaca molida	66
Figura 7.8	Crecimiento microbiano durante el desarrollo de la kombucha: a) densidad óptica de crecimiento (D.O.) y b) crecimiento de biopelícula (peso seco)	77
Figura 7.9	Crecimiento de la biopelícula en diferentes muestras de kombucha (húmeda)	79

Figura 7.10 Evaluación sensorial del color, olor, sabor, consistencia y aceptabilidad general de muestras de kombucha: a) con pulpa de yaca lixiviada y b) 83 con pulpa de yaca molida

## LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentaje
°Bx	Grados Brix
°C	Grados Celsius
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µ <sub>max</sub>	Velocidad específica máxima de crecimiento
µmol	Micromol
5-LOX	Enzima 5-lipooxigenasa
A549	Línea celular de adenocarcinoma epitelial de pulmón
ABTS	Método 2,2-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
AFB1	Aflatoxina B1
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AT	Acidez titulable
CACO-2	Línea celular de adenocarcinoma colorrectal epitelial
CaOX	Capacidad antioxidante
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COX-2	Enzima ciclooxigenasa 2
CST	Carbohidratos solubles totales
D.O.	Densidad óptica de crecimiento
DPPH	Método 2,2-difenil-1-picrilhidracilo
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EAT	Equivalentes de ácido tánico
EC50	Concentración media máxima efectiva
ER	Equivalentes de rutina
ET	Equivalentes de Trolox
etc.	Etcétera
Fe <sup>2+</sup>	ion hierro (forma ferrosa)
Fe <sup>3+</sup>	ion hierro (forma férrica)
fMLP	formil-Met-Leu-Phe
FRAP	Método de poder antioxidante férrico
FST	Fenoles solubles totales
g	Gramo
GAL	Grupos aminos libres
h	Hora
ha	Hectárea
HbA1c	Hemoglobina glucosilada
HCl	Ácido clorhídrico

HCT-116	Línea celular de cáncer de colon humano
HCT8	Línea celular de adenocarcinoma colorrectal ileocecal
Hep-2	Línea celular de carcinoma epidermoide
IC50	Concentración inhibitoria media máxima
IG50	Concentración inhibitoria media de la población celular
IMR90	Célula pulmonar normal
iNOS	Enzima de óxido nítrico sintasa inducible
IU	Unidad internacional
JFP-Ps	Polisacáridos de pulpa de yaca
kcal	Kilocaloría
kg	Kilogramo
KN	Kombucha de té negro
KN50L	Kombucha de té negro con 50 g/L de pulpa de yaca lixiviada
KN50P	Kombucha de té negro con 50 g/L de pulpa de yaca molida
KN60L	Kombucha de té negro con 60 g/L de pulpa de yaca lixiviada
KN60P	Kombucha de té negro con 60 g/L de pulpa de yaca molida
KV	Kombucha de té verde
KV50L	Kombucha de té verde con 50 g/L de pulpa de yaca lixiviada
KV50P	Kombucha de té verde con 50 g/L de pulpa de yaca molida
KV60L	Kombucha de té verde con 60 g/L de pulpa de yaca lixiviada
KV60P	Kombucha de té verde con 60 g/L de pulpa de yaca molida
L	Litro
LC50	Concentración letal media
Leu	Leucina
LPS	Lipopolisacáridos
M	Molar
M12.C3.F6	Línea celular de linfoma de células B de murino
mbar	Milibar
MCF-7	Línea celular de cáncer de mama humano
Met	Metionina
mg	Miligramo
MIC	Concentración mínima inhibitoria
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N	Normal
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
NOM	Norma Oficial Mexicana
O <sup>2-</sup>	Radical superóxido

OH	Radical hidroxilo
ORAC	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
p/v	Relación peso-volumen
pH	Potencial de hidrógeno
Phe	Fenilalanina
ppm	Partes por millón
qP	Velocidad específica de producción de un metabolito
qS	Velocidad específica de consumo de sustrato
RAW	Células macrófagas murinas
rpm	Revoluciones por minuto
SCOBY	Cultivo simbiótico de bacterias y levaduras
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
SST	Sólidos solubles totales
TNBS	Método del ácido trinitrobenzenosulfónico
ton	Tonelada
TPTZ	2,4,6-Tripiridil-s-triazina
UFC	Unidad formadora de colonias
UV-Vis	Ultravioleta- visible
v/v	Relación volumen-volumen
v/v/v	Relación volumen-volumen-volumen
WHO	World Health Organization

## **CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN**

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente en Nayarit se siembran alrededor de 1,376.7 ha de yaca, con una producción aproximada de 24,792.68 ton, que día a día se va incrementando (SIAP, 2019). Debido a la alta producción es factible el desarrollo de nuevos productos a base de este fruto para dar alternativas de conservación y aprovechamiento. En este sentido, la fermentación se considera una de las tecnologías más populares para la producción de productos biológicos con alto valor agregado. Las bebidas de frutas fermentadas son productos prometedores debido a la tendencia de aceptación en los consumidores, además de contribuir a la reducción de las pérdidas postcosecha de frutas perecedoras (Jarvis, 1996).

La pulpa de yaca además de ser un fruto rico en azúcares y contiene compuestos bioactivos, como los carotenoides y compuestos fenólicos (De Faria et al., 2009), los cuales pueden ser importantes para la prevención de varias enfermedades degenerativas crónicas, como cáncer, inflamación y enfermedades cardiovasculares (Devasagayam et al., 2004).

La kombucha es una bebida obtenida a partir de té negro o té verde endulzado con sacarosa y fermentado por un cultivo simbiótico de bacterias y levaduras. El cultivo simbiótico es capaz de producir una bebida refrescante, ligeramente ácida y carbonatada, en un período de 7 a 10 días (Malbaša et al., 2011). Es una bebida con notables beneficios sobre la salud, que incluyen efectos antioxidantes, antiinflamatorios, anticancerígenos, antihiper glucémicos y antimicrobianos. La fermentación permite preservar y mejorar el valor nutricional, las propiedades funcionales y las cualidades sensoriales del té y del fruto (Ahmed et al., 2020; Cardoso et al., 2020; Villarreal-Soto et al., 2019; Zubaidah et al., 2018; Srihari et al., 2013).

En la literatura, existen varios estudios sobre la combinación de kombucha con frutas donde se ha visto que las actividades biológicas se ven mejoradas en comparación de la bebida tradicional (utilizando solamente té verde o té negro), algunas de ellas son el coco (Watawana et al., 2016), la uva (Ayed et al., 2016), la cereza (Yavari et al., 2010) y la tuna (Ayed y Hamdi, 2015), además de que se conservan los atributos sensoriales de los frutos.

El objetivo de este estudio fue desarrollar y analizar una bebida con potencial funcional a base de kombucha y pulpa de yaca (*Artocarpus heterophyllus* L.).

## **CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES**

## CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades de la yaca (*Artocarpus heterophyllus* L.)

#### 2.1.1 Origen y producción de la yaca

La yaca (*Artocarpus heterophyllus* L.) es un fruto tropical que pertenece a la familia *Moraceae*. Es originario del sureste de la India (Crane y Balerdi, 2000). En México, el cultivo comercial de esta especie se produce en 6 entidades federativas (Cuadro 2.1) (SIAP, 2019).

Cuadro 2.1. Producción agrícola de yaca por ciclos perennes en México del año 2019.

Entidad	Superficie (ha)		Producción (ton)
	Sembrada	Cosechada	
Nayarit	1,555.7	1,376.7	24,792.68
Veracruz	70.0	69.0	1,199.4
Jalisco	37.0	37.0	498.73
Colima	9.5	9.5	88.0
Michoacán	7.0	7.0	39.2
Hidalgo	5.5	5.5	23.37
Total	1,684.7	1,504.7	26,641.38

Fuente: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2019).

Actualmente en Nayarit se cosechan 1,376.7 ha. En el año 2019, se registró la producción de yaca en algunos municipios del Estado (Cuadro 2.2) (SIAP, 2019).

Cuadro 2.2. Producción agrícola de yaca por ciclos perennes en Nayarit del año 2019.

Municipio	Superficie (ha)		Producción (ton)
	Sembrada	Cosechada	
San Blas	872.0	822.0	14,632.44
Compostela	629.0	500.0	9,310.49
Santiago Ixcuintla	25.0	25.0	332.0
Tepic	10.45	10.45	180.36
Bahía de Banderas	8.0	8.0	174.94
Xalisco	5.0	5.0	73.75
Tecuala	4.0	4.0	72.0
Rosamorada	1.25	1.25	11.2
Amatlán de Cañas	1.0	1.0	5.5
Total	1,555.7	1,376.7	24,792.68

Fuente: SIAP, 2019.

Definido el origen y los lugares donde el fruto es cultivado es importante mencionar las características del fruto de la yaca de manera general.

### 2.1.2 Características del fruto de la yaca

En Nayarit se cultivan diferentes materiales de yaca sin registro, distinguidas por características específicas de la planta y fruto, como *Agüitada*, *Virtud*, *Romina*, *Carlita*, *Licenciada*, *Clemente*, *Lisa*, *Bolonga*, *R-15*, *Yesi*, *Daysi*, entre otras (Khan et al., 2010). El fruto es oblongo a cilíndrico con longitud de hasta 90 cm de largo y de 15 a 50 cm de ancho y puede pesar de 4.5 a 50 kg (Figura 2.1) (Villalobos, 2017).



Figura 2.1 Fruto de yaca.

Se distinguen tres regiones primarias: (1) centro del fruto; (2) periantos (parte comestible), región media fusionada y la región externa córnea no comestible; y (3) fruto verdadero (semillas) (Figura 2.2) (Ong et al., 2006; Piña-Dumoulin et al., 2010).



Figura 2.2 Fruto de yaca (corte longitudinal).

La limitación más importante en el manejo de este fruto es su corta vida postcosecha. Es un fruto climatérico con una vida de anaquel de 5 a 10 días a temperatura ambiente, en el cual se ha reportado una tasa de respiración alta en el pico climatérico que oscila entre 90.7 y 103.49 mL CO<sub>2</sub>/kg•h, lo que indica que la yaca es un fruto altamente perecedero (Mata-

Montes de Oca et al., 2007; Morelos-Flores, 2020). La maduración del fruto provoca una progresiva pérdida de firmeza y cambio de color en los bulbos debido a cambios que sufren los polisacáridos por acciones enzimáticas a nivel de la pared celular (Lira et al., 2008). También es un fruto que sufre daños por causa de bajas temperaturas durante su almacenamiento (Ong et al., 2006).

### 2.1.3 Composición nutrimental y fitoquímica de la yaca

La pulpa de yaca contiene nutrientes y otros compuestos a los que se les han atribuido propiedades nutricionales y funcionales, además, tiene bajo contenido calórico, ya que 100 g de pulpa de yaca contienen 94 kcal (Mukprasirt y Sajjaanantakul, 2004). En el Cuadro 2.3 se observa la composición de 100 g de pulpa de yaca fresca en estado de madurez fisiológica y de consumo.

Cuadro 2.3. Composición nutrimental de pulpa de yaca en base húmeda por cada 100 g.

<b>Nutrientes</b>	<b>Fruto joven</b>	<b>Fruto maduro</b>
Agua (g)	76.2-85.2	72.0-94.0
Proteínas (g)	2.0-2.6	1.2-1.9
Lípidos (g)	0.1-0.6	0.1-0.4
Carbohidratos (g)	9.4-11.5	16.0-25.4
Fibra (g)	2.6-3.6	1.0-1.5
Azúcares totales (g)	No disponible	15.05-25.4
Calcio (mg)	30.0-73.2	20.0-37.0
Fósforo (mg)	20.0-57.2	38.0-41.0
Potasio (mg)	287.0-323.0	191.0-407.0
Sodio (mg)	3.0-35.0	2.0-41.0
Hierro (mg)	0.4-1.9	0.5-1.1
Vitamina A (IU)	30.0	175.0-540.0
Caroteno (µg)	No disponible	165-180
Tiamina (mg)	0.05-0.15	0.03-0.09
Riboflavina (mg)	0.05-0.2	0.05-0.4
Niacina (mg)	No disponible	0.2-0.5
Vitamina C (mg)	12.0-14.0	7.0-10.0
FST (mg EAG)	No disponible	390-410
Energía (kcal)	12-50	21-98
pH	No disponible	4.88-4.92
Acidez total (%)	No disponible	0.51-0.55

Fuente: Azad, 2000; Haq, 2006; Shamsudin et al., 2009; Vargas-Torres et al., 2017.

## **Compuestos bioactivos de pulpa de yaca y su actividad biológica**

### **Compuestos bioactivos**

Los compuestos bioactivos presentes en frutas y verduras, tales como compuestos fenólicos, carotenoides, vitaminas, fitoestrógenos, glucosinolatos y antocianinas están recibiendo mayor atención en el campo de la investigación debido a sus posibles beneficios sobre la salud humana. Actualmente, se recomienda el consumo de frutas con alta bioactividad, porque son efectivas en la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades (Yalcin y Çapar, 2017).

La pulpa de yaca contiene azúcar fermentable y contiene una alta concentración de carotenoides (De Faria et al., 2009). Cuando el fruto está maduro, los sólidos solubles totales alcanzan valores entre 20 y 25 °Bx, y el azúcar dominante es la sacarosa (Chandrika et al., 2005). Se determinó que el aroma de pulpa de yaca estaba dominado por isopentil isovalerato, acetato de butilo, isovalerato de etilo, isovalerato de butilo y acetato de isopentilo e isopentan-1-ol (Maia et al., 2004). La vitamina C, otro compuesto presente en la pulpa de yaca, es un antioxidante que protege al cuerpo contra los radicales libres (Jagtap et al., 2010). Uno de los factores que influye en el envejecimiento de la piel es el estrés oxidativo, la presencia de antioxidantes en la pulpa de yaca, en específico la vitamina C, actúa como inhibidor de la oxidación (Babitha et al., 2004).

### Compuestos fenólicos

La pulpa de yaca es una rica fuente de compuestos fenólicos, en la cual, se han registrado concentraciones de fenoles totales de aproximadamente 390 mg EAG/100 g y 23 mg/100 g de flavonoides (Saxena et al., 2009; Vargas-Torres et al., 2017). Los compuestos fenólicos han despertado mucho interés por su potencial como antioxidantes, debido a su gran abundancia en nuestra dieta y su posible papel en la prevención de diversas enfermedades asociadas al estrés oxidativo, como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Yalcin y Çapar, 2017).

Los estudios de cultivo celular en ratones han demostrado que los flavonoides de la pulpa de yaca son eficaces para inhibir la liberación de mediadores inflamatorios de los mastocitos peritoneales, neutrófilos y macrófagos. La dihidroisocicloartomunina inhibió la liberación de

$\beta$ -glucuronidasa e histamina de los mastocitos estimulados con P-metoxi-N-metilfenetilamina; la artocarpanona inhibió la liberación de lisozima de los neutrófilos estimulados con formil-Met-Leu-Phe (fMLP); y la cicloheteroilina, la artonina B, y la artocarpanona inhibieron la formación del anión superóxido en neutrófilos estimulados por fMLP (Wei et al., 2005).

En otro estudio se reportaron efectos antiinflamatorios *in vitro* de compuestos fenólicos aislados de extractos de acetato de etilo de pulpa de yaca. Tres compuestos fenólicos se caracterizaron como artocarpesina, norartocarpetina y oxirresveratrol. Los efectos antiinflamatorios de los compuestos aislados se evaluaron determinando sus efectos inhibidores sobre la producción de mediadores proinflamatorios en células macrófagas murinas (RAW 264.7) activadas por lipopolisacáridos (LPS). Los resultados indicaron que la artocarpesina (25  $\mu$ M) mostró la mayor reducción de producción de óxido nítrico de 49.6 a 0.7 nmol/mL, y prostaglandina E<sub>2</sub> de 39.1 a 4.3 ng/mL en células RAW 264.7 estimuladas por LPS, a través de la inhibición de las expresiones de las enzimas de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y ciclooxigenasa 2 (COX-2), respectivamente. La reducción de estos compuestos, así como la inhibición de las enzimas, pueden estar asociadas con la prevención y el tratamiento de las enfermedades inflamatorias inducidas por estrés oxidativo. Por lo tanto, los compuestos fenólicos aislados de la pulpa de yaca pueden proporcionar un posible enfoque terapéutico para los trastornos asociados a la inflamación (Fang et al., 2008).

Baliga et al. (2011) informaron que los fitonutrientes como los lignanos, isoflavonas y saponinas de la pulpa de yaca previenen la formación de células cancerosas en el organismo y luchan contra las úlceras de estómago.

### Carotenoides

De Faria et al. (2009) caracterizaron los carotenoides presentes en la pulpa de yaca (Cuadro 2.4), donde mencionan la presencia de  $\beta$ -caroteno, un antioxidante que protege a las células en contra de los efectos de la oxidación (Cuerdas et al., 2011). Los principales carotenoides en la pulpa de yaca son all-trans-luteína (24-44 %), all-trans-caroteno (24-30 %), all-trans-neoxantina (4-19 %), 9-cis-neoxantina (4-9 %) y 9-cisviolaxantina (4-10 %).

Cuadro 2.4. Concentración de carotenoides en pulpa de yaca ( $\mu\text{g}/100$  g de peso fresco).

<b>Carotenoides</b>	<b>Valor</b>	<b>Carotenoides</b>	<b>Valor</b>
All-trans-neoxanthin	$8.85 \pm 5.73$	All-trans-zeinoxanthin	$1.72 \pm 1.20$
9-cis-neoxanthin	$6.87 \pm 4.25$	9-cis-Zeinoxanthin	$0.90 \pm 1.12$
All-trans-neochrome	$0.88 \pm 1.11$	All-trans- $\alpha$ -cryptoxanthin	$0.35 \pm 0.60$
All-trans-luteoxanthin	$2.06 \pm 0.90$	All-trans- $\beta$ -cryptoxanthin	$1.21 \pm 0.45$
cis-antheraxanthin	$1.12 \pm 0.36$	15-cis- $\beta$ -carotene	$0.18 \pm 0.31$
9-cis-violaxanthin	$7.05 \pm 5.97$	13-cis- $\beta$ -carotene	$2.45 \pm 1.40$
cis-Luteoxanthin	$0.34 \pm 0.42$	All-trans- $\alpha$ -carotene	$1.24 \pm 0.93$
All-trans-lutein	$37.02 \pm 20.34$	All-trans- $\beta$ -carotene	$29.55 \pm 15.46$
All-trans-zeaxanthin	$0.96 \pm 1.20$	9-cis- $\beta$ -carotene	$0.79 \pm 0.30$

Fuente: De Faria et al., 2009.

Los carotenoides que contiene la pulpa de yaca son importantes para la prevención de enfermedades degenerativas crónicas, como cáncer, inflamación, enfermedades cardiovasculares, entre otras (Krinsky et al., 2003; Stahl y Sies, 2005; Dembinska-Kice et al., 2008). La pulpa de yaca contiene principalmente  $\beta$ -caroteno asociado a otros carotenoides, como luteína, licopeno y  $\beta$ -criptoxantina en menor cantidad (Ruiz-Montañez et al., 2014). Estos tipos de antioxidantes pueden desactivar los radicales libres mediante dos mecanismos: (1) reducción mediante transferencia de electrones y (2) transferencia de átomos de hidrógeno (Fan et al., 2011). Por otra parte, se han atribuido efectos positivos de algunos antioxidantes presentes en la pulpa yaca sobre la prevención de algunas enfermedades (Cuadro 2.5) (Devasagayam et al., 2004).

Cuadro 2.5. Prevención de enfermedades de compuestos antioxidantes de pulpa de yaca.

<b>Enfermedades</b>	<b>Antioxidantes</b>
Cáncer gástrico	Vitamina E, $\beta$ -caroteno
Cáncer de pulmón en fumadores	Vitamina E, $\beta$ -caroteno
Cáncer de próstata	Vitamina E
Cáncer de pulmón en trabajadores expuestos al asbesto	$\beta$ -caroteno + Vitamina A
Infarto de miocardio	Vitamina E
Enfermedad coronaria	$\beta$ -caroteno
Hipertensión	Vitamina C

Fuente: Devasagayam et al., 2004.

Zhu et al. (2017) evaluaron la actividad antioxidante *in vitro* de extractos de k (JackFruit Pulp Polysaccharides, JFP-Ps) midiendo las actividades de depuración de los radicales DPPH y

OH. Se observó la mayor capacidad de eliminación del extracto de JFP-Ps sobre el radical DPPH (69.64%) y el máximo efecto de depuración del radical OH (82.31%) a una concentración de 4 mg/mL. Estos resultados sugieren que los JFP-Ps ejercen fuerte actividad de eliminación de radicales DPPH y OH, pero son mucho más débiles que la de la vitamina C (91.16 y 98.48%, respectivamente).

En otro estudio, Zhu et al. (2019) investigaron los efectos de la digestión *in vitro* (saliva, digestión gástrica e intestinal) de un extracto acuoso de JFP-Ps sobre ensayos antioxidantes (eliminación de radicales OH y O<sup>2-</sup>). Los resultados indicaron que los productos intestinales digeridos de los JFP-Ps mostraron fuerte actividad de eliminación de radicales hidroxilo y superóxido de manera dependiente del tiempo a 1, 2 y 4 horas de digestión, la actividad de eliminación del radical OH aumentó a medida que transcurría el tiempo (79.4 ± 2.2, 86.9 ± 1.3 y 95.1 ± 2.1 %, respectivamente); al igual que la actividad de eliminación de aniones superóxidos (42.7 ± 2.4, 50.0 ± 2.8 y 54.7 ± 3.0 %, respectivamente).

En un estudio realizado por Ruiz-Montañez et al. (2015), se evaluaron los potenciales antimutagénico y antiproliferativo de extractos de pulpa de yaca, utilizando cepas de *S. typhimurium* (TA98 y TA100) y una línea celular cancerosa de linfoma de células B de murino (M12.C3.F6), respectivamente. La prueba de antimutagenicidad mostró que los extractos tienen un efecto inhibitorio sobre la mutagenicidad de 500 ng de aflatoxina B1 (AFB1) para ambas cepas de prueba, lo que sugiere la presencia de compuestos antimutagénicos en la pulpa de yaca. En el ensayo de actividad antiproliferativa, la subfracción F1 (IC<sub>50</sub>= 49.2 µg/mL) mostró la mayor actividad en la línea celular utilizada.

Por otra parte, los extractos acuosos de pulpa de yaca se podrían utilizar para inhibir la glicación de la hemoglobina. Se ha encontrado que a mayor concentración de los extractos, mayor es el porcentaje de inhibición de la glicación de la hemoglobina (IC<sub>50</sub>= 56.43 %). La inhibición podría ser causada por la presencia de componentes fitoquímicos presentes en el extracto de pulpa de yaca como el ácido ascórbico, β-caroteno y licopeno. El resultado de este estudio sugiere que el extracto tiene potencial como agente antidiabético porque se pueden reducir los niveles de hemoglobina glucosilada (HbA1c) (Biworo et al., 2015).

## 2.2 Bebidas fermentadas

### 2.2.1 Generalidades y normatividad de la producción de bebidas fermentadas

Se le considera bebida alcohólica fermentada al producto resultante de la fermentación alcohólica de materias primas, a las cuales puede adicionarse ingredientes y aditivos permitidos, con contenido alcohólico de 2 a 20%. De acuerdo con la norma mexicana sobre bebidas alcohólicas, se consideran bebidas alcohólicas fermentadas a la cerveza, pulque, sake, sidra y vino (NOM-199-SCFI-2017).

La producción de bebidas fermentadas a base de frutos se encuentra en pleno desarrollo, y muchas frutas tropicales se utilizan en el proceso: la naranja (Corazza et al., 2001), manzana, mangaba, ciruela (Muniz et al., 2002), acerola (Santos et al., 2005), yaca (Neto y Cruz, 2010; Panda et al., 2016; Jagtap et al., 2011), entre otras.

Sin embargo, en México no existe una norma que englobe a las bebidas fermentadas a base de frutos tropicales. Esta situación ha llevado a las investigaciones realizadas sobre bebidas fermentadas o con producción alcohólica a base de frutos a utilizar los estándares de calidad del vino establecidos en la norma mexicana (Cuadro 2.6) (NOM-199-SCFI-2017).

Cuadro 2.6. Especificaciones de la calidad del vino.

Especificaciones	Límites	
	Mínimo	Máximo
Contenido de alcohol a 20 °C (%)	8	16
Extracto seco (g/L)	10	50
Cenizas (g/L)	1	5
Azúcares o Azúcares reductores totales (g/L)	4	>50
Acidez total (como ácido tartárico en g/L)	3.5	9
Bióxido de azufre libre (mg/L)	-	50
Bióxido de azufre total (mg/L)	-	350
Calcio (expresado en óxido de calcio) (mg/L)	-	300
Sodio (mg/L)	-	230
Potasio (mg/L)	-	1,700
Sulfatos (expresado como sulfato de potasio) (mg/L)	-	1,200
Cloruros (expresado en cloruro de sodio) (mg/L)	-	1,000

Fuente: NOM-199SCFI-2017.

## 2.2.2 Bebidas fermentadas a base de frutos

Las bebidas fermentadas a base de frutos son bebidas alcohólicas obtenidas por la fermentación parcial o completa de jugos frescos, concentrados o reconstituidos; o macerados de pulpa con o sin la adición de agua, azúcar o aditivos. Finalizada la fermentación se puede adicionar jugo fresco, concentrado o reconstituido y pueden ser sin carbonatar o carbonatados por la inyección de CO<sub>2</sub> o por fermentación secundaria (Jarvis, 1996).

Existen investigaciones acerca de la fermentación alcohólica de frutos y vegetales donde se estudiaron los efectos que tiene el proceso de fermentación sobre la composición y concentración de los compuestos bioactivos (Cuadro 2.7).

Cuadro 2.7. Efecto de la fermentación sobre compuestos bioactivos de frutos y vegetales.

<b>Materia prima</b>	<b>Microorganismo empelado</b>	<b>Efecto de la fermentación sobre compuestos bioactivos en estudio</b>	<b>Referencia</b>
Yaca	<i>S. cerevisiae</i>	El contenido de ácido ascórbico del mosto fue 2.86 g/100 mL, se observó una reducción en la bebida fermentada (1.78 g/100 mL); el contenido fenólico fue de 0.78 g/100 mL tanto para el mosto como para la bebida fermentada.	Panda et al. (2016)
Algarroba	<i>S. cerevisiae</i>	La bebida fermentada de algarroba tuvo un contenido significativo de fenol total (8.43 mg EAG/mL), tanino condensado (28.1 mg EAT/100 mL) y contenido de flavonoides (55.3 mg ER/mL).	Elfazazi et al. (2020)
Naranja	<i>P. kluyveri</i>	El valor del contenido fenólico total, flavonoides y carotenoides obtenido en el jugo fue de 793 mg/L, 30.8 mg/L y 5.8 mg/L, respectivamente. Durante la fermentación, el contenido total de fenólicos disminuyó significativamente (722 mg/L); el contenido total de flavonoides y carotenoides aumentó significativamente (95.7 mg/L y 6.3 mg/L).	Escudero et al. (2013)

Betabel	<i>S. cerevisiae</i>	El jugo de betabel tenía un contenido de polifenoles totales de 1,950 mg EAG/L, para la bebida fermentada se observó una disminución (1,311.34 mg EAG/L).	Apaza y Choque (2018)
Tomate	<i>S. bayanus</i>	El contenido de licopeno en los vinos de tomate fue similar ( $\approx 4.2$ mg/100g) independiente de la concentración de azúcares utilizados para la fermentación.	Kim et al. (2010)
Baya de goji	<i>S. cerevisiae</i>	La fermentación de las bayas de goji condujo a una reducción en la concentración de carotenoides del 17%. Los autores indicaron que la combinación de oxígeno, el calor y la luz durante el proceso y almacenamiento podría ser la causa principal.	Reis et al. (2014)
Manzana	<i>S. cerevisiae</i>	Al final de la fermentación, se mejoró el perfil aromático. Dentro de la región aromática de los espectros, las señales debidas a trigonelina (9.243, 8.908 y 8.085 ppm), ácido fórmico (8.361 ppm), fumarato (6.552 ppm), ácido cafeico (7.565 y 6.257 ppm) y calcona (7.964, 7.979 y 7.316 ppm) fueron detectados.	Cusano et al. (2018)
Fresa	<i>S. cerevisiae</i>	La fermentación alcohólica de purés de fresa disminuyó el contenido de antocianinas. Los autores sugieren que los derivados fermentados de la fresa son fuente de bioactivos antioxidantes.	Hornedo-Ortega et al. (2016)

---

### 2.3 Bebida fermentada denominada kombucha

La kombucha es una bebida obtenida a partir del té negro o té verde endulzado y fermentado por un cultivo simbiótico de microorganismos compuesto por bacterias y levaduras, el cual, en condiciones aerobias y en un período de 7 a 10 días es capaz de producir una bebida refrescante, ligeramente ácida y carbonatada, compuesta de varios ácidos orgánicos, aminoácidos, vitaminas y algunas enzimas hidrolíticas (Malbaša et al., 2011). Se compone de dos fases: una biopelícula flotante y una fase líquida ácida. El ácido acético, el ácido glucónico y el etanol son los componentes principales del líquido y de la biopelícula (Czaja et al., 2006).

La fermentación de la kombucha resulta de la combinación de tres fermentaciones diferentes: alcohólica, láctica y acética. Las bacterias y levaduras presentes en el medio crean una poderosa simbiosis capaz de inhibir el crecimiento de microorganismos contaminantes (Vitas et al., 2013). El cultivo microbiano de la kombucha se compone principalmente de bacterias del ácido acético (especies de *Komagataeibacter*, *Gluconobacter* y *Acetobacter*) (De Roos y De Vuyst, 2018), bacterias del ácido láctico (*Lactobacillus* y *Lactococcus*) (Marsh et al., 2014) y levaduras (*Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Torulaspota delbrueckii* y *Brettanomyces bruxellensis*) (Coton et al., 2017) (Cuadro 2.8).

Cuadro 2.8. Composición microbiana de la colonia de kombucha.

Bacterias	<i>Acetobacter xylinum</i> , <i>Acetobacter aceti</i> , <i>Acetobacter pasteurianus</i> , <i>Gluconobacter</i> .
Levaduras	<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> subsp. <i>Aceti</i> . <i>Saccharomyces cerevisiae</i> subsp. <i>Cerevisiae</i> , <i>Schizosaccharomyces</i> , <i>Torula</i> , <i>Torulaspota delbrueckii</i> , <i>Torulopsis</i> , <i>Zygosaccharomyces</i> , <i>Zygosaccharomyces</i> , <i>Zygosaccharomyces bailii</i> , <i>Zygosaccharomyces rouzii</i> .

Fuente: Greenwalt et al. (2000).

### **2.3.1 Propiedades y características de la bebida kombucha**

Varios estudios han demostrado que el espectro microbiano del cultivo de kombucha, también llamado SCOBY (Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeasts) puede variar entre fermentaciones (Chakravorty et al., 2016; Coton et al., 2017; Reva et al., 2015).

La celulosa microbiana se produce extracelularmente en forma de fibrillas que se adhieren a la célula bacteriana. Cada fibrilla tiene entre 50 y 80 poros o terminales complejos con un diámetro de 3.5 nm para extruir la celulosa fuera de su membrana. Estas fibrillas se ensamblan posteriormente formando fibrillas más gruesas llamadas macrofibrillas que crean una estructura tridimensional de aproximadamente 1,000 cadenas de glucanos individuales que pueden contener hasta 200 veces más agua de su masa seca y poseen alta conformabilidad y gran elasticidad. Las bacterias producen dos formas de celulosa, celulosa I y celulosa II. La celulosa I es un polímero en forma de cinta compuesto por microfibrillas, mientras que la celulosa II es un polímero amorfo termodinámicamente más estable que la celulosa I (Podolich et al., 2016).

En el primer estado, las bacterias productoras de celulosa aumentan su población mediante el consumo de oxígeno disuelto. Durante este tiempo, el microorganismo sintetiza cierta cantidad de celulosa en el medio líquido y solo las bacterias que se encuentran en la interfaz aire/medio pueden mantener su actividad y producir celulosa, que está formada por capas superpuestas. A medida que avanza el tiempo de fermentación, el espesor de la membrana aumenta por la generación de nuevas capas en la superficie, formando una estructura suspendida en el medio de cultivo. El desarrollo de la biopelícula junto con los enlaces de hidrógeno y C-H continúan durante toda la fermentación, su síntesis llegará a su límite cuando crezca hacia abajo atrapando todas las bacterias, que luego se volverán inactivas debido al suministro insuficiente de oxígeno (Esa et al., 2014). Las bacterias que quedan en la fase líquida del medio de cultivo se encuentran en estado latente y pueden reactivarse y utilizarse como inóculo en una fermentación posterior (Ruka et al., 2012).

La capacidad de los microorganismos del cultivo microbiano de producir una mayor cantidad de ácidos orgánicos da lugar a un bajo pH, con lo que se impide el crecimiento de microorganismos patógenos no deseados y se garantiza la seguridad de la bebida fermentada (Chen y Liu, 2000). Los análisis de la composición química de kombucha, demuestran la

presencia de varios ácidos orgánicos, como el acético y el glucónico, además de azúcares, etanol, compuestos fenólicos, entre otros. Las bacterias del ácido acético convierten la glucosa en ácido glucónico y la fructosa en ácido acético. El ácido acético estimula a las levaduras a producir etanol, y la presencia de etanol facilita el crecimiento de las bacterias del ácido acético y, por consecuencia, la producción de ácido acético (Jayabalan et al., 2014). Se ha informado que tanto el etanol como el ácido acético tienen actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas (Liu et al., 1996). Los valores medios de los parámetros fisicoquímicos de kombucha se puede ver en el Cuadro 2.9.

Cuadro 2.9. Parámetros fisicoquímicos de kombucha.

Parámetro fisicoquímico	
Acidez total (% de ácido acético)	1.06 ± 0.02
pH	3.98 ± 0.03
Etanol (g/L)	0.43 ± 0.08
Azúcares reductores totales (g/L)	3.17 ± 0.28

Fuente: Santos et al., 2017.

El conocimiento de la composición y las propiedades fisicoquímicas de la kombucha es crucial para comprender mejor su cinética. Sin embargo, la composición y la concentración de metabolitos producidos durante la fermentación de kombucha dependen de la fuente del inóculo (Nguyen et al., 2015), de la concentración de azúcar y de té (Fu et al., 2014; Watawana et al., 2017), del tiempo de fermentación (Chen y Liu, 2000) y de la temperatura (Jayabalan et al., 2008), y cualquier cambio de estas condiciones puede afectar al producto final. La composición química de la kombucha determinada en diferentes tiempos de fermentación y las concentraciones iniciales de sacarosa a partir de té negro se puede observar en el Cuadro 2.10 (Greenwalt et al., 2000).

Cuadro 2.10. Composición química de la kombucha.

Fermentación (días)	Sacarosa inicial	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Ácido glucónico	Etanol	Ácido acético
10	70	18.2	28.8	16.4	2.8	3.6	2.1
30	70	0	30.2	0.35	8.9	7	13.1
10	70	17	-	-	12	<1	3
25	70	4	-	-	31	0	2
10	226	-	-	25	3.1	-	2
13	226	-	-	15.03	6.64	-	8.61
30	226	-	-	17.04	7.21	-	3.4

Todas las concentraciones están en g/L. No se midieron los metabolitos con quiones.

Fuente: Greenwalt et al., 2000.

La variación de los tiempos de fermentación en los diferentes estudios se debió a que se quería evidenciar el tiempo necesario que se requiere para que la sacarosa fuera hidrolizada en los monosacáridos de glucosa y fructosa, y al mismo tiempo observar la producción de los compuestos mayoritarios producidos en la fermentación de kombucha con diferentes concentraciones de sacarosa inicial. Se determinó que el ácido acético, el ácido glucónico y el etanol eran los constituyentes principales de los fermentos probados. Los niveles de ácido glucónico y acético varían, pero generalmente se considera que están presentes en cantidades iguales en el producto fermentado. Se ha demostrado que estos y todos los componentes de la kombucha varían entre fermentaciones (Greenwalt et al., 2000). Por otra parte, se encontró que el nivel de metabolitos presentes en la bebida terminada está directamente relacionado con la cantidad de edulcorante utilizado (Blanc, 1996).

### 2.3.2 Efectos biológicos de la bebida kombucha

La kombucha es una bebida fermentada, ácida y con notables beneficios sobre la salud (Dickmann et al., 2017). Se han estudiado los efectos antioxidante, antiinflamatorio, anticancerígeno, antihiper glucémico y antimicrobiano de la kombucha.

#### Actividad antioxidante

Ahmed et al. (2020) demostraron que la actividad antioxidante de diferentes tipos de kombucha (té verde, cebada y arroz) aumentó con el tiempo de fermentación para alcanzar

los valores más altos después de 8, 10 y 12 días de fermentación, respectivamente. También, Amarasinghe et al. (2018) encontraron una mejora significativa de la actividad antioxidante de kombucha en un período de 12 días de fermentación mediante los ensayos de capacidad de eliminación del radical de oxígeno (ORAC) y del radical DPPH.

En otro estudio, la kombucha elaborada a partir de té negro presentó una capacidad antioxidante superior (65.32%) en relación con la preparada a partir del té verde. La diferencia en la capacidad antioxidante (ABTS) entre las kombuchas de té verde y de té negro puede explicarse debido a la mayor concentración de fenoles totales y también por la mayor diversidad y abundancia de las clases de compuestos fenólicos en la kombucha de té negro (Cardoso et al., 2020).

Con respecto a los compuestos fenólicos totales, la fermentación aumentó a un máximo de 88.8 ppm después de 8 días según el método de Folin-Ciocalteu (Ahmed et al., 2020). Lobo et al. (2017) encontraron que la conversión metabólica de los componentes del té durante la fermentación por enzimas microbianas puede contribuir al aumento de la actividad antioxidante de kombucha en comparación con el té sin fermentar. Torino et al. (2013) informaron que la bioconversión, mediante extracción e hidrólisis, de formas conjugadas de compuestos fenólicos a su forma libre durante la fermentación mejora su función saludable debido a que las formas libres de compuestos fenólicos son absorbidas con mayor facilidad.

Muchos efectos beneficiosos de la kombucha sobre la salud, como el alivio de la inflamación y la artritis, la prevención del cáncer y la mejora de la inmunidad pueden estar asociados a sus actividades antioxidantes, y estos efectos se atribuyen a la presencia de compuestos fenólicos y a ciertos ácidos orgánicos que también se producen durante la fermentación (Vijayaraghavan et al., 2000). Srihari y Satyanarayana (2012) encontraron que la actividad antioxidante y los compuestos fenólicos de la kombucha aumentaron gradualmente con el tiempo de fermentación. La capacidad antioxidante de la kombucha también se ve afectada por la temperatura (Jayabalan et al., 2008) y el tiempo de fermentación (Chu y Chen, 2006).

### **Actividad antiinflamatoria**

Villarreal-Soto et al. (2019) realizaron un estudio donde evaluaron la actividad antiinflamatoria del té negro no fermentado y del té negro fermentado con el cultivo

microbiano de kombucha contra la enzima 5-lipooxigenasa (5-LOX), implicada en la inflamación gástrica, en el cual se obtuvo una mejora en esta actividad después de la fermentación. El té sin fermentar obtuvo un 66 % de inhibición y el té fermentado obtuvo valores entre 87-91 % después de 21 días de fermentación. Se obtuvo un valor de la concentración inhibitoria media máxima (IC50) de  $9.0 \pm 0.0 \mu\text{g/mL}$ , el cual está cerca del valor de la IC50 del ácido nordihidroguaiarético ( $7.0 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$ ), el inhibidor natural de la enzima. Estos resultados indican que el extracto de kombucha puede ser potencialmente eficaz como inhibidor de la enzima 5-LOX, y, por ende, presentar actividad antiinflamatoria.

### **Actividad anticancerígena**

Los extractos de kombucha de té negro se probaron contra líneas celulares de cáncer de mama humano (MCF-7) y cáncer de colon humano (HCT-116) donde se observó una mejora de la actividad anticancerígena después de la fermentación para ambas líneas celulares. La fermentación de kombucha logró producir compuestos bioactivos con diferentes polaridades, obteniendo un aumento de inhibición en todos los extractos probados, en comparación con el té no fermentado (Villarreal-Soto et al., 2019).

Cardoso et al. (2020) analizaron el efecto citotóxico/citoprotector *in vitro* de los extractos de kombucha de té negro y de té verde en relación con líneas celulares de adenocarcinoma epitelial de pulmón (A549), adenocarcinoma colorrectal ileocecal (HCT8), adenocarcinoma colorrectal epitelial (CACO-2) y célula pulmonar normal (IMR90), donde demostraron que los extractos de kombucha utilizados inhiben el crecimiento en un 50 % (IC50, IG50 y LC50), lo que indica que las células fueron inhibidas, sin embargo, las células pulmonares no cancerosas exhibieron valores de IG50 más altos para ambos extractos ( $>200 \mu\text{g/mL}$ ) en comparación con todas las células cancerosas. Estos resultados sugieren que los extractos tienen mejor actividad citotóxica en las líneas de células cancerosas en comparación con la línea de células no cancerosas, lo que significa que los extractos poseen acción antiproliferativa y efectos anticancerígenos.

Deghrigue et al. (2013) obtuvieron resultados donde la kombucha de té verde exhibió efectos citotóxicos más altos contra células cancerosas que los de la kombucha de té negro, donde obtuvieron una inhibición del 50 % de crecimiento celular a concentraciones de 250 y 200  $\mu\text{g/mL}$  contra líneas celulares de tumores humanos: carcinoma de células pulmonares (A549)

y carcinoma epidermoide (Hep-2), respectivamente. La kombucha de té negro reveló una citotoxicidad moderada contra la línea celular tumoral Hep-2 con una IC50 de 386 µg/mL y no tuvo efecto contra la línea celular A549.

Los principales mecanismos de los efectos antiproliferativos y anticancerígenos de los compuestos fenólicos presentes en la kombucha pueden estar asociados con su capacidad antioxidante atribuida a un mecanismo de captación de radicales libres (Ďuračková, 2010). Estos resultados indican que la kombucha puede ser una posible ventana terapéutica como agente anticancerígeno.

### **Actividad antihiper glucémica**

Srihari et al. (2013) evaluaron la eficacia antihiper glucémica de la kombucha en ratas diabéticas probando diferentes concentraciones de extractos durante 45 días. Observaron que la administración diaria de 6 mg/kg de peso corporal disminuía la hemoglobina glicosilada y aumentaba la insulina plasmática. La ingesta del extracto de kombucha disminuyó significativamente el nivel de glucosa en la sangre de las ratas cargadas de glucosa y este hecho podría atribuirse a la potenciación de aumentar la secreción pancreática de insulina de las células  $\beta$  al plasma o a la liberación de insulina ligada.

Bhattacharya et al. (2013) estudiaron el efecto protector de kombucha en diferentes órganos incluyendo páncreas, hígado, riñón y corazón de modelos de ratas diabéticas y los resultados obtenidos mostraron un potencial antidiabético significativo que permitió la restauración de los cambios fisiopatológicos inducidos.

La actividad antihiper glucémica de la kombucha se lleva a cabo mediante la liberación de insulina del páncreas, es decir, ejerce un efecto insulino trófico directo. Los polifenoles complejos de la kombucha, conocidos como teaflavinas y tearubiginas, podrían prevenir el daño y la muerte de las células  $\beta$  del páncreas y/o estimular la regeneración de este tipo de células en las ratas diabéticas (Srihari et al. 2013).

Finalmente, Coskun et al. (2005) han informado que la administración de polifenoles, como la quercetina y la epicatequina, a ratas diabéticas protegen la estructura de las células del páncreas, preservan la secreción de insulina y estimulan la regeneración de este tipo de células.

### 2.3.2.1 Actividad antimicrobiana de la kombucha

Zubaidah et al. (2018) realizaron ensayos de actividad antimicrobiana de jugo de salak (*Salacca zalacca*) fermentado con cultivo microbiano de kombucha contra las bacterias patógenas *S. aureus* y *E. coli*. Los resultados indicaron que durante la fermentación, la actividad antimicrobiana fue mejorada debido a la producción de ácidos orgánicos, como el ácido acético, y otros compuestos como proteínas, antibióticos, enzimas o diferentes metabolitos biosintetizados (Battikh et al., 2012).

Tu et al. (2019) evaluaron suero de soya fermentado con cultivo microbiano de kombucha frente a las bacterias *S. aureus*, *E. coli* y *B. subtilis*, y obtuvieron una mayor actividad antimicrobiana en comparación al suero no fermentado, debido principalmente al mayor contenido de isoflavonas agliconas producidas.

En otro estudio, Vitas et al. (2018) evaluaron la actividad antimicrobiana de bebidas elaboradas con infusiones de milenrama (*Achillea millefolium*) fermentadas con cultivo microbiano de kombucha contra seis bacterias: *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis* y *B. subtilis*; y dos levaduras: *C. albicans* y *A. niger*. Todas las bebidas producidas exhibieron actividad antimicrobiana y los valores de la concentración mínima inhibitoria (MIC) estuvieron en el rango de 9.8-312.5 µg/mL. Valores de la MIC por debajo de 100 µg/mL indican una fuerte actividad antibacteriana (Holetz et al., 2002).

Mizuta et al. (2020) utilizaron kombucha como antimicrobiano natural contra 5 especies de *Alicyclobacillus* (*A. acidoterrestris*, *A. herbarius*, *A. acidiphilus*, *A. cycloheptanicus* y *A. hesperidum*) en jugo de naranja reconstituido y obtuvieron una disminución de hasta 4 logs utilizando 8 veces el valor de la MIC del antimicrobiano, pero no lograron eliminar toda la población microbiana.

La fermentación de kombucha ocasiona que el pH descienda y que la concentración de ácidos orgánicos aumente. El efecto combinado de un pH bajo más una concentración elevada de ácidos orgánicos conduce a una acidificación del citoplasma microbiano, usualmente suficiente para restringir el desarrollo microbiano (Mani-López et al., 2012). Los compuestos fenólicos, como los flavonoides se conocen como potentes agentes antimicrobianos (Zubaidah et al., 2018) y es posible determinar que a medida que transcurre el tiempo de

fermentación de la kombucha, las concentraciones de estos compuestos aumentan gradualmente (Chakravorty et al., 2016).

### **Actividad antivirulencia**

El uso de bebidas como la kombucha o sus compuestos bioactivos como agentes antivirulentos es un método alternativo para superar la creciente aparición mundial de resistencia antimicrobiana en los patógenos entéricos. Bhattacharya et al. (2020) estudiaron la actividad antivirulenta *in vitro* e *in vivo* de una fracción polifenólica aislada (compuesta principalmente por catequina e isoramnetina) de kombucha contra el *Vibrio cholerae*, el agente causal del cólera, una grave enfermedad diarreica transmitida por el agua que afecta aproximadamente de 1.3 a 4 millones de personas y mata entre 21,000 y 143,000 personas anualmente en todo el mundo (WHO, 2018).

En dicho estudio se centraron en investigar los efectos antivirulentos de la fracción polifenólica de kombucha al atacar la motilidad y la actividad proteolítica de la cepa, ya que estos factores son cruciales para colonizar las células durante la etapa inicial de infección del microorganismo. Los resultados reportados indicaron que la fracción polifenólica inhibió significativamente la motilidad del enjambre bacteriano y la expresión de los genes reguladores flagelares *motY* y *flaC*, incluso en concentraciones subinhibitorias. De la misma forma, los compuestos polifenólicos también disminuyeron la secreción de proteasa bacteriana y la penetración de las células bacterianas a través de la capa de la mucina (Bhattacharya et al., 2020).

El estudio *in vivo* reveló que la fracción polifenólica inhibió significativamente la acumulación de fluidos inducida por *V. cholerae* en un modelo de bucle ileal de conejo y la colonización intestinal en un modelo de ratones lactantes. Por lo tanto, la actividad antivirulencia de la fracción polifenólica de kombucha produce la inhibición de la motilidad y la secreción de proteasas de *V. cholerae*, con lo que se impide la acumulación de líquido y la colonización bacteriana en las células epiteliales intestinales (Bhattacharya et al., 2020).

Los polifenoles, catequina e isoramnetina, los dos principales componentes antibacterianos identificados en la fracción polifenólica de kombucha, pertenecen a las clases flavan-3-ol y flavonol, respectivamente (Bhattacharya et al., 2016). Estas clases de compuestos fenólicos

exhiben una potente actividad antimicrobiana y son capaces de suprimir diferentes factores responsables de la virulencia microbiana, como la neutralización de diferentes toxinas bacterianas, la inhibición de la formación de biopelículas, así como la reducción de la adhesión del huésped y los ligandos (Cardoso et al., 2018).

### **2.3.3 Kombucha con frutas**

En un estudio reciente se evaluaron las propiedades antioxidantes del agua de coco rey (*Cocos nucifera* var. *aurantiaca*) sometido a fermentación con el cultivo microbiano de kombucha. Se utilizaron cocos frescos con 7 meses de madurez, el agua de coco se inoculó aseptícamente con 3 % (p/v) de cultivo microbiano de kombucha y se sometió a fermentación durante 7 días a  $24 \pm 3$  °C (Watawana et al., 2016).

Al término de la fermentación se observó un aumento en la población total de bacterias y levaduras en la bebida fermentada, el aumento fue indicativo del éxito de la subsistencia de los microorganismos en el agua de coco, confirmando así su capacidad de prosperar en los entornos con una tendencia similar a la del sustrato comúnmente utilizado para kombucha (té negro y té verde). También se observó un aumento significativo del contenido fenólico total (24 mg EAG/g) al final del período de fermentación en comparación con la muestra de control no fermentada (15 mg EAG/g). Los resultados de los ensayos DPPH, FRAP, ABTS y ORAC indicaron un aumento significativo de la actividad antioxidante al final del proceso de fermentación (65 mL/L (EC50), 1,900, 89 y 1,400  $\mu\text{mol ET/g}$ , respectivamente) en comparación con el control no fermentado (90 mL/L, 1,100, 97 y 400  $\mu\text{mol ET/g}$ , respectivamente) (Watawana et al., 2016). La hipótesis de este incremento fue explicada por Blanc (1996), que indicó que las enzimas de las bacterias y levaduras del cultivo microbiano de kombucha eran capaces de biotransformar diversos fitoquímicos, existentes en el té, en compuestos fenólicos.

Ayed et al. (2016) desarrollaron una bebida fermentada usando jugo de uva roja como sustrato alternativo en la fermentación con cultivo microbiano de kombucha e investigaron las características químicas, sensoriales, actividades antioxidantes y antimicrobiana de la bebida. El pH del jugo fermentado disminuyó de 3.95 a 2.90 y simultáneamente se observó un aumento de los ácidos orgánicos, esta disminución de pH y aumento de ácidos orgánicos

puede ser beneficioso para prevenir la degradación química de los compuestos fenólicos y mantener el color de la bebida (Torskangerpoll y Andersen, 2005).

El contenido máximo de etanol se obtuvo en el octavo día de fermentación (0.67 g/L), seguido de una lenta disminución. Chen y Liu (2000) explicaron que la disminución de etanol se debe al bajo valor de pH y la disminución de la concentración de azúcar en el caldo a medida que avanza la fermentación. El contenido fenólico total del jugo fermentado aumentó significativamente (3 mg EAG/mL). Chu y Chen (2006) explicaron este aumento tanto por la síntesis de enzimas del cultivo microbiano de kombucha como por la hidrólisis ácida.

En este estudio se utilizaron dos ensayos de reducción de radicales (ABTS y DPPH) para determinar la actividad antioxidante del jugo fermentado. La actividad de eliminación de radicales de DPPH y ABTS aumentó en 55.7 y 38.1 %, respectivamente, después de 6 días de fermentación y luego se estabilizó (Ayed et al., 2016). La actividad antimicrobiana se determinó utilizando el método de difusión de pozos y se probaron con las siguientes bacterias: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *B. cereus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *E. coli*. El jugo fermentado mostró actividad antibacteriana hacia todas las bacterias analizadas, lo que puede atribuirse principalmente al aumento de la producción de ácido acético pero también a la biosíntesis de otros metabolitos durante el proceso de fermentación (Ayed et al., 2016). El ácido acético, así como otros ácidos orgánicos pueden influir en la actividad antimicrobiana por dos mecanismos primarios: la acidificación citoplasmática y la acumulación del anión ácido disociado en niveles tóxicos (Mani-López et al., 2012).

La evaluación sensorial fue realizada por 20 panelistas entrenados para evaluar la intensidad del aroma, el dulzor, la acidez, el color y la aceptabilidad general de la bebida. El jugo fermentado de 6 días tenía un buen aspecto y una alta aceptabilidad, al contrario del zumo fermentado de 12 días que tenía un sabor avinagrado (Ayed et al., 2017). Reiss (1994) informó que una bebida refrescante con sabor a fruta se producía dentro de 6 a 10 días de fermentación y que su prolongación producía un sabor distintivo parecido al del vinagre.

Yavari et al. (2010) y Yavari et al. (2011) optimizaron la producción de ácido glucurónico usando cultivo microbiano de kombucha en el jugo de cereza (2010) y uva (2011). El ácido glucurónico es un componente clave en la salud humana debido a su acción desintoxicante mediante la conjugación con los metabolitos xenobióticos en el hígado y asociado con el

cartílago, demostrando un beneficio sustancial en el tratamiento de la osteoartritis (Frank y Günther, 1991). Las condiciones óptimas para la fermentación de los jugos de cereza y uva endulzados con sacarosa (8 y 7 g/L, respectivamente) para la producción máxima de ácido glucurónico (132.5 y 178 g/L, respectivamente) fueron a una temperatura de 37 °C durante 14 días (Yavari et al., 2010; Yavari et al., 2011).

Con el objetivo de aumentar los beneficios sobre la salud y la estabilidad de jugo de tuna, fue fermentado (30 °C durante 12 días) utilizando cultivo microbiano de kombucha (3 % (p/v)). La fermentación redujo el pH de 5.1 a 3.5 debido a la formación de ácidos orgánicos por la actividad fisiológica de las levaduras y las bacterias de ácido acético. Mientras que la acidez aumentó de 1.53 a 6.91 g/L durante los primeros 9 días y se mantuvo constante hasta el final de la fermentación (Ayed y Hamdi, 2015).

El contenido total de fenoles en la bebida fermentada de tuna aumento 23 % con respecto al jugo no fermentado, este aumento podría explicarse por la hidrólisis ácida y la bioconversión de compuestos fenólicos condensados. También se mejoró la actividad antioxidante de la bebida alcanzando el 81 % y el 65 % por los ensayos de eliminación de radicales DPPH y ABTS, respectivamente (Ayed y Hamdi, 2015).

El jugo de tuna fermentado inhibió todas las bacterias probadas (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *B. cereus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *E. coli*), dicha actividad antimicrobiana se atribuyó al contenido de ácido acético. La evaluación sensorial del jugo fermentado durante 6 días por panelistas entrenados mostró una alta aceptabilidad, ya que las cualidades gustativas del jugo de tuna seguían presentes (Ayed y Hamdi, 2015).

## **CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN**

### **CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN**

La yaca es un fruto con alto valor comercial en el mercado nacional e internacional, Nayarit es el principal productor de yaca en México, por lo que resulta que, la diversificación de productos a base de este fruto es una oportunidad para presentar alternativas de productos con valor agregado y buena aceptabilidad de consumo. Considerando la exquisitas de esta fruta, la pulpa de yaca contiene compuestos bioactivos como polifenoles, carotenoides y vitaminas, de los cuales se ha reportado tienen efectos positivos en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades. Por otra parte, la kombucha es una bebida fermentada cuya demanda ha ido en aumento además de que presenta propiedades biológicas benéficas, por lo que puede ser la base para el desarrollo de una bebida con pulpa de yaca que permita mejorar y preservar el valor nutricional y funcional, así como las cualidades sensoriales de la kombucha. El desarrollo de esta bebida puede beneficiar a los agricultores, creará empleos, abordará las pérdidas posteriores a la cosecha, brindará un producto alternativo en el consumo de bebidas probióticas con actividad biológica, y a largo plazo podría consolidarse a nivel nacional e internacional como una bebida característica de la región.

## **CAPÍTULO 4. OBJETIVOS**

## CAPÍTULO 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Desarrollar y analizar una bebida con potencial bioactivo a base de kombucha y pulpa de yaca (*Artocarpus heterophyllus* L.).

### 4.2 Objetivos específicos

Realizar una caracterización básica de la kombucha de té verde y de té negro (análisis fisicoquímicos, contenido de etanol, de proteínas, de grupos aminos libres, de carbohidratos solubles totales, de fenoles solubles totales y capacidad antioxidante).

Desarrollar y analizar diferentes formulaciones para determinar la concentración de pulpa de yaca (50 o 60 g/L) y el tipo de té (verde o negro) en las bebidas de kombucha con pulpa de yaca lixiviada y molida con las mejores propiedades fisicoquímicas, sensoriales y antioxidantes.

Desarrollar y analizar el crecimiento microbiano en las formulaciones de kombucha con pulpa de yaca lixiviada.

Caracterizar dos bebidas de kombucha con pulpa de yaca (lixiviada y molida), definir la forma de inclusión de la pulpa de yaca (lixiviada o molida) en la bebida kombucha, evaluar la calidad microbiológica de las formulaciones y realizar un análisis de prueba de ordenamiento por rangos entre las formulaciones desarrolladas y una kombucha comercial.

## **CAPÍTULO 5. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN**

## **CAPÍTULO 5. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN**

La elaboración de la bebida de pulpa de yaca con base en kombucha dará lugar a una bebida fermentada con potencial bioactivo y con características fisicoquímicas, sensoriales y microbiológicas aceptables para el consumidor.

## **CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS**

## CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo experimental se dividió en dos etapas, en la primera etapa se realizó una caracterización básica de la kombucha de té verde y de té negro, se determinó la concentración de pulpa de yaca (50 o 60 g/L) y el tipo de té (verde o negro) a utilizar para el desarrollo de la bebida; se realizaron las cinéticas de los análisis fisicoquímicos, contenido de etanol, de proteínas, de grupos aminos libres, de carbohidratos solubles totales, de fenoles solubles totales y capacidad antioxidante; de manera complementaria a las cinéticas se realizó un análisis del crecimiento microbiano en las formulaciones de kombucha con pulpa de yaca lixiviada y se culminó con un análisis sensorial. En la segunda etapa se caracterizaron dos formulaciones de kombucha con pulpa de yaca (lixiviada y molida) seleccionadas en la etapa anterior, se determinó la forma de inclusión de la yaca (lixiviada o molida), su calidad microbiológica y se realizó un análisis sensorial que permitió la comparación de las formulaciones desarrolladas con una kombucha comercial.

### **6.1 Etapa 1. Caracterización de kombucha de té verde y de té negro, determinación del tipo de té y la concentración de pulpa de yaca a utilizar en el desarrollo de la bebida kombucha y crecimiento microbiano en las formulaciones de kombucha con pulpa de yaca lixiviada**

#### **6.1.1 Material biológico**

Se trabajó con yaca denominada “*agüitada*”, producida en el municipio de Santiago Ixcuintla en el Estado de Nayarit. Los frutos fueron seleccionados sin daños físicos y tamaño uniforme con madurez fisiológica, fueron almacenados en cajas de cartón con separadores, para evitar daños, transportados y almacenados a temperatura ambiente (25 °C) hasta que se obtuvo un contenido de sólidos solubles totales entre 20 y 25 °Bx, los cuales se estimaron mediante un refractómetro (Bellingham Stanley Limited, USA).

#### **6.1.2 Obtención y análisis de la kombucha de té verde y té negro**

La kombucha tanto con té verde como con té negro fue elaborada en colaboración con microempresarios del Estado de Nayarit y se realizó una caracterización básica con base en análisis fisicoquímicos tal como se describen en la sección 6.3 de este capítulo.

### 6.1.3 Procedimiento

Con el procedimiento que se siguió fue posible determinar el tipo de té y la concentración de pulpa de yaca utilizada (Figura 6.1). Primero se calentó agua potable hasta ebullición, enseguida se sumergió té verde y té negro (12 g/L) en diferentes recipientes durante 15 minutos hasta obtener infusiones concentradas; cada infusión se dividió en dos partes para procesarlas de diferente manera.

Para la primera parte se añadió sacarosa comercial (50 g/L) a la infusión, se disolvió y se enfrió hasta temperatura ambiente (25 °C); posteriormente, se colocó en un fermentador y se añadió 80 mL/L de kombucha, proveniente de una fermentación realizada con anterioridad, que actuó como iniciador; la inoculación se realizó introduciendo 3% (p/v) de SCOBY y se incubó en oscuridad a 25 °C por 7 días. Al momento de culminar la fermentación, el producto se filtró y trasvasó en dos recipientes de igual volumen y se añadió 50 y 60 g/L de pulpa de yaca molida en un extractor de jugos (Breville, USA), se cerraron herméticamente y se almacenaron durante 3 días a 25 °C en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se almacenaron en refrigeración (4-7 °C).

Para la segunda parte se hicieron lixiviados de pulpa de yaca en trozos a diferentes concentraciones (50 y 60 g/L) junto con la infusión de té, se añadieron 50 g/L de sacarosa comercial y se enfrió a 25°C, posteriormente, se colocaron en fermentadores y se añadió 80 mL/L de kombucha; la inoculación, incubación, fermentación y filtrado del medio se hizo como se menciona en el párrafo anterior. Una vez filtrado el producto se añadió sacarosa comercial (6 g/L) y se almacenaron durante 3 días a 25 °C en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se almacenaron en refrigeración (4-7 °C).

Una vez obtenidos los tratamientos se realizó el análisis sensorial como se describe en el apartado 6.6 y se seleccionó el tipo de té y la concentración de pulpa de yaca con la que se trabajó en la segunda etapa, tanto para pulpa lixiviada como pulpa molida.

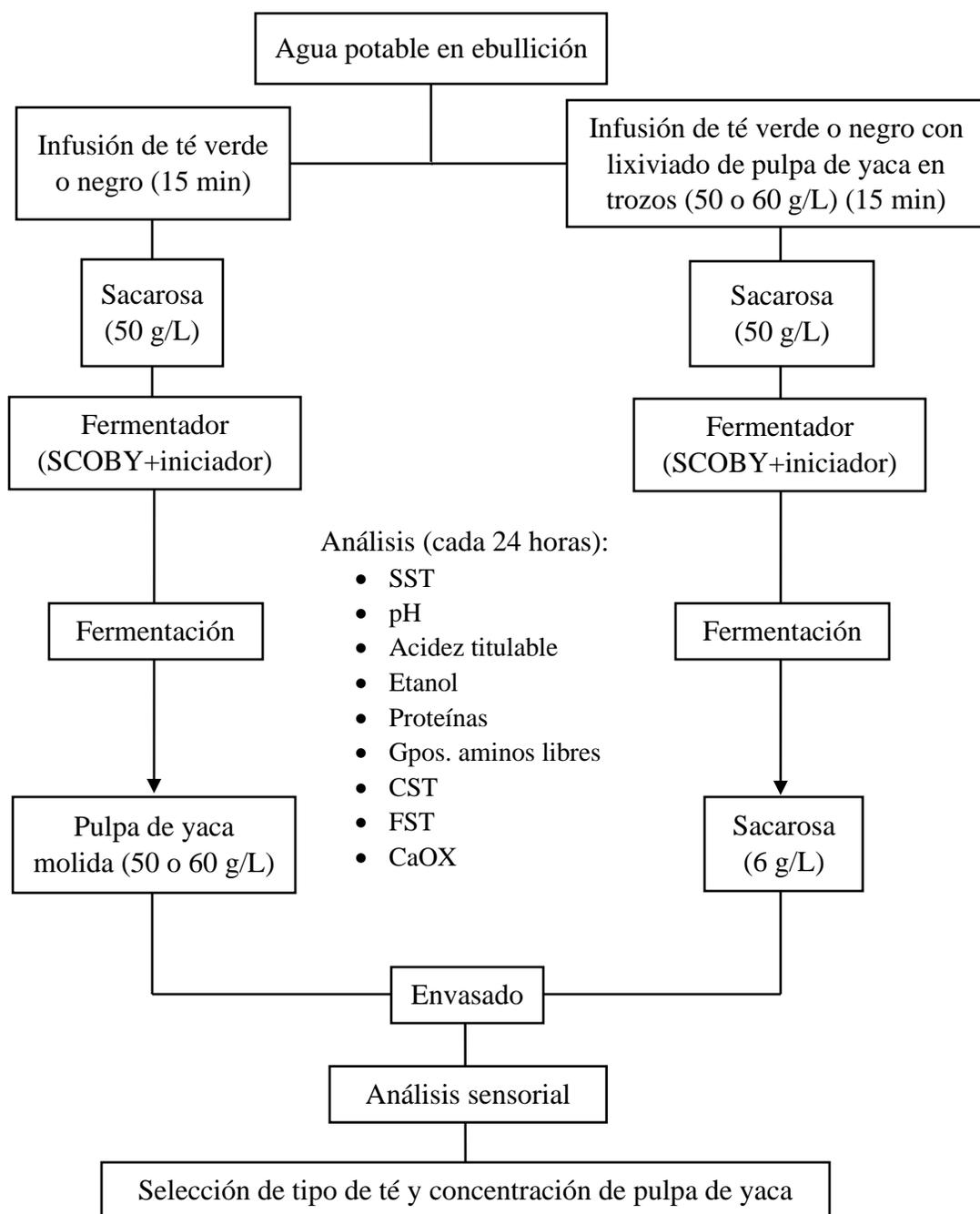


Figura 6.1 Diagrama de flujo del procedimiento para la determinación del tipo de té y la concentración de pulpa de yaca utilizar en el desarrollo de la bebida kombucha.

## **6.2 Etapa 2. Desarrollo de bebida kombucha con pulpa de yaca**

En esta etapa se caracterizaron las formulaciones seleccionadas en la etapa anterior, se seleccionó la forma de inclusión de la pulpa de yaca, se evaluó su calidad microbiológica y se realizó un análisis sensorial de las formulaciones desarrolladas y una kombucha comercial.

### **6.2.1 Metodología para el desarrollo de kombucha de té verde con pulpa de yaca lixiviada y molida**

Una vez elegido el té verde y la concentración de 60 g/L de pulpa de yaca, se volvió a elaborar la bebida fermentada de acuerdo con el diagrama de la Figura 6.2. La obtención del material biológico y de la kombucha se realizó como se describió en los apartados 6.1.1 y 6.1.2.

### **6.2.2 Desarrollo de la bebida de kombucha con pulpa de yaca**

El desarrollo de las bebidas se hizo de la misma forma que en la etapa 1, sólo que utilizando solamente el tipo de té y la concentración de pulpa de yaca seleccionada (té verde y 60 g/L de pulpa de yaca). Posterior al desarrollo de la bebida, se realizó un análisis sensorial de ordenamiento por rangos para elegir el mejor tratamiento (apartado 6.8), incluyendo el control de kombucha de té verde y una marca comercial de kombucha de té verde con tamarindo. Las metodologías a detalle de los análisis de la materia prima y del producto desarrollado con base al diagrama se presentan a continuación.

## **6.3 Análisis fisicoquímicos**

Con la finalidad de caracterizar la materia prima procesada, los análisis realizados a los frutos antes de someterlos al proceso de fermentación fueron los siguientes:

### Evaluación de sólidos solubles totales (SST)

Los sólidos solubles totales (°Bx, 20 °C) se analizaron en la pulpa de yaca y en las formulaciones de kombucha, empleando un refractómetro marca Bellingham Stanley Limited (USA) con corrección por temperatura, previamente calibrado con agua destilada según el método 932.12 (AOAC, 2005).

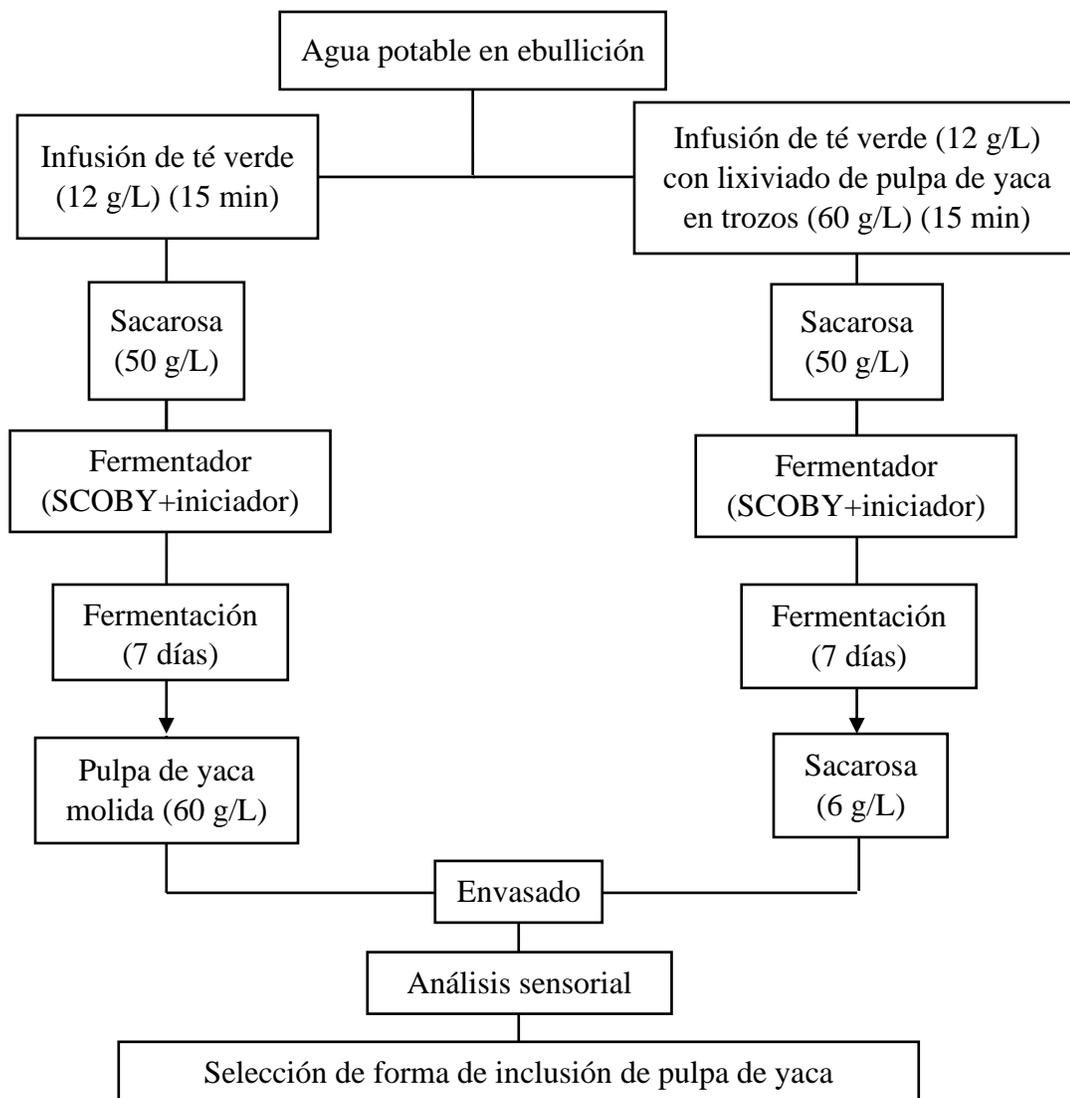


Figura 6.2 Diagrama de flujo para el desarrollo de kombuchas de té verde con 60 g/L de pulpa de yaca lixiviada y con 60 g/L de pulpa de yaca molida.

#### Determinación de pH

La determinación del potencial de hidrógeno se realizó utilizando un potenciómetro marca HANNA (USA) en 10 g de pulpa de yaca homogenizada y en 10 mL de kombucha, siguiendo el método 981.12 (AOAC, 2005).

### Evaluación de acidez titulable

La acidez titulable se determinó mediante el método 942.15 de la AOAC (2005) con la valoración de 5 g de muestra (pulpa de yaca o kombucha) con hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N y el resultado se expresó en porcentaje de ácido cítrico para la pulpa de yaca y ácido acético para la kombucha.

### **6.4 Elaboración de cinéticas de producción de etanol, proteínas, grupos aminos libres, carbohidratos solubles totales, presencia de fenoles solubles totales (FST) y capacidad antioxidante (CaOX) durante el proceso de fermentación de las formulaciones**

#### Evaluación del contenido de etanol

El contenido de etanol se determinó mediante el método de microdifusión en cámara de Conway propuesto por Hamilton y Rose (1985) con ligeras modificaciones (Martínez y Ramos, 2004). Se preparó una solución madre a partir de una solución sulfocrómica (500 mL de ácido sulfúrico al 12.88 % y 0.75 g de dicromato de potasio) y ácido sulfúrico al 13.72 %, la cual se ajustó a una absorbancia de 1 a una longitud de onda de 400 nm. Enseguida se preparó una solución de carbonato de potasio saturada (130 g en 100 mL de agua destilada). Se colocaron dos recipientes cilíndricos dentro de una caja de Petri, en el primer recipiente se colocaron 3 mL de la solución madre y en el segundo 2 mL de la solución de carbonato de potasio saturada y 1 mL de la muestra, posteriormente, las cajas de Petri se sellaron herméticamente con una película de polietileno y se colocaron en una estufa de secado a 35 °C por 20 minutos. Finalmente se midió la absorbancia de la solución madre (primer recipiente) a 400 nm. Se tomó como blanco el ácido sulfúrico al 13.72 % y se realizó una curva de calibración con soluciones etanólicas a concentraciones de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 % (v/v). Los resultados se expresaron en mL de etanol por cada 100 mL de muestra.

#### Determinación del contenido de proteínas

Las muestras de kombucha se depositaron en bolsas ziploc y almacenaron a -80 °C por 24 horas, posterior a esto, las muestras congeladas fueron sometidas a liofilización (Labconco Freezone, USA) a -50 °C y 0.1 mbar durante 72 horas. Las muestras fueron homogeneizadas y almacenadas en bolsas resellables a -20 °C (Torrey, USA).

El contenido proteico se determinó mediante el ensayo de Bradford (Bradford, 1976). Para la preparación previa de la muestra se utilizó la metodología propuesta por Meza-Espinoza et al. (2017), se mezclaron 25 mg de muestra liofilizada con 2 mL de buffer de fosfato de sodio 0.1 M (pH 6, 12.5 mM de L-cisteína). La reacción se llevó a cabo mezclando 100  $\mu$ L de la muestra con 1 mL del reactivo de Bradford (Sigma Aldrich, USA) y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos en oscuridad. La absorbancia se midió a 595 nm. El blanco se preparó sustituyendo el volumen de la muestra por el mismo volumen de fosfato de sodio 0.1 M. Se utilizó albúmina de suero bovino como estándar a concentraciones de 0 a 0.26 mg/mL. Los resultados se expresaron en mg/mL.

#### Cuantificación de grupos aminos libres ( $\alpha$ -NH<sub>2</sub>)

Se cuantificó la concentración de grupos aminos libres por el método del ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) propuesto por Adler-Nissen (1979) y empleada por Cheung y Li-Chang (2010). Para la determinación se disolvieron 25 mg de muestra liofilizada en 1 mL de buffer de fosfato de sodio (0.2 M, pH 8.2), enseguida se mezclaron 120  $\mu$ L de muestra con 1 mL de buffer de fosfato de sodio y 1 mL de TNBS 0.025 % (Sigma Aldrich, USA). La mezcla se incubó en oscuridad en una estufa a 50 °C durante 60 minutos. La reacción finalizó agregando 2 mL de HCl 0.1 N y se enfrió a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 minutos. Se midió la absorbancia a 340 nm. El blanco se preparó sustituyendo el volumen de muestra por un volumen igual de buffer de fosfato de sodio. Se preparó una curva de calibración de L-leucina a concentraciones de 0 a 0.4 mg/mL. Los resultados se expresaron en mg/mL.

#### Determinación de carbohidratos solubles totales (CST)

La cuantificación de los carbohidratos solubles totales se desarrolló por el método propuesto por Loewus (1952). Se pesaron 5 mg de muestra liofilizada y se disolvieron en 5 mL de etanol al 85 %. Se añadieron 0.5 mL de muestra en tubos de centrifuga y 20 mL de etanol al 85 %, se agitaron en vortex para después incubar por 30 minutos a 50 °C, enseguida se centrifugó por 15 min a 10,000 rpm, se recolectaron los sobrenadantes y se aforaron a 25 mL con etanol al 85 %. De este extracto se midió 1 mL por muestra, se agregó 0.5 mL de agua destilada y 2.5 mL del reactivo antrona al 0.2 %, enseguida se incubó a 100 °C por 10

minutos, se enfrió y se midió la absorbancia a 624 nm. Se preparó una curva de calibración de D-glucosa a concentraciones de 0 a 100  $\mu\text{g/mL}$ . Los resultados se expresaron en  $\text{mg/mL}$ .

#### Fenoles solubles totales (FST) y capacidad antioxidante (CaOX)

Los FST se extrajeron de 0.5 g de muestra liofilizada con 10 mL de una solución de metanol acidificado (2 %, HCl 2 N). La mezcla se agitó durante 30 minutos y se centrifugó (Hermle, Alemania) durante 20 minutos a 13,000 rpm a 4 °C. Los sobrenadantes se recuperaron en un matraz de 25 mL; al precipitado se le añadieron 10 mL de acetona y se repitió el mismo proceso, este sobrenadante se combinó con el anterior y se aforó a 25 mL con la combinación de la solución de metanol acidificado y acetona (50:50) (Pérez-Jiménez et al., 2008). Los FST se cuantificaron utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu según lo descrito por Montreau (1972) y modificado por Álvarez-Parrilla et al. (2011). Se colocó en microplaca por triplicado 12  $\mu\text{L}$  de muestra obtenida a partir de la extracción de fenoles, 12  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu, 116  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio (7.5 % (p/v)) y 164  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Se colocó la microplaca en agitación y en oscuridad durante 30 minutos y se midió la absorbancia en un lector de microplaca (Biotek, USA) equipado con un espectrofotómetro a 750 nm con ayuda del software Gen 5. La curva de calibración se realizó con ácido gálico y los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por mL de muestra (mg EAG/mL).

#### Método de eliminación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)

La técnica que se realizó fue propuesta por Prior y Cao, (2000). Se tomaron 40  $\mu\text{L}$  de la muestra utilizada en la determinación del contenido de FST y se depositaron por triplicado en celdas de microplaca, posteriormente se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de reactivo DPPH 190  $\mu\text{M}$ , se colocó la microplaca en agitación y en oscuridad por 30 minutos, una vez pasado el tiempo, se midió la absorbancia en un lector de microplaca (Biotek, USA) con el software Gen 5 a 517 nm. La curva de calibración se realizó con una solución de Trolox a concentraciones de 0 a 600  $\mu\text{M}$ . Los resultados se expresaron como mg equivalentes Trolox (Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) por mL de muestra (mg ET/mL).

### Poder antioxidante de reducción férrica (FRAP) en microplaca

La capacidad antioxidante mediante reducción férrica (FRAP) se realizó por el método de Benzie y Strain, (1996), modificado por Álvarez-Parrilla et al. (2010). La solución FRAP 10:1:1 (v/v/v) se preparó con un amortiguador de acetato de sodio (0.3 M; pH 3.6), TPTZ (2,4,6-Tripiridil-s-triazina) - HCl (10 mM-40 mM) y cloruro férrico hexahidratado (20 mM), se calentó a 37 °C antes de mezclarlo con las muestras. Se mezclaron 36 µL de la muestra utilizada en la determinación del contenido de FST por triplicado, 31 µL de agua destilada y 309 µL de solución de FRAP. La microplaca se colocó en agitación y en oscuridad durante 30 minutos y se midió la absorbancia a 595 nm usando un lector de microplaca (Biotek, USA). Los resultados se expresaron como mg equivalentes Trolox por mL de muestra (mg ET/mL).

### Poder antioxidante contra el radical 2,2-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)

El método de ABTS se realizó por el método de Pellegrini et al. (1999) y modificado por Álvarez-Parrilla et al. (2010). El radical ABTS se preparó utilizando 25 mL de fosfato de sodio (0.1 M; pH 7.4), 16.56 mg de persulfato de potasio y 96.02 mg de sal de diamonio de ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), los cuales se mezclaron y agitaron durante 16 horas, posteriormente, se ajustó la absorbancia a 0.7 a una longitud de onda de 730 nm. Para el análisis, se mezclaron 35 µL de la muestra utilizada en la determinación del contenido de FST y 265 µL de la solución de ABTS. La microplaca se colocó en agitación y en oscuridad durante 10 minutos y se midió la absorbancia a 730 nm usando un lector de microplaca (Biotek, USA). Los resultados se expresaron como mg equivalentes Trolox por mL de muestra (mg ET/mL).

## **6.5 Crecimiento microbiano**

Esta determinación se realizó a las formulaciones de kombucha con pulpa de yaca lixiviada. Para la determinación de este parámetro las formulaciones de kombucha se realizaron por separado desde el día 0 hasta el día 7, cada una con un volumen inicial de 500 mL; se realizaron análisis de crecimiento microbiano en el caldo (densidad óptica de crecimiento) y en la biopelícula (peso seco) cada 24 horas.

### 6.5.1 Densidad óptica de crecimiento (D.O.)

Se determinó la densidad óptica de crecimiento (D.O.) del caldo de fermentación homogeneizado a 600 nm utilizando un espectrofotómetro UV–Vis (Cintra, USA) (Malbaša et al., 2008). La curva de calibración se realizó determinando el peso seco de diferentes diluciones del caldo de fermentación ( $y=1.5224x+0.0064$ ). El resultado se expresó en g/L.

### 6.5.2 Crecimiento de biopelícula (peso seco)

El peso seco del SCOBY de las formulaciones de kombucha se determinó separando la biopelícula del caldo, enseguida se colocó sobre papel filtro y se hicieron tres lavados con agua destilada y finalmente se secó a 80 °C hasta peso constante (Malbaša et al., 2008). El resultado se expresó en g/L.

### 6.5.3 Parámetros de crecimiento microbiano

Fueron calculadas la velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ), la velocidad específica de consumo de sustrato ( $qS$ ), la velocidad específica de producción de un metabolito ( $qP$ ) y el rendimiento efectivo (%) de las muestras de kombucha con pulpa de yaca lixiviada.

$$\mu_{max} = \frac{\ln X}{t}; \quad qS = \frac{\mu_{max}}{\frac{Y_X}{S}}; \quad qP = \mu_{max} * \frac{Y_P}{X}$$
$$Y_{X/S} = \frac{X_1 - X_0}{S_0 - S_1}; \quad Y_{P/X} = \frac{P_1 - P_0}{X_1 - X_0}$$

Donde:

$\mu_{max}$ : velocidad específica máxima de crecimiento ( $h^{-1}$ ).

$qS$ : velocidad específica de consumo de sustrato.

$qP$ : velocidad específica de producción de un metabolito.

$\frac{Y_X}{S}$ : rendimiento de biomasa con respecto al sustrato.

$\frac{Y_P}{X}$ : rendimiento de producto con respecto a la biomasa.

$X$ : biomasa (g/L).

$S$ : sustrato (g/L).

$P$ : producto (g/L).

$t$ : tiempo (hrs).

$$\text{Rendimiento efectivo (\%)} = \frac{\text{Peso seco de la biomasa } \left(\frac{g}{L}\right)}{\text{Concentración inicial de sustrato } \left(\frac{g}{L}\right)} * 100$$

## **6.6 Análisis sensorial (etapa 1)**

El análisis sensorial para la primera etapa se realizó con panelistas preseleccionados no entrenados para definir las formulaciones de la bebida kombucha con pulpa de yaca lixiviada y con pulpa de yaca molida mediante una prueba hedónica con escala no estructurada (Pedrero y Pangborn, 1997). Todas las formulaciones se presentaron al azar y se sirvieron a la temperatura de consumo preferente (4 a 7 °C) en vasos de plástico transparente codificados, se brindó agua potable para enjuagar la boca entre cada muestra.

## **6.7 Calidad microbiológica**

Se realizaron análisis microbiológicos a las bebidas seleccionadas en la etapa 1 (KV, KV60L y KV60P), al momento de envasarlas y al mes de almacenamiento bajo refrigeración (4-7 °C). Para ello, se mezclaron 10 mL de cada muestra de kombucha con 90 mL de agua de peptona y se realizaron 7 series de diluciones. Las bacterias coliformes totales se evaluaron mediante el método de cuenta en placa en agar glucosa bilis rojo-violeta y se incubaron a  $35 \pm 2$  °C durante  $24 \pm 2$  horas (NOM-113-SSA1-1994). Las bacterias mesofílicas aerobias se evaluaron mediante cuenta en placa en agar para cuenta estándar y se incubaron a  $35 \pm 2$  °C durante  $48 \pm 2$  horas (NOM-092-SSA1-1994). Mohos y levaduras se evaluaron mediante cuenta en placa en agar papa dextrosa acidificado con ácido tartárico (10%, pH 3.5) y se incubaron a  $25 \pm 2$  °C durante  $120 \pm 2$  horas (NOM-111-SSA1-1994). El recuento de células se reportó como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

## **6.8 Análisis sensorial (prueba de ordenamiento por rangos)**

Para este análisis sensorial de la etapa 2, se realizó una prueba de ordenamiento por rangos según Pedrero y Pangborn (1997) con panelistas no entrenados para comparar los tratamientos seleccionados en la etapa 1 (KV60L y KV60P) con el control de té verde (KV) y con una kombucha comercial de té verde y tamarindo (KVT) de la marca “Solem” obtenida en un supermercado de Tepic, Nayarit. Todas las muestras se presentaron al azar y se

servieron a una temperatura entre 4-7 °C en vasos de plástico transparente codificados, se brindó agua potable para enjuagar la boca entre cada muestras.

## 6.9 Diseño experimental y análisis estadístico

Etapa 1, el diseño experimental con el que se trabajó en esta etapa fue un diseño factorial 2x3 (Cuadro 6.1), se aplicó un diseño factorial para las muestras de kombucha con pulpa de yaca lixiviada y otro para las muestras de kombucha con pulpa de yaca molida. En cada diseño factorial, el primer factor fue la concentración de pulpa de yaca en tres niveles (0, 50 y 60 g/L), y el segundo factor fue el tipo de té en dos niveles (verde y negro).

Cuadro 6.1. Factores y niveles para evaluar en la etapa 1 del estudio.

Factores	Niveles		
	1	2	3
Tipo de té	Verde	Negro	
Concentración de pulpa de yaca (g/L)	0	50	60

Etapa 2, en la segunda etapa se trabajó con un diseño unifactorial, donde el factor fue la forma de inclusión de la pulpa de yaca con 2 niveles (lixiviada y molida), con un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ . Los datos de cada variable fueron expresados como la media  $\pm$  desviación estándar (n=3) y se analizaron mediante el programa STATISTICA (USA).

## **CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Etapa 1. Caracterización básica de la kombucha de té verde y de té negro, determinación del tipo de té, de la concentración de pulpa de yaca lixiviada y molida a utilizar en el desarrollo de la bebida kombucha, desarrollo de las cinéticas de crecimiento microbiano en las formulaciones de kombucha con pulpa de yaca lixiviada y análisis sensorial.

En esta primera etapa se obtuvo la caracterización básica de la pulpa de yaca y las infusiones de té verde y de té negro (Cuadro 7.1): pH, contenido de sólidos solubles totales, acidez titulable, contenido de FST y capacidad antioxidante (DPPH, FRAP y ABTS).

Cuadro 7.1. Caracterización básica de la pulpa de yaca y las infusiones de té verde y té negro.

Parámetro	Pulpa de yaca	Infusión té verde	Infusión té negro
pH	4.85 ± 0.01	5.50 ± 0.04	4.72 ± 0.03
SST (°Bx)	27.20 ± 0.40	5.20 ± 0.00	5.30 ± 0.06
Acidez titulable (%)*	0.51 ± 0.01	0.04 ± 0.002	0.03 ± 0.00
FST**	2.01 ± 0.05	0.38 ± 0.01	0.35 ± 0.00
DPPH**	9.31 ± 0.25	0.2 ± 0.00	0.2 ± 0.00
FRAP**	2.19 ± 0.17	0.8 ± 0.03	0.68 ± 0.02
ABTS**	0.31 ± 0.08	0.26 ± 0.00	0.23 ± 0.00

\*La acidez titulable se reportó en % ac. acético para los tés y en % ac. cítrico para la pulpa de yaca. \*\* FST (mg EAG/g o mL), DPPH, FRAP y ABTS (mg ET/g o mL). En el caso de FST, DPPH, FRAP y ABTS los valores de las kombuchas son por mL y los de la pulpa de yaca por gramo (base húmeda).

La concentración obtenida de FST en la pulpa de yaca (2.01 mg EAG/g) es similar a la reportada por Vargas-Torres et al. (2017) quienes obtuvieron una concentración entre 3 y 4 mg EAG/g, la cual puede aportar a la bebida fermentada una parte de dicha concentración y potencializar el efecto antioxidante. En comparación con la pulpa de yaca, las infusiones de té verde y té negro (0.38 y 0.35 mg EAG/mL, respectivamente) presentan menor contenido debido a que solo se extrae una parte de los compuestos fenólicos presentes en las hojas. La capacidad antioxidante por el método de DPPH fue mayor en la pulpa en comparación con las infusiones de té verde y de té negro, sin embargo, por los métodos de FRAP y ABTS fue mayor en las infusiones tomando en cuenta la relación FST:CaOX que existe entre cada material biológico. Ferri et al. (2013) concluyeron que las condiciones ácidas no son adecuadas para el ensayo de DPPH, el cuál mostró una estabilidad óptima entre pH 4 y 8.

### 7.1.1 Obtención de kombucha con pulpa de yaca

Durante el desarrollo de la bebida fermentada denominada “kombucha” se realizaron análisis fisicoquímicos (sólidos solubles totales, pH y acidez titulable), contenido de etanol, de proteínas, de grupos aminos libres, de carbohidratos solubles totales, de FST y CaOX cada 24 horas durante 10 días a las formulaciones desarrolladas (Cuadro 7.2).

Cuadro 7.2. Formulaciones desarrolladas de kombucha.

Nomenclatura	Tipo de té	Concentración de pulpa de yaca	Inclusión de la pulpa de yaca
KV	Verde	0 g/L	Control (sin pulpa)
KN	Negro	0 g/L	Control (sin pulpa)
KV50L	Verde	50 g/L	Pulpa lixiviada
KN50L	Negro	50 g/L	Pulpa lixiviada
KV60L	Verde	60 g/L	Pulpa lixiviada
KN60L	Negro	60 g/L	Pulpa lixiviada
KV50P	Verde	50 g/L	Pulpa molida
KN50P	Negro	50 g/L	Pulpa molida
KV60P	Verde	60 g/L	Pulpa molida
KN60P	Negro	60 g/L	Pulpa molida

### 7.1.2 Evaluación de sólidos solubles totales (SST)

El análisis de sólidos solubles totales realizado en las muestras de kombucha con lixiviado de pulpa de yaca y los controles de té verde y de té negro (Figura 7.1a) muestra mayores valores de SST en las muestras de kombucha con pulpa lixiviada en comparación con los controles, debido a que en el inicio de la fermentación, estas muestras contenían sacarosa y azúcares obtenidos del lixiviado de la pulpa de yaca, a diferencia de los controles, que solo contenían sacarosa. Al finalizar la fermentación, se encontró que los SST de todas las muestras tuvieron diferencias entre sí, siendo la muestra KV60L ( $5.17 \pm 0.05$  °Bx) la de menor concentración y la muestra KV50L ( $6.10 \pm 0.10$  °Bx) la de mayor concentración.

Al momento de añadir la pulpa (2ª fermentación) en las muestras de kombucha con pulpa de yaca molida se observó un ligero incremento en la concentración de SST ocasionado por los azúcares proporcionados por la pulpa de yaca. Sin embargo, conforme transcurría el tiempo de fermentación, esta concentración fue disminuyendo (Figura 7.1b). Se observó que las

muestras KV60P y KN60P tenían un efecto parecido al de la sacarosa en el producto final de la fermentación de kombucha, este efecto podría ser beneficioso para preservar o mejorar las cualidades sensoriales y la producción de compuestos de interés en la bebida fermentada (Villarreal-Soto et al., 2018).

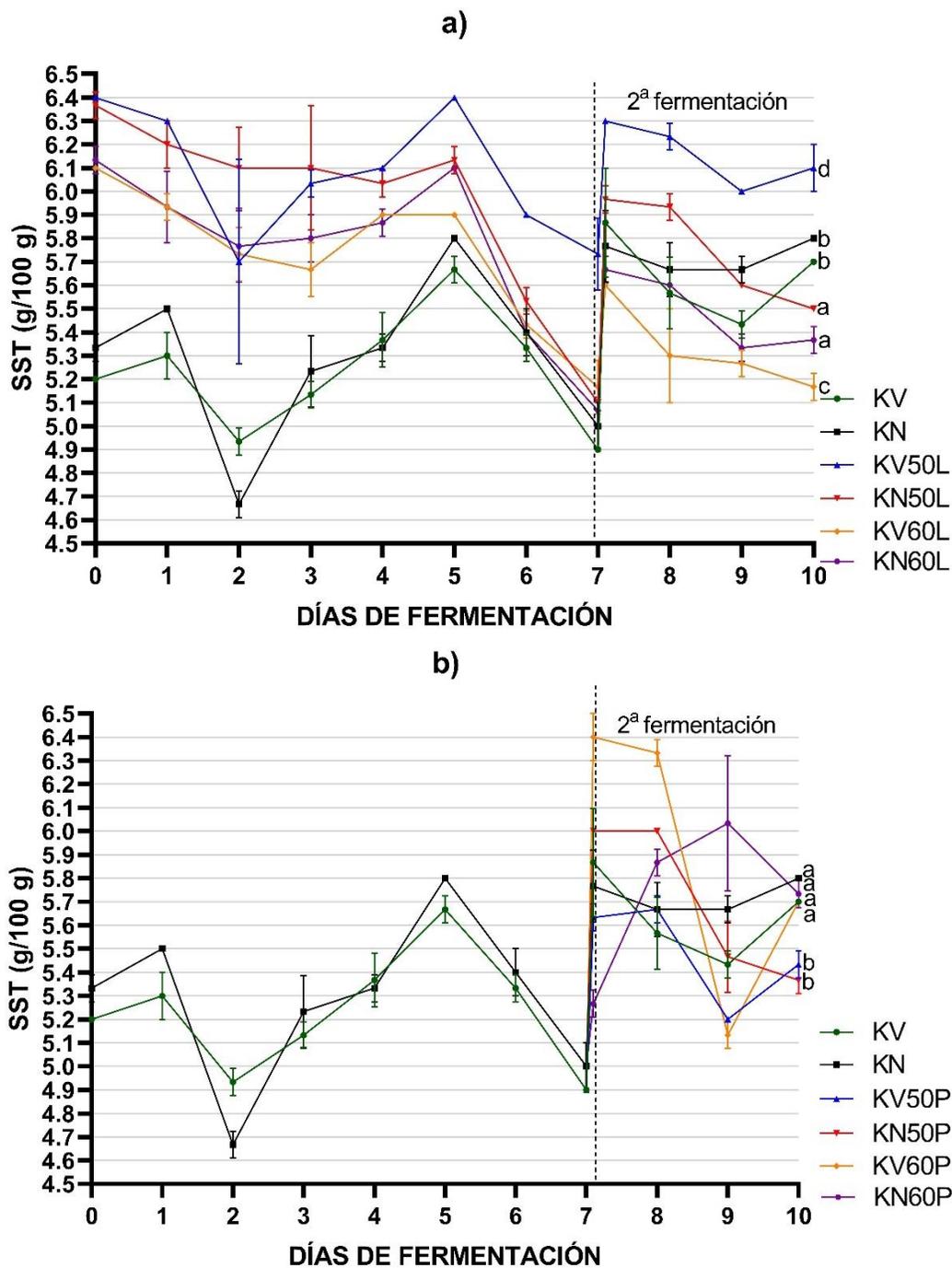


Figura 7.1 Cinéticas del contenido de sólidos solubles totales durante el desarrollo de la kombucha: a) con pulpa de yaca lixiviada y b) con pulpa de yaca molida. KV (kombucha de

té verde), KN (kombucha de té negro), KV50L (kombucha de té verde con 50 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KN50L (kombucha de té negro con 50 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KV60L (kombucha de té verde con 60 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KN60L (kombucha de té negro con 60 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KV50P (kombucha de té verde con 50 g/L de pulpa de yaca molida), KN50P (kombucha de té negro con 50 g/L de pulpa de yaca molida), KV60P (kombucha de té verde con 60 g/L de pulpa de yaca molida) y KN60P (kombucha de té negro con 60 g/L de pulpa de yaca molida).

Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Jakubczyk et al. (2020) quienes observaron que conforme progresaba la fermentación, el contenido de sacarosa disminuía, alcanzando el valor más bajo en el día 14 de fermentación en muestras de kombucha de té verde (8.75 °Bx) y kombucha de té negro (7.5 °Bx) con una concentración inicial de sacarosa de 100 g/L. Amarasinghe et al. (2018) observaron el mismo comportamiento y reportaron el consumo total de sacarosa a las 8 semanas de fermentación en kombucha de té negro. El contenido de carbohidratos, como la sacarosa, disminuyen durante la fermentación debido a la hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa por acción de las levaduras (Gaggia et al. 2018).

### **7.1.3 Determinación de pH**

Los valores obtenidos de pH en el desarrollo de las muestras de kombucha se muestran en la Figura 7.2, donde se puede observar que para todas las muestras de kombucha con pulpa de yaca lixiviada y molida el pH disminuye conforme transcurren los días de fermentación, lo que concuerda con lo reportado por Cardoso et al. (2020) y Villarreal-Soto et al. (2019) quienes obtuvieron valores de pH entre 2.7 y 3.2 después de 10 días de fermentación. También se reportó que el rango de pH considerado como seguro para el consumo humano es de 2.5 a 4.2 debido a que valores por debajo de 2.5 tienen una alta concentración de ácido acético, lo que representa un riesgo para la salud de los consumidores, y valores mayores a 4.2 pueden comprometer la seguridad microbiológica de la bebida.

En el décimo día de fermentación, los valores de pH de las muestras de kombucha con lixiviado de pulpa de yaca (2.67-2.87) fueron menores a los valores de pH de los controles (2.88-2.92) (Figura 7.2a), debido a que los azúcares fermentables de la pulpa de yaca disminuyeron el pH al ser transformados en ácidos orgánicos (Ayed et al. 2016). La

disminución del pH puede ser beneficiosa para prevenir la degradación química de los compuestos fenólicos y mantener el color de la bebida (Torskangerpoll y Andersen 2005). La estabilidad del pH se observó a partir del noveno día de fermentación lo que concuerda con el aumento del contenido de ácidos orgánicos.

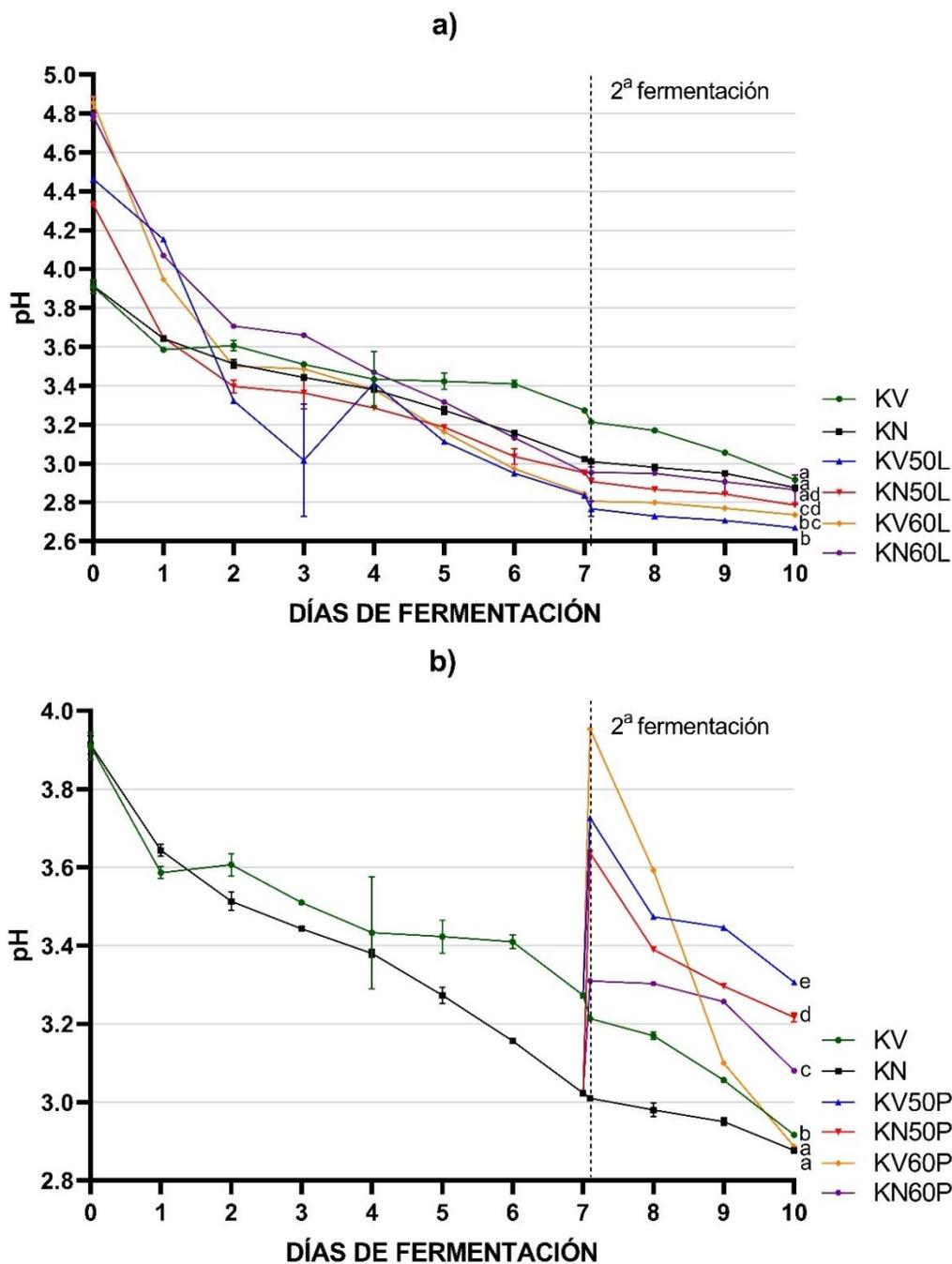


Figura 7.2 Cinéticas del comportamiento del pH durante el desarrollo de la kombucha: a) con pulpa de yuca lixiviada y b) con pulpa de yuca molida. KV (kombucha de té verde), KN

(kombucha de té negro), KV50L (kombucha de té verde con 50 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KN50L (kombucha de té negro con 50 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KV60L (kombucha de té verde con 60 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KN60L (kombucha de té negro con 60 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KV50P (kombucha de té verde con 50 g/L de pulpa de yaca molida), KN50P (kombucha de té negro con 50 g/L de pulpa de yaca molida), KV60P (kombucha de té verde con 60 g/L de pulpa de yaca molida) y KN60P (kombucha de té negro con 60 g/L de pulpa de yaca molida).

En la Figura 7.2b se puede observar que al momento de enriquecer el medio con las diferentes concentraciones de pulpa de yaca molida (2ª fermentación), los valores de pH de las muestras aumentan debido a que el pH de la pulpa de yaca (pH= 4.85) se equilibra con el pH del medio. Sin embargo, después del enriquecimiento se sigue observando una disminución del pH ocasionado por el aumento de la concentración de ácidos orgánicos a partir de los azúcares fermentables de la pulpa de yaca: KV50P ( $3.31 \pm 0.01$ ), KN50P ( $3.22 \pm 0.01$ ), KV60P ( $2.89 \pm 0.01$ ) y KN60P ( $3.08 \pm 0.01$ ). Resultados similares fueron obtenidos por Watawana et al. (2016) y Ayed y Hamdi (2015) para kombuchas de agua de coco (pH 4.0) y jugo de tuna (pH 3.5), respectivamente. El bajo pH de la bebida fermentada podría ser beneficioso para mantener la bioactividad de los compuestos fenólicos y determinar su protección contra la degradación química (Chen y Liu, 2000).

La capacidad de los microorganismos del cultivo simbiótico de bacterias y levaduras para producir ácidos orgánicos a partir de los azúcares fermentables de la pulpa de yaca dio lugar a un pH bajo, el cual impide el crecimiento de microorganismos patógenos no deseados y garantiza la seguridad de la bebida fermentada (Kole et al., 2009).

#### **7.1.4 Determinación de acidez titulable**

Los valores obtenidos de acidez titulable expresados en porcentaje de ácido acético de las muestras KV50L ( $0.38 \pm 0.01$  %), KN50L ( $0.48 \pm 0.02$  %), KV60L ( $0.53 \pm 0.01$ %) y KN60L ( $0.40 \pm 0.01$  %) fueron superiores a los obtenidos para los controles KV ( $0.12 \pm 0.00$  %) y KN ( $0.15 \pm 0.00$  %), atribuyendo esta diferencia a la adición de pulpa de yaca, debido a que el azúcar dominante de la pulpa de yaca es la sacarosa, la cual es hidrolizada en glucosa y fructosa. A partir de estos monosacáridos, las levaduras producen etanol; mientras que las

bacterias utilizan la glucosa para producir ácido glucónico, y el etanol para producir ácido acético (Figura 7.3a) (Jayabalan et al., 2014).

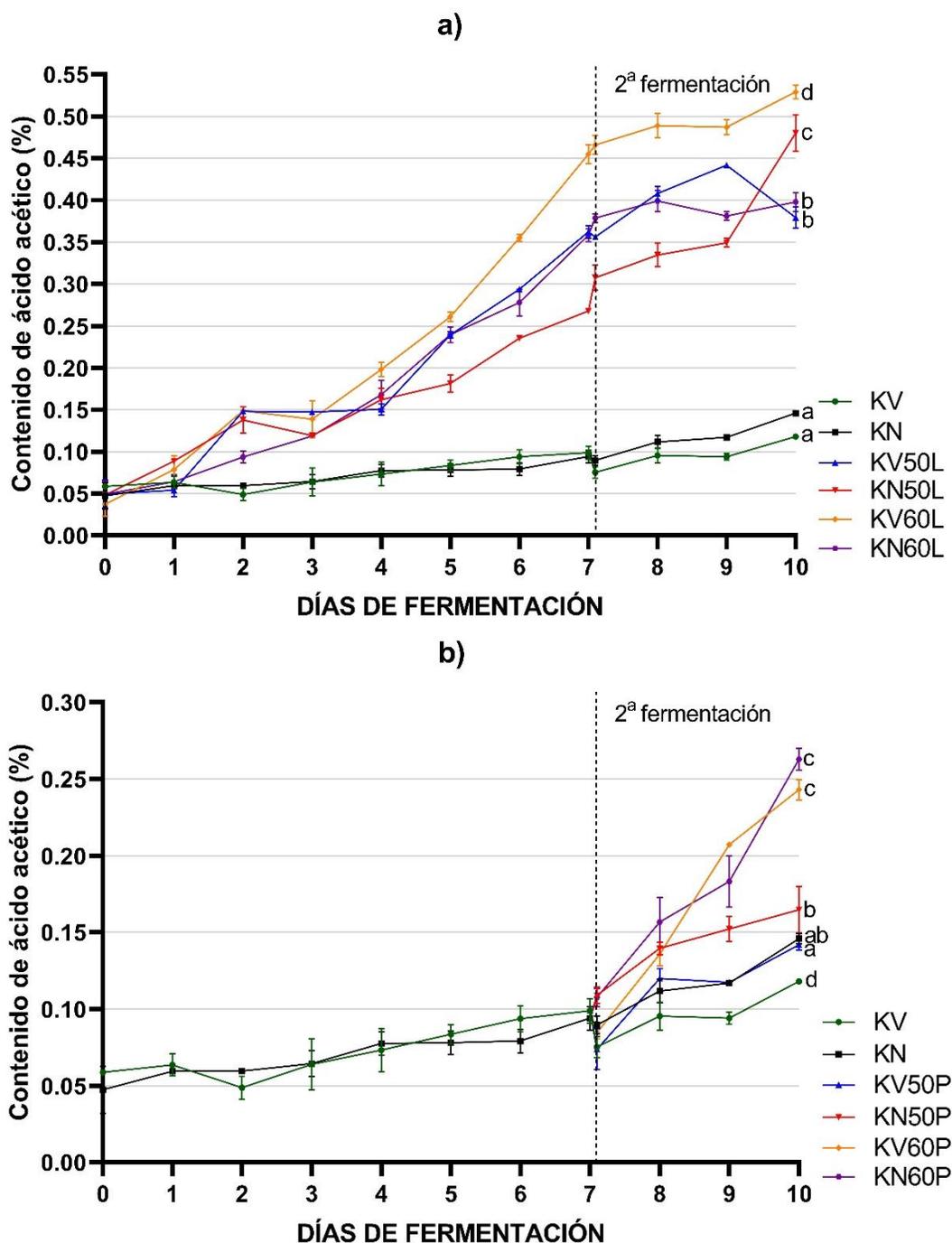


Figura 7.3 Cinéticas de la producción de ácido acético durante el desarrollo de la kombucha: a) con pulpa de yaca lixiviada y b) con pulpa de yaca molida. KV (kombucha de té verde), KN (kombucha de té negro), KV50L (kombucha de té verde con 50 g/L de pulpa de yaca

lixiviada), KN50L (kombucha de té negro con 50 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KV60L (kombucha de té verde con 60 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KN60L (kombucha de té negro con 60 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KV50P (kombucha de té verde con 50 g/L de pulpa de yaca molida), KN50P (kombucha de té negro con 50 g/L de pulpa de yaca molida), KV60P (kombucha de té verde con 60 g/L de pulpa de yaca molida) y KN60P (kombucha de té negro con 60 g/L de pulpa de yaca molida).

Resultados similares obtuvieron Yavari et al. (2010) al añadir jugo de cereza como sustrato en la fermentación de kombucha, concluyendo que los valores de pH y ácido total dependen significativamente de la duración del proceso y la concentración de azúcares fermentables (Jayabalan et al., 2007; Loncar et al., 2006). Watawana et al. (2016) observaron que las muestras de agua de coco fermentadas durante 7 días tuvieron aumentos en la acidez titulable estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) con relación al control no fermentado.

Viñas et al. (2014) atribuyeron las propiedades beneficiosas de la bebida de kombucha principalmente a su composición ácida. El bajo pH y la alta acidez pueden proporcionar cierta protección contra los contaminantes invasivos (Greenwalt et al. 2000).

Las muestras de kombucha con pulpa de yaca molida mostraron un aumento en la concentración de ácido acético (KV50P ( $0.14 \pm 0.00$  %), KN50P ( $0.16 \pm 0.01$  %), KV60P ( $0.24 \pm 0.01$  %) y KN60P ( $0.26 \pm 0.01$  %)) con relación a los controles. En comparación con las muestras de kombucha con lixiviado de pulpa de yaca estos valores resultan ser menores, debido a que la pulpa de yaca molida se añadió hasta el séptimo día de fermentación. Como lo muestra la Figura 7.3b a partir de ese día se observó un aumento significativo ( $\alpha = 0.05$ ) en la concentración de ácido acético, por lo cual, se atribuye dicha acidez al contenido de azúcares fermentables proporcionados por la pulpa de yaca molida.

Coton et al. (2017) obtuvieron diferencia en la acidez titulable entre la kombucha de té verde y de té negro durante una fermentación de 8 días, explicando que esta diferencia se debe probablemente al predominio de diferentes especies de bacterias acéticas y lácticas entre la kombucha de té verde y de té negro, y la consiguiente variación en la producción de ácidos orgánicos.

Los ácidos orgánicos son componentes comunes de bebidas y alimentos. Estos compuestos tienen efectos sobre las propiedades sensoriales y la estabilidad química y microbiológica de los alimentos. Los ácidos orgánicos también juegan un papel importante en los procesos biológicos por su implicación en las vías metabólicas, ya sea como productos intermedios o finales (González y González, 2013).

### **7.1.5 Evaluación del contenido de etanol**

Los valores obtenidos del contenido alcohólico para las muestras de kombucha con pulpa de yaca lixiviada y molida se muestran en la Figura 7.4. En ambos casos se puede observar que durante el primer día de fermentación el porcentaje de etanol incrementa para después ir disminuyendo, y posteriormente, se observa que en el quinto día alcanza su máxima concentración para subsecuentemente ir disminuyendo; un comportamiento similar se observa a partir del día 7 debido a que ese día se realizó el enriquecimiento con sacarosa para los controles y las muestras de kombucha con lixiviado, y con pulpa de yaca molida para el resto de las muestras. Este fenómeno es explicado por Jayabalan et al. (2014) quienes concluyeron que la producción de ácido acético estimula a las levaduras a producir etanol, y una significativa presencia de etanol facilita el crecimiento de las bacterias del ácido acético y la producción de ácido acético.

Al finalizar la fermentación se obtuvieron diferencias significativas en el contenido de etanol: KV ( $1.38 \pm 0.02$  %), KN ( $1.47 \pm 0.09$  %), KV50L ( $1.95 \pm 0.15$  %), KN50L ( $2.61 \pm 0.01$  %), KV60L ( $2.32 \pm 0.11$  %), KN60L ( $1.67 \pm 0.04$  %), KV50P ( $1.78 \pm 0.05$  %), KN50P ( $2.10 \pm 0.07$  %), KV60P ( $2.05 \pm 0.01$  %) y KN60P ( $1.91 \pm 0.02$  %). Resultados similares fueron determinados por un estudio realizado en Estados Unidos donde se evaluó el contenido alcohólico de 18 muestras comerciales de kombucha donde se encontraron valores entre 1.12 y 2.00 % (v/v) (Talebi et al., 2017).

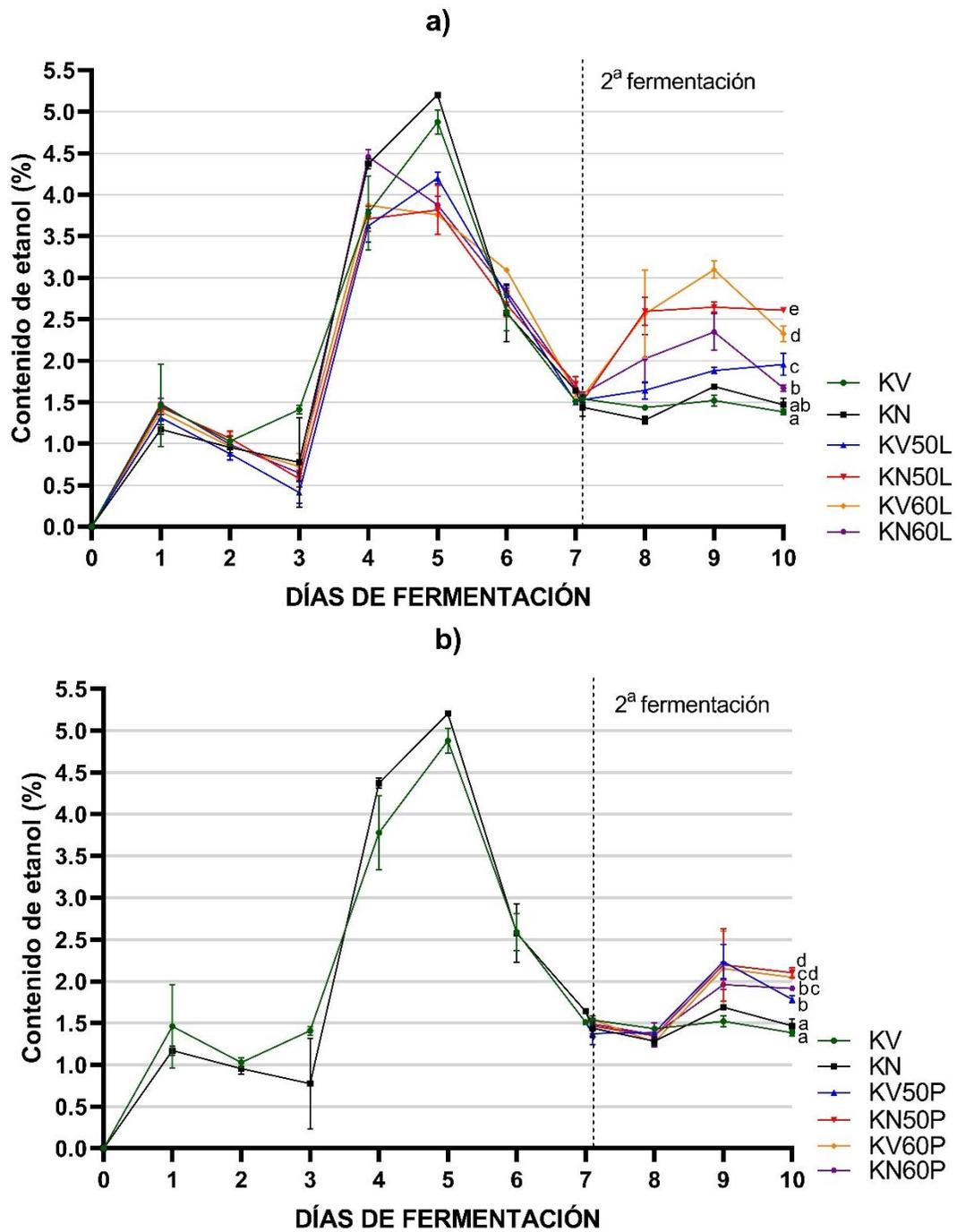


Figura 7.4 Cinéticas de producción de etanol durante el desarrollo de la kombucha: a) con pulpa de yaca lixiviada y b) con pulpa de yaca molida. KV (kombucha de té verde), KN (kombucha de té negro), KV50L (kombucha de té verde con 50 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KN50L (kombucha de té negro con 50 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KV60L (kombucha de té verde con 60 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KN60L (kombucha de té negro con 60 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KV50P (kombucha de té verde con 50 g/L de

pulpa de yaca molida), KN50P (kombucha de té negro con 50 g/L de pulpa de yaca molida), KV60P (kombucha de té verde con 60 g/L de pulpa de yaca molida) y KN60P (kombucha de té negro con 60 g/L de pulpa de yaca molida).

Villarreal-Soto et al. (2019) obtuvieron una producción máxima de etanol de 4.1 % (v/v) en una muestra de kombucha de té negro a los 11 días de fermentación, y una concentración final de 2.9 % (v/v) después de 16 días, observándose el mismo comportamiento descrito anteriormente en este estudio. Sin embargo, las concentraciones de etanol obtenidas en nuestro estudio son más altas que las reportadas por Velićanski et al. (2013), los cuales obtuvieron concentraciones entre 0.25 y 1.1 % (v/v), concluyendo, que las diferencias en la producción de metabolitos entre diferentes fermentaciones de kombucha pueden deberse al origen del inóculo, a la concentración de té y azúcar, al tiempo de fermentación y a las condiciones de fermentación (Villarreal-Soto et al., 2019).

Bhattacharya et al. (2016) observaron que el contenido de etanol aumentó hasta un máximo de 0.67 g/L en el octavo día de fermentación, seguido de una lenta disminución. Una observación similar fue reportada por Chen y Liu (2000) quienes explicaron que la disminución de la producción de etanol era debido a un pH bajo y a la disminución de la concentración de azúcar en el caldo a medida que avanzaba la fermentación.

Watawana et al. (2016) observaron que el cultivo simbiótico de bacterias y levaduras utilizaba los azúcares presentes en el agua de coco para realizar el proceso de fermentación, obteniendo un contenido de etanol por debajo del 2 % al final de la fermentación. Jayabalan et al. (2014) mencionan que las levaduras del cultivo microbiano de la kombucha convierten la glucosa y la fructosa en etanol mediante glicólisis y las bacterias del ácido acético utilizan la glucosa para producir ácido glucónico, y el etanol para producir ácido acético, siendo este último el ácido orgánico predominante. Se ha informado que tanto el etanol como el ácido acético tienen actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas (Liu et al., 1996).

### 7.1.6 Determinación del contenido de proteínas

En la Figura 7.5 se muestran los valores obtenidos de la determinación del contenido de proteínas de las muestras de kombucha con pulpa de yaca lixiviada y molida. En ambos casos se determinó que la concentración de proteínas no varió entre el inicio y el final de la fermentación para cada muestra. Al finalizar la fermentación, se obtuvieron diferencias significativas en el contenido de proteínas: KV ( $0.38 \pm 0.01$  mg/mL), KN ( $0.38 \pm 0.04$  mg/mL), KV50L ( $0.30 \pm 0.03$  mg/mL), KN50L ( $0.39 \pm 0.02$  mg/mL), KV60L ( $0.41 \pm 0.03$  mg/mL), KN60L ( $0.26 \pm 0.01$  mg/mL), KV50P ( $0.32 \pm 0.01$  mg/mL), KN50P ( $0.37 \pm 0.05$  mg/mL), KV60P ( $0.27 \pm 0.01$  mg/mL) y KN60P ( $0.32 \pm 0.0$  mg/mL). Estos resultados coinciden con los reportados por Jayabalan et al. (2007) quienes determinaron el contenido de proteínas en muestras de kombucha de té verde y de té negro encontrando concentraciones entre 0.1 y 1.2 mg/mL después de 6 días de fermentación. Sreeramulu et al. (2000) no encontraron diferencias significativas en el contenido de proteínas entre el inicio (0.1 mg/mL) y el final (0.2 mg/mL) de la fermentación para una muestra de kombucha de té negro. La existencia de proteínas en las muestras de kombucha probablemente se debió a la liberación de proteínas extracelulares por acción de levaduras y bacterias a lo largo del proceso de fermentación y/o inicialmente presentes en el sustrato (Sreeramulu et al., 2000).

Kallel et al. (2012) obtuvieron un contenido final de 0.5 mg/mL y 0.4 mg/mL de muestras de kombucha de té negro y de té verde después de 15 días de fermentación, respectivamente. En cuanto a la fracción de proteína, antes de que tuviera lugar la fermentación, la concentración determinada según el ensayo de Bradford fue de 0.47 mg/mL y 0.32 g/mL en las kombuchas de té negro y de té verde, respectivamente. Estos valores estaban dentro del rango reportado para el té (Graham, 1992; Nagao et al., 2005), sin embargo, la máxima concentración de proteínas (+ 40%) se alcanzó en el día 6 para la kombucha de té verde y en el día 12 para la kombucha de té negro.

Por otra parte, Ahmed et al. (2020) obtuvieron un contenido proteico de 1.8 mg/mL en muestras de kombucha de té negro después de 12 días de fermentación, sin embargo, alcanzó su punto máximo (3.23 mg/mL) después de 6 días de fermentación. Un fenómeno similar ocurrió con algunas muestras (KN, KV50L y KV60L) donde se observó que en los días 1, 2, 6 y 9 la concentración de proteínas aumentó significativamente para después disminuir, esto

debido a la disminución de las proteínas extracelulares liberadas por bacterias y levaduras (Ahmed et al., 2020).

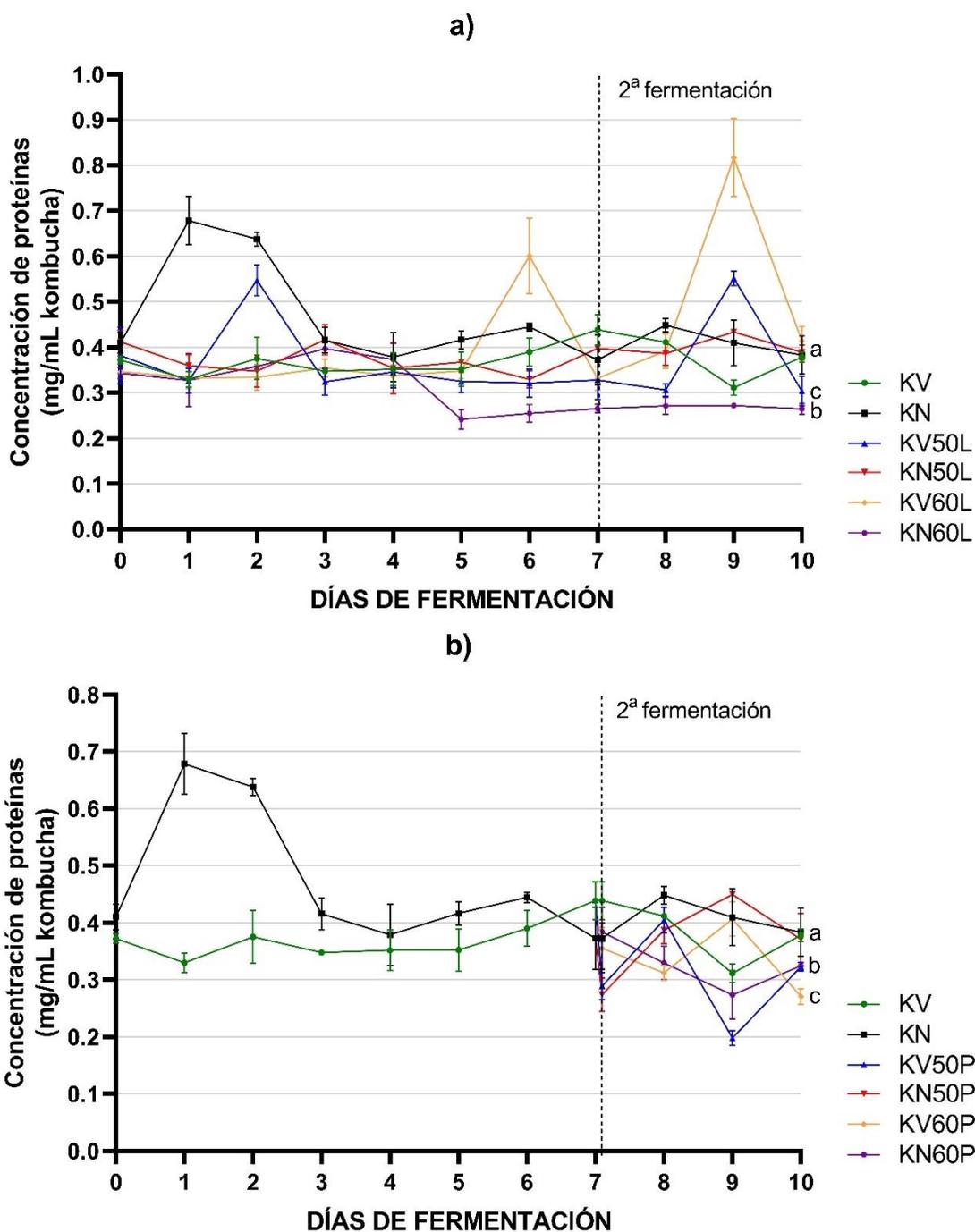


Figura 7.5 Concentración de proteína durante el desarrollo de la kombucha: a) con pulpa de yaca lixiviada y b) con pulpa de yaca molida. KV (kombucha de té verde), KN (kombucha de té negro), KV50L (kombucha de té verde con 50 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KN50L

(kombucha de té negro con 50 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KV60L (kombucha de té verde con 60 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KN60L (kombucha de té negro con 60 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KV50P (kombucha de té verde con 50 g/L de pulpa de yaca molida), KN50P (kombucha de té negro con 50 g/L de pulpa de yaca molida), KV60P (kombucha de té verde con 60 g/L de pulpa de yaca molida) y KN60P (kombucha de té negro con 60 g/L de pulpa de yaca molida).

### **7.1.7 Cuantificación de grupos aminos libres ( $\alpha$ -NH<sub>2</sub>)**

Los resultados obtenidos de la cuantificación de grupos aminos libres por el método de TNBS para las muestras de kombucha con pulpa de yaca lixiviada y molida se muestran en la Figura 7.6. En las muestras de kombucha con pulpa de yaca lixiviada el contenido de grupos aminos libres disminuyó significativamente entre el inicio y el final de la fermentación (Figura 7.6a). Esta disminución podría deberse a que algunas especies de bacterias del género *Acetobacter* y *Gluconobacter* presentes en la kombucha utilizan los aminoácidos, como la L-cisteína y L-treonina, como fuente de nitrógeno para su desarrollo y crecimiento, así como para la producción de celulosa microbiana (Dutta y Gachhui, 2007).

Por otra parte, en las muestras de kombucha con pulpa de yaca molida se observó que el contenido de grupos aminos libres aumento significativamente al final de la fermentación, siendo las muestras KV60P ( $0.22 \pm 0.01$  mg/mL) y KN60P ( $0.26 \pm 0.01$  mg/mL) las de mayor concentración (Figura 7.6b), atribuyendo este aumento a la presencia de aminoácidos proporcionados por la pulpa de yaca, tales como, ácido aspártico, ácido glutámico, valina, leucina, lisina, etc. (Zhu et al., 2017). El lixiviado de la pulpa de yaca fue agregado al inicio de la fermentación, por lo cual, los aminoácidos extraídos de la pulpa de yaca por lixiviación pudieron haber sido aprovechados como fuente de nitrógeno y otra parte degradados por el tratamiento térmico (infusión). A diferencia de la pulpa de yaca lixiviada, la pulpa molida fue agregada en el día 7 de la fermentación cuando la kombucha ya había sido filtrada y los 3 días restantes de fermentación se llevaron a cabo en condiciones anaerobias pudiendo ocasionar una menor demanda de nitrógeno debido a que la carga microbiana en el caldo era menor y no se encontraba bajo condiciones óptimas de oxigenación (Dutta y Gachhui, 2007).

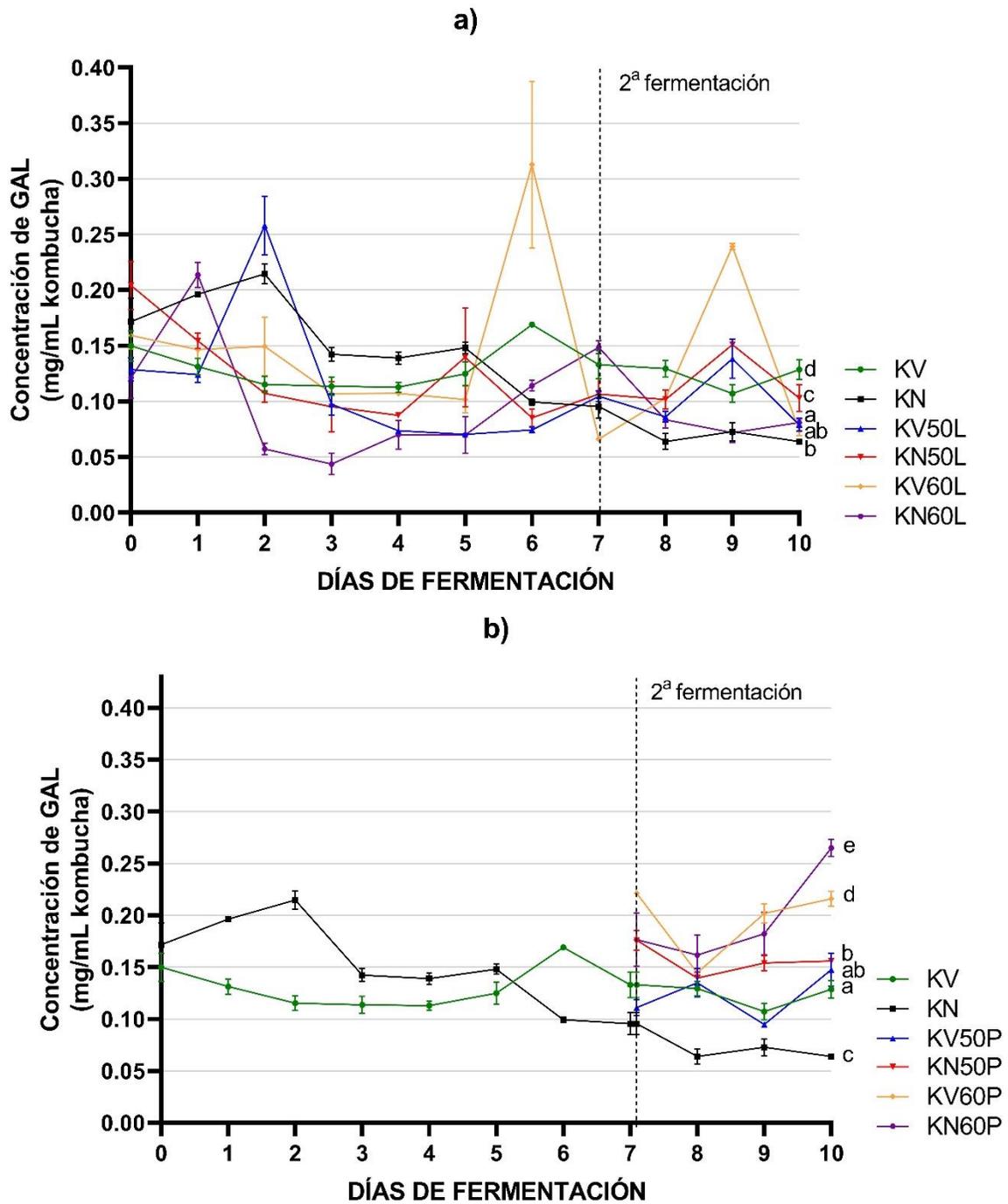


Figura 7.6 Concentración de grupos aminos libres (GAL) durante el desarrollo de la kombucha: a) con pulpa de yaca lixiviada y b) con pulpa de yaca molida. KV (kombucha de té verde), KN (kombucha de té negro), KV50L (kombucha de té verde con 50 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KN50L (kombucha de té negro con 50 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KV60L (kombucha de té verde con 60 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KN60L (kombucha de té negro con 60 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KV50P (kombucha de té verde con 50

g/L de pulpa de yaca molida), KN50P (kombucha de té negro con 50 g/L de pulpa de yaca molida), KV60P (kombucha de té verde con 60 g/L de pulpa de yaca molida) y KN60P (kombucha de té negro con 60 g/L de pulpa de yaca molida).

Aboulwafa et al. (2019) reportaron que los aminoácidos constituyen alrededor del 1 al 4% del peso seco del té (*Camellia sinensis*) y están representados por arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, glutamina, serina y teanina, que representan más del 90% de todos los aminoácidos presentes en las hojas, siendo la teanina el aminoácido con mayor abundancia. Actualmente no se encontraron estudios de kombucha donde se haya realizado la determinación de grupos aminos libres, por lo que no se pudo hacer la comparación de estos resultados.

### **7.1.8 Determinación de carbohidratos solubles totales**

En la Figura 7.7a se muestran los resultados de la determinación de carbohidratos solubles totales para las muestras de kombucha con pulpa de yaca lixiviada y los controles de kombucha de té verde y de té negro. En todas las muestras se puede observar una disminución acelerada de la concentración durante los primeros dos días y después una disminución gradual hasta el séptimo día. Un comportamiento similar se observó en los últimos días de fermentación debido al enriquecimiento con sacarosa. Este comportamiento es explicado por Villarreal-Soto et al. (2019) quienes mencionan que los monosacáridos como la glucosa y fructosa, en la fermentación de kombucha, son consumidos sin acumularse debido a los múltiples microorganismos y vías bioquímicas que se dan simultáneamente. Sin embargo, Yavari et al. (2010) afirmaron que las levaduras utilizan la glucosa para producir etanol, que inicialmente se oxida a acetaldehído y luego se oxida por las bacterias del ácido acético y el dióxido de carbono, mientras que la fructosa sigue formando parte del caldo de fermentación y es utilizada por los microorganismos en menor grado. En general, el consumo de sustrato y la formación del producto dependen del cultivo microbiano, pero también de las condiciones y el medio de fermentación (Leonarski et al., 2021).

La enzima invertasa de las levaduras convierten la sacarosa en glucosa y fructosa (Troy y Terra, 2014). Estos dos productos se acumulan en el medio, como lo observaron diferentes autores durante la fermentación de kombucha (Sievers et al., 1995; Chen y Liu, 2000; Kallel et al., 2012). Este comportamiento no pudo ser analizado a detalle en nuestro estudio, debido

a que el método que empleamos para la determinación de carbohidratos solubles totales se basa en una hidrólisis y deshidratación de los carbohidratos, lo cual, no permite visualizar la hidrólisis de la sacarosa y la producción de glucosa y fructosa a lo largo de la fermentación por la acción de enzimas microbianas.

En la Figura 7.7b se observa un incremento en la concentración de carbohidratos solubles en el séptimo día de fermentación, atribuido a la adición de pulpa de yaca molida, y subsecuentemente se observa una disminución hasta el décimo día, por lo cual, los carbohidratos proporcionados por la pulpa de yaca podrían estar siendo aprovechados por el cultivo microbiano para su crecimiento y para la producción de compuestos como ácidos orgánicos y etanol (Jayabalan et al., 2014).

Al finalizar la fermentación, no se observaron diferencias significativas en el contenido de carbohidratos solubles totales: KV ( $42.63 \pm 0.32$  mg/mL), KN ( $37.77 \pm 0.52$  mg/mL), KV50L ( $43.87 \pm 0.45$  mg/mL), KN50L ( $41.37 \pm 1.16$  mg/mL), KV60L ( $42.67 \pm 5.0$  mg/mL), KN60L ( $38.88 \pm 2.76$  mg/mL), KV50P ( $43.90 \pm 1.39$  mg/mL), KN50P ( $39.43 \pm 1.83$  mg/mL), KV60P ( $44.55 \pm 0.47$  mg/mL) y KN60P ( $38.43 \pm 1.25$  mg/mL). Estos resultados coinciden con los reportados por Leonarski et al. (2021) quienes reportan un consumo de 31.6 a 56.6 % de azúcares totales en kombucha de pulpa residual de cerecita (*Malpighia emarginata*) después de 15 días de fermentación. Gaggia et al. (2019) demostraron que el 41.1% y el 38.7% del azúcar total se consumía en la fermentación de kombucha de té negro y de té verde, respectivamente, después de 14 días de fermentación. Zubaidah et al. (2018) observaron que aproximadamente del 40-50% del azúcar total se consumía en la fermentación de kombucha de salak (*Salacca zalacca*) después de 14 días de fermentación.

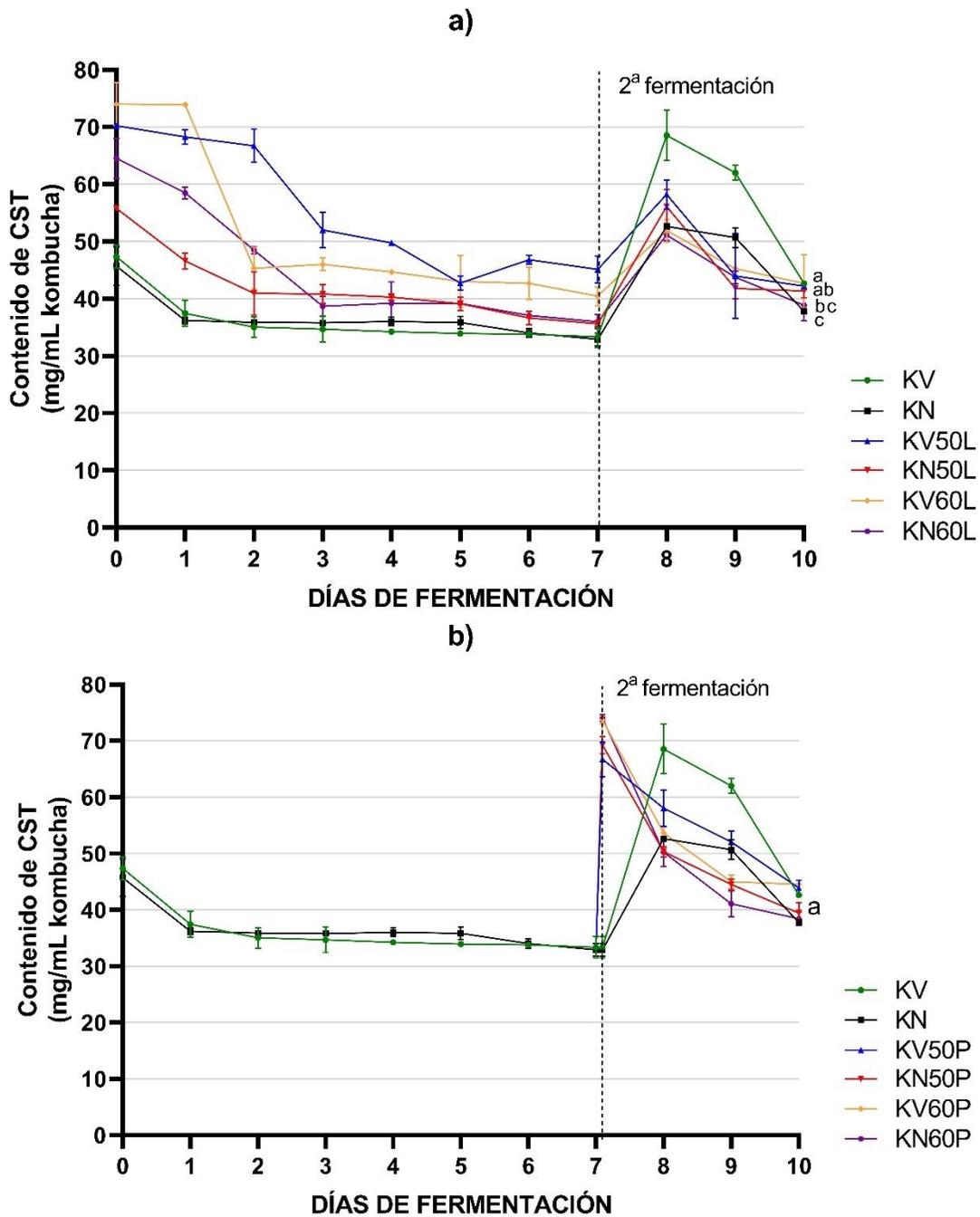


Figura 7.7 Concentración de carbohidratos solubles totales (CST) durante el desarrollo de la kombucha: a) con pulpa de yaca lixiviada y b) con pulpa de yaca molida. KV (kombucha de té verde), KN (kombucha de té negro), KV50L (kombucha de té verde con 50 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KN50L (kombucha de té negro con 50 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KV60L (kombucha de té verde con 60 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KN60L (kombucha de té negro con 60 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KV50P (kombucha de té verde con 50

g/L de pulpa de yaca molida), KN50P (kombucha de té negro con 50 g/L de pulpa de yaca molida), KV60P (kombucha de té verde con 60 g/L de pulpa de yaca molida) y KN60P (kombucha de té negro con 60 g/L de pulpa de yaca molida).

Se determinó que la concentración de carbohidratos solubles al final de la fermentación fue mayor en las muestras KV, KV60L y KV60P. El contenido de azúcares residuales, dióxido de carbono y ácidos orgánicos, así como la proporción entre estos, son factores que determinan el sabor y el color del producto final (Chen y Liu, 2000).

### **7.1.9 Fenoles solubles totales (FST) y capacidad antioxidante (CaOX)**

#### Fenoles solubles totales (FST)

El contenido de fenoles solubles totales de las muestras de kombucha con pulpa de yaca lixiviada y molida se muestran en los Cuadros 7.3 y 7.4, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en el contenido de FST para el tipo de té en el producto final de todas las muestras. Sin embargo, la kombucha de té negro obtuvo mayor concentración de FST que la kombucha de té verde. Estos resultados coinciden con lo reportado por Cardoso et al. (2020), Chakravorty et al. (2016) y Kallel et al. (2012), quienes encontraron una mayor concentración de fenoles totales, mayor diversidad y abundancia de clases de compuestos fenólicos en la kombucha de té negro en comparación con la de té verde. Sin embargo, para las muestras de kombucha con pulpa de yaca lixiviada, se obtuvo la mayor concentración en las muestras que contenían té verde. Resultados similares fueron reportados por Jakubczyk et al. (2020), De Filippis et al. (2018), Gaggia et al. (2018) y Gramza-Michałowska et al. (2016) quienes obtuvieron mayor concentración de FST en la kombucha de té verde en comparación con la de té negro. Estas diferencias entre el tipo de té pueden deberse a las condiciones de procesamiento y el tamaño de las partículas de las hojas (Astill et al., 2001; Chen y Sang, 2014). También se han reportado ciertas diferencias en la composición del té, en las que influyen diversos factores como la especie, la estación del año, la edad de las hojas, el clima y las condiciones hortícolas (Cabrera et al., 2003). Otra posible explicación es que la inoculación de las muestras se hizo con SCOBY proveniente de té verde y este factor pudo haber influido en la adaptabilidad de las bacterias y levaduras en la combinación de té negro y pulpa de yaca. Varios estudios han demostrado que el SCOBY puede variar entre fermentaciones (Chakravorty et al., 2016; Coton et al., 2017; Reva et al., 2015).

Cuadro 7.3. Fenoles solubles totales de kombucha con pulpa de yaca lixiviada.

Días	FST (mg EAG/mL)					
	KV	KV50L	KV60L	KN	KN50L	KN60L
0	0.38 ± 0.01abcdD	0.35 ± 0.01abA	0.35 ± 0.01abA	0.35 ± 0.00aA	0.32 ± 0.01abC	0.28 ± 0.00abB
1	0.36 ± 0.01abcC	0.31 ± 0.00abB	0.33 ± 0.00aB	0.43 ± 0.01bD	0.25 ± 0.01fA	0.24 ± 0.01aA
2	0.37 ± 0.03abcAB	0.53 ± 0.03aD	0.45 ± 0.03abC	0.41 ± 0.02bcBC	0.33 ± 0.01abcdA	0.34 ± 0.03abA
3	0.34 ± 0.02acA	0.31 ± 0.00abA	0.34 ± 0.00abA	0.35 ± 0.01aA	0.29 ± 0.01bfA	0.3 ± 0.04abA
4	0.43 ± 0.02dA	0.44 ± 0.02abA	0.43 ± 0.02abA	0.43 ± 0.03bA	0.37 ± 0.01deB	0.33 ± 0.00abB
5	0.33 ± 0.01aC	0.28 ± 0.00bAB	0.33 ± 0.00aC	0.28 ± 0.01dAB	0.30 ± 0.01abBC	0.28 ± 0.00abA
6	0.38 ± 0.01abcdA	0.40 ± 0.02abA	0.54 ± 0.02abC	0.37 ± 0.03acA	0.36 ± 0.01cdeAB	0.31 ± 0.01abB
7	0.42 ± 0.01bdAB	0.45 ± 0.01abA	0.45 ± 0.01abA	0.42 ± 0.01bcAB	0.38 ± 0.03eBC	0.35 ± 0.00abC
8	0.41 ± 0.05bdAB	0.44 ± 0.01abB	0.4 ± 0.01abAB	0.26 ± 0.01dC	0.34 ± 0.02acdeA	0.35 ± 0.02abA
9	0.40 ± 0.03bcdA	0.53 ± 0.05aBC	0.58 ± 0.05bC	0.35 ± 0.02aA	0.35 ± 0.02acdeA	0.48 ± 0.01bB
10	0.33 ± 0.01aA	0.36 ± 0.00abA	0.39 ± 0.01abA	0.36 ± 0.00aA	0.32 ± 0.01abcA	0.37 ± 0.00abA

Los valores se presentan como media ± desviación estándar (n = 3). Las letras minúsculas representan el efecto de los días de fermentación. Las letras mayúsculas representan el efecto de las muestras. Letras diferentes indican una diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ ).

Cuadro 7.4. Fenoles solubles totales de kombucha con pulpa de yaca molida.

Días	FST (mg EAG/mL)					
	KV	KV50P	KV60P	KN	KN50P	KN60P
7	0.42 ± 0.01bcB	0.36 ± 0.03abAC	0.28 ± 0.02acD	0.42 ± 0.01abAB	0.33 ± 0.02abC	0.41 ± 0.02abAB
8	0.41 ± 0.05bcdA	0.43 ± 0.01cdA	0.34 ± 0.01abcdB	0.26 ± 0.01bC	0.40 ± 0.03abAB	0.43 ± 0.02adA
9	0.40 ± 0.03bcdA	0.38 ± 0.01bcA	0.47 ± 0.02abdB	0.35 ± 0.02abA	0.54 ± 0.04bB	0.39 ± 0.01abcA
10	0.33 ± 0.01aA	0.45 ± 0.03dB	0.56 ± 0.02bdC	0.36 ± 0.00abA	0.63 ± 0.02bD	0.48 ± 0.01dB

Los valores se presentan como media ± desviación estándar (n = 3). Las letras minúsculas representan el efecto de los días de fermentación. Las letras mayúsculas representan el efecto de las muestras. Letras diferentes indican una diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ ).

Se observó que la concentración de FST aumentaba y disminuía conforme transcurrían los días de fermentación, obteniendo la concentración máxima en el día 4 para KV (0.43 mg EAG/mL) y KN (0.43 mg EAG/mL), en el día 7 para KN50L (0.38 mg EAG/mL), en el día 9 para KV50L (0.53 mg EAG/mL), KV60L (0.58 mg EAG/mL) y KN60L (0.48 mg EAG/mL). Este comportamiento coincide con lo reportado por Gaggia et al. (2018) quienes observaron un aumento significativo del contenido de fenoles durante la fermentación de kombucha de té verde y de té negro, con un pico máximo en el día 7, y subsecuentemente, una disminución significativa en el día 14 (33% y 18%, respectivamente). El aumento y disminución repentinos en el contenido de FST podría haber coincidido con las actividades microbiológicas (Amarasinghe et al. 2018), sin embargo, este aspecto no fue investigado en

este estudio. Por otra parte, Velićanski et al. (2014) observaron un comportamiento similar en muestras de kombucha de té negro y de toronjil (*Melissa officinalis*) quienes explicaron que los cambios no uniformes en la concentración de fenoles solubles totales durante la fermentación pueden explicarse por la biotransformación de los compuestos fenólicos, como las catequinas (así como otros polifenoles complejos) por la acción enzimática de los microorganismos del SCOBY (Dufresne y Farnworth, 2000). Además, las catequinas se liberan de las células sensibles a los ácidos durante la fermentación de la kombucha de té negro y de té verde, lo que podría ser la razón del aumento del contenido de fenoles solubles totales del té durante la fermentación. Por otra parte, las catequinas pueden polimerizarse en moléculas de mayor masa molecular, y así reducir el contenido de fenoles solubles totales (Chu y Chen, 2006).

Las muestras con mayor contenido de FST después de 10 días de fermentación fueron KV60L ( $0.39 \pm 0.01$  mg EAG/mL) en muestras de kombucha con pulpa de yaca lixiviada, y KN50P ( $0.63 \pm 0.02$  mg EAG/mL) en muestras con pulpa molida, el cual se puede atribuir a la adición de pulpa de yaca. Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Osiripun y Apisittiwong (2021) (granada, piña y manzana), Watawana et al. (2016) (coco), Ayed et al. (2016) (uva roja) y Ayed y Hamdi (2015) (tuna) quienes concluyeron que la adición de pulpa o jugos de frutas mejora la concentración de FST en la fermentación de kombucha.

Sin embargo, los valores que se obtuvieron en este estudio fueron superiores a los reportados por Osiripun y Apisittiwong (2021) quienes fermentaron té negro durante 7 días y subsecuentemente adicionaron 20 % (v/v) de jugos comerciales de granada (0.35 mg EAG/mL), piña (0.33 mg EAG/mL) y manzana (0.31 mg EAG/mL) y fermentaron durante 3 días más. Sin embargo, nuestros valores son inferiores en comparación con los obtenidos para kombucha de coco (1.2 mg EAG/mL), de uva roja (3.3 mg EAG/mL) y de tuna (0.9 mg EAG/mL). Aunque nuestros resultados son inferiores, esto se puede deber a que en estos estudios se utilizaron mayores concentraciones de jugo de fruta (300 mL/L) con relación a nuestro estudio para el desarrollo de la bebida fermentada.

El contenido fenólico de la kombucha es variable y cambia según la composición química del té antes de la fermentación, también depende de la concentración de la fuente de carbono, el pH, la temperatura, el tamaño del inóculo y la comunidad microbiana de kombucha (Jafari

et al., 2020). Las bacterias y levaduras presentes en la kombucha son las encargadas de liberar enzimas que determinan los metabolitos generados durante su fermentación, así como de degradar los polifenoles en moléculas más pequeñas (De Almeida Souza et al., 2020; Jakubczyk et al., 2020).

Aunque el té contiene un alto contenido de compuestos fenólicos, los compuestos fenólicos extraídos por la infusión de té son relativamente volátiles, se absorben mal en el intestino y se convierten en otros metabolitos (Lozano et al., 2012). Mientras que la kombucha tiene un mayor contenido de compuestos fenólicos, proteínas y ácidos orgánicos, así como una diversidad microbiana más amplia en comparación con el té verde y, por lo tanto, es probable que sea un probiótico más eficaz y otorgue importantes beneficios sobre la salud más allá de los que brinda el té (Jakubczyk et al., 2020).

Ivanišová et al. (2019) revelaron que la kombucha tiene una alta concentración de compuestos fenólicos, como ácido gálico, ácido clorogénico, ácido protocatechico, ácido p-cumárico, ácido elágico, rutina, vitexina y resveratrol. Otros compuestos, como catequinas, epicatequina y flavonoides, también son producidos por los microorganismos a través de la biotransformación (Villarreal-Soto et al., 2018; Jayabalan et al., 2010; Ivanišová et al., 2020; Mousavi et al., 2018). Los compuestos fenólicos se denominan antioxidantes debido a su capacidad para eliminar los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno, y existe una correlación entre los compuestos fenólicos y la actividad de eliminación de radicales libres (Yang et al., 2008).

#### Método de eliminación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)

Los resultados del análisis de DPPH de las muestras de kombucha con pulpa de yaca lixiviada y molida se muestran en los Cuadros 7.5 y 7.6, respectivamente, donde no se observaron diferencias significativas en las muestras entre el inicio y el final de la fermentación, es decir, la capacidad antioxidante de las muestras frente al radical 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl mediante transferencia de electrones y/o átomos de hidrógeno se mantiene a lo largo de la fermentación. Este comportamiento coincide con los resultados obtenidos por Amarasinghe et al. (2017) quienes no encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) frente al radical DPPH de muestras fermentadas de kombucha. Por otra parte, Ferri et al. (2013) concluyeron que las condiciones ácidas no son adecuadas para el ensayo de DPPH, el

cuál mostró una estabilidad óptima entre pH 4 y 8; y, además, el método DPPH no permite la determinación de la actividad antioxidante hidrófila.

Cuadro 7.5. Capacidad antioxidante (DPPH) de kombucha con pulpa de yaca lixiviada.

Días	DPPH (mg ET/mL)					
	KV	KV50L	KV60L	KN	KN50L	KN60L
0	0.20 ± 0.00abcdD	0.20 ± 0.00abB	0.19 ± 0.00acdA	0.20 ± 0.00abcdB	0.19 ± 0.00acdA	0.18 ± 0.00abC
1	0.21 ± 0.00abcdBC	0.21 ± 0.00abB	0.21 ± 0.00abcdC	0.46 ± 0.00acdD	0.19 ± 0.00abcdA	0.19 ± 0.00abA
2	0.43 ± 0.01acdD	0.33 ± 0.01abB	0.32 ± 0.00abcdB	0.35 ± 0.00abcdC	0.30 ± 0.00abcdA	0.30 ± 0.00abA
3	0.20 ± 0.00abcD	0.20 ± 0.00abA	0.21 ± 0.00abcdAB	0.19 ± 0.00abcC	0.21 ± 0.01abcdB	0.21 ± 0.00abAB
4	0.40 ± 0.00abcdC	0.41 ± 0.00aD	0.26 ± 0.00abcdA	0.47 ± 0.01adF	0.28 ± 0.00abcdB	0.42 ± 0.00aE
5	0.23 ± 0.00abcdC	0.19 ± 0.00abB	0.20 ± 0.00abcdA	0.20 ± 0.00abcdA	0.20 ± 0.00abcdAB	0.20 ± 0.00abA
6	0.39 ± 0.00abcdA	0.34 ± 0.00abD	0.31 ± 0.01abcdC	0.42 ± 0.00abcdE	0.38 ± 0.00abcA	0.25 ± 0.00abB
7	0.37 ± 0.00abcdC	0.28 ± 0.01abAB	0.29 ± 0.00abcdB	0.26 ± 0.00abcdD	0.37 ± 0.00abcdC	0.28 ± 0.00abA
8	0.46 ± 0.00adF	0.33 ± 0.01abA	0.37 ± 0.00abcC	0.41 ± 0.00abcdD	0.44 ± 0.00cbE	0.36 ± 0.00abB
9	0.37 ± 0.00abcdB	0.41 ± 0.03aA	0.42 ± 0.01bcA	0.37 ± 0.00abcdB	0.32 ± 0.00abcdC	0.42 ± 0.01aA
10	0.18 ± 0.00bcE	0.12 ± 0.01bB	0.15 ± 0.00adC	0.17 ± 0.00bA	0.16 ± 0.00adD	0.17 ± 0.00bA

Los valores se presentan como media ± desviación estándar (n = 3). Las letras minúsculas representan el efecto de los días de fermentación. Las letras mayúsculas representan el efecto de las muestras. Letras diferentes indican una diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ ).

Cuadro 7.6. Capacidad antioxidante (DPPH) de kombucha con pulpa de yaca molida.

Días	DPPH (mg ET/mL)					
	KV	KV50P	KV60P	KN	KN50P	KN60P
7	0.37 ± 0.00abcdC	0.38 ± 0.00abcdE	0.32 ± 0.00abcdA	0.26 ± 0.00abcdB	0.37 ± 0.00abD	0.32 ± 0.00abA
8	0.46 ± 0.00adE	0.25 ± 0.01abcdC	0.28 ± 0.00abcdD	0.41 ± 0.00abcdAB	0.43 ± 0.01abB	0.4 ± 0.01abA
9	0.37 ± 0.00abcdC	0.48 ± 0.01bcD	0.35 ± 0.01abcdA	0.37 ± 0.00abcdBC	0.36 ± 0.00abAB	0.36 ± 0.00abABC
10	0.18 ± 0.00bcB	0.31 ± 0.01abcdC	0.39 ± 0.01abcdA	0.17 ± 0.00bcB	0.39 ± 0.01abA	0.39 ± 0.00abA

Los valores se presentan como media ± desviación estándar (n = 3). Las letras minúsculas representan el efecto de los días de fermentación. Las letras mayúsculas representan el efecto de las muestras. Letras diferentes indican una diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ ).

Otros autores demostraron que la actividad antioxidante de las muestras de kombucha de té negro y de té verde contra el radical DPPH en el tercer día de fermentación era alrededor del 50% de inhibición, y disminuía en los cuatro días siguientes del proceso (Malbaša et al., 2011). Otros estudios observaron este mismo comportamiento en el análisis de DPPH, donde alcanzaban el máximo porcentaje de inhibición en el séptimo día y subsecuentemente disminuía hasta el día 14 de fermentación (Jakubczyk et al., 2020; Gaggia et al., 2018; Chakravorty et al., 2016). Esto probablemente se deba a la variabilidad de la microbiota que se encuentra en diferentes SCOBY's (Jayasekera et al., 2011; Junior et al., 2009; Chen y Liu,

2000). Además, Malbaša et al. (2011) informaron que la utilización de diferentes inóculos e iniciadores de kombucha provoca el desarrollo de diferentes actividades antioxidantes en el producto final. Algunos estudios han reportado una menor actividad antioxidante por parte de bebidas fermentadas de kombucha frente al radical DPPH con relación a otros radicales (ORAC, FRAP y ABTS) (Mizuta et al., 2020; Jakubczyk et al., 2020; Gaggia et al., 2018; Watawana et al., 2016; Ayed et al., 2016; Jayabalan et al., 2008).

Las muestras KV50P ( $0.31 \pm 0.01$  mg ET/mL), KV60P ( $0.39 \pm 0.01$  mg ET/mL), KN50P ( $0.39 \pm 0.01$  mg ET/mL) y KN60P ( $0.39 \pm 0.01$  mg ET/mL) mostraron un incremento en la actividad de captación del radical DPPH. Este aumento se podría atribuir a la adición de pulpa de yaca molida y a la liberación de compuestos antioxidantes. Muchos autores han informado un comportamiento similar al agregar diferentes frutas a la kombucha fermentada o incluso al realizar la fermentación con este tipo de sustratos (Osiripun y Apisittiwong, 2021; Zubaidah et al., 2018; Watawana et al., 2016; Ayed et al., 2016; Ayed y Hamdi, 2015), considerando que los efectos antioxidantes son atribuibles a la suma de las capacidades antioxidantes de muchos compuestos presentes en las frutas y a los efectos sinérgicos entre ciertos metabolitos producidos durante el proceso de fermentación. Según Jayabalan et al. (2014), el aumento de la capacidad antioxidante de la kombucha depende de varios factores como el tipo de sustrato, el tiempo de fermentación y la microbiota de la kombucha, que es la principal responsable de determinar la naturaleza de los metabolitos formados durante la fermentación.

#### Poder antioxidante de reducción férrica (FRAP)

Los resultados del análisis de FRAP de las muestras de kombucha con pulpa de yaca lixiviada y molida se muestran en los Cuadros 7.7 y 7.8, respectivamente. El ensayo antioxidante FRAP determina el poder de reducción de iones de hierro, se basa en la producción de iones  $\text{Fe}^{2+}$  (forma ferrosa) a partir de la reducción del ión  $\text{Fe}^{3+}$  (forma férrica) presente en la 2,4,6tripiridil-escomplextriazina (TPTZ) en un medio ácido (Liu et al., 2018). Los valores obtenidos de capacidad antioxidante por el ensayo FRAP de las muestras KV50L y KV60L muestran diferencias significativas con relación al resto de las muestras de kombucha con pulpa de yaca lixiviada, y las muestras KV60P y KN50P con relación al resto de las muestras de kombucha con pulpa de yaca molida, siendo los tratamientos que mayor capacidad

antioxidante mostraron. Se encontró que la capacidad antioxidante (FRAP) y la concentración de FST se correlacionan de manera positiva en todas las muestras.

Resultados similares fueron obtenidos por Mizuta et al. (2020), Cardoso et al. (2020), Amarasinghe et al. (2018), Watawana et al. (2016) y Velićanski et al. (2014) quienes reportan que a medida que transcurre el tiempo de fermentación se va incrementando la concentración de FST y con ello se tiene una mejora significativa de la capacidad antioxidante. Un alto contenido de compuestos fenólicos se asocia generalmente con una elevada actividad antioxidante (Sun et al., 2015). También Lobo et al. (2017) encontraron que la conversión metabólica de los componentes del té por enzimas microbianas durante la fermentación puede contribuir al aumento de la actividad antioxidante de kombucha en comparación con el té sin fermentar.

Además de la concentración y composición de compuestos fenólicos en la kombucha, otros metabolitos producidos durante la fermentación, como ácidos orgánicos, vitaminas, etc., también pueden modificar la capacidad antioxidante de la kombucha (Malbaša et al., 2011).

Cuadro 7.7. Capacidad antioxidante (FRAP) de kombucha con pulpa de yaca lixiviada.

Días	FRAP (mg ET/mL)					
	KV	KV50L	KV60L	KN	KN50L	KN60L
0	0.80 ± 0.03abA	0.80 ± 0.02adA	0.77 ± 0.02adA	0.68 ± 0.02aC	0.51 ± 0.03aB	0.52 ± 0.02abB
1	0.85 ± 0.01abB	0.87 ± 0.00abdB	0.79 ± 0.01abdD	0.72 ± 0.02abcdC	0.55 ± 0.00abA	0.55 ± 0.00abA
2	0.78 ± 0.02aA	1.16 ± 0.02bcdE	0.92 ± 0.01abcdD	0.76 ± 0.02bcdA	0.69 ± 0.02abC	0.52 ± 0.03abB
3	0.84 ± 0.01abC	0.89 ± 0.01abcdD	0.84 ± 0.00abcdC	0.67 ± 0.03aB	0.62 ± 0.00abA	0.65 ± 0.01abAB
4	1.08 ± 0.02bA	1.00 ± 0.03abcdA	0.91 ± 0.05abcdA	0.78 ± 0.00cdA	0.71 ± 0.04abA	0.59 ± 0.03abA
5	0.86 ± 0.01abA	0.92 ± 0.01abcdE	0.87 ± 0.01abcdA	0.69 ± 0.02abD	0.56 ± 0.02abB	0.62 ± 0.00abC
6	0.99 ± 0.02abC	1.10 ± 0.01abcdD	1.94 ± 0.03bcdE	0.79 ± 0.03cA	0.74 ± 0.03bA	0.62 ± 0.02abB
7	1.02 ± 0.03abB	1.10 ± 0.01abcdD	1.00 ± 0.03abcdB	0.78 ± 0.03cA	0.73 ± 0.05abA	0.62 ± 0.02abC
8	0.87 ± 0.02abD	1.03 ± 0.02abcdB	0.96 ± 0.01abcdB	0.69 ± 0.02abA	0.71 ± 0.05abA	0.30 ± 0.01aC
9	0.96 ± 0.02abB	1.59 ± 0.03bcC	2.32 ± 0.02bcD	0.70 ± 0.02abdA	0.70 ± 0.04abA	1.01 ± 0.04bB
10	0.81 ± 0.01abE	0.90 ± 0.00abcdA	0.90 ± 0.00abcdA	0.67 ± 0.01aD	0.61 ± 0.01abB	0.64 ± 0.00abC

Los valores se presentan como media ± desviación estándar (n = 3). Las letras minúsculas representan el efecto de los días de fermentación. Las letras mayúsculas representan el efecto de las muestras. Letras diferentes indican una diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ ).

Cuadro 7.8. Capacidad antioxidante (FRAP) de kombucha con pulpa de yaca molida.

Días	FRAP (mg ET/mL)					
	KV	KV50P	KV60P	KN	KN50P	KN60P
7	1.02±0.11abD	0.88 ± 0.01abcdB	0.68 ± 0.05bcdA	0.78 ± 0.03bcC	0.61 ± 0.02aA	0.88 ± 0.03abB
8	0.87±0.02abB	0.87 ± 0.03abcdB	0.65 ± 0.05bcA	0.69 ± 0.02adA	0.65 ± 0.03abA	1.34 ± 0.08bC
9	0.96±0.02abB	0.97 ± 0.04abcdBC	1.03 ± 0.01abcdCD	0.70 ± 0.02abdA	1.06 ± 0.03bD	0.75 ± 0.00abA
10	0.81±0.01abA	0.96 ± 0.01abcdC	1.09 ± 0.07abdD	0.67 ± 0.01aB	1.21 ± 0.05bE	0.79 ± 0.02abA

Los valores se presentan como media ± desviación estándar (n = 3). Las letras minúsculas representan el efecto de los días de fermentación. Las letras mayúsculas representan el efecto de las muestras. Letras diferentes indican una diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ ).

Se ha determinado que la fermentación de té verde y té negro con la adición de 50 y 60 g/L de pulpa de yaca (para algunos tratamientos) mediante el SCOBY incrementa la concentración de FST en un periodo de 10 días y ejerce una mayor capacidad antioxidante mediante la quelación del hierro. Se ha reportado que la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos puede deberse a su capacidad de actuar como agentes reductores al donar hidrógeno y/o capturar oxígeno singlete, o como quelantes (Burin et al., 2010). Los polifenoles del té han sido reconocidos como excelentes antioxidantes debido principalmente a la presencia del grupo 3'-4' dihidroxi en el anillo B y del éster de galoi en el anillo C de los flavonoles, que también son estructuras importantes en la quelación de iones metálicos (Guo et al., 1996; Khokhar y Owusu, 2003).

Ayed et al. (2016), Watawana et al. (2016) y Ayed y Hamdi (2015) concluyeron que la actividad antioxidante, mediante el ensayo de FRAP, del jugo fermentado de uva, coco y tuna, respectivamente, aumentó significativamente como resultado de la fermentación y atribuyeron los efectos de la fermentación a la suma de las capacidades antioxidantes de muchos de los compuestos presentes en las frutas, y a los efectos sinérgicos de la interacción entre ciertos productos metabólicos formados durante el proceso de fermentación. Maier et al. (2009) afirmaron que la actividad antioxidante podía ser un efecto sinérgico entre varios compuestos, en lugar de uno solo.

El aumento de la actividad antioxidante de las muestras de kombucha se debe principalmente al bajo peso molecular de los compuestos fenólicos producidos y también se acompaña de varios cambios en las estructuras de los polifenoles (Jayabalan et al., 2014). El aumento en el contenido de compuestos polifenólicos puede estar asociado con numerosas reacciones

que ocurren durante la fermentación del té, por ejemplo, las condiciones ácidas y la oxidación de compuestos polifenólicos por algunas enzimas microbianas, lo que conduce a la formación de catequinas, flavonoides y otros compuestos con propiedades biológicas (Jayabalan et al., 2010). Además, la fermentación induce la ruptura de las paredes celulares de los materiales biológicos, lo que conduce a la liberación de algunos compuestos antioxidantes. Estos compuestos antioxidantes pueden actuar como terminadores de radicales libres, quelantes de metales, inhibidores de oxígeno singlete o donantes de hidrógeno (Hur et al., 2014).

#### Poder antioxidante contra el radical 2,2-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)

Los resultados del análisis de ABTS de las muestras de kombucha con pulpa de yaca lixiviada y molida se muestran en los Cuadros 7.9 y 7.10, respectivamente, donde no se observaron diferencias significativas para ninguna de las muestras de kombucha analizadas en este estudio entre el inicio y el final de la fermentación, es decir, la capacidad antioxidante de las muestras frente al radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico se mantiene constante a lo largo de la fermentación. Mizuta et al. (2020) realizaron un estudio de fermentación de kombucha de té verde donde evaluaron la capacidad antioxidante mediante el método ABTS y reportaron que no hubo diferencia significativa. Watawana et al. (2016) observaron un comportamiento similar en agua de coco fermentada por el SCOBY de kombucha durante 7 días, reportando que la actividad de eliminación del radical ABTS sólo tuvo un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) en la muestra fermentada en el cuarto día en comparación con el control no fermentado y el producto final. Esto pudo haber ocurrido debido a que la capacidad antioxidante alcanzó la concentración considerada como el punto de saturación, lo que significa que la actividad de extinción del radical ABTS ya no puede aumentar porque la concentración de compuestos bioactivos ha alcanzado el límite de saturación (Tu et al., 2019). Estos resultados no concuerdan con los reportados por diversos estudios donde se observó que la capacidad antioxidante (ABTS) incremento conforme transcurrían los días de fermentación en kombuchas de diferentes sustratos (La Torre et al., 2021; Cardoso et al., 2020; Ayed et al., 2016; Chakravorty et al., 2016; Ayed y Hamdi, 2015).

Cuadro 7.9. Capacidad antioxidante (ABTS) de kombucha con pulpa de yaca lixiviada.

Días	ABTS (mg ET/mL)					
	KV	KV50L	KV60L	KN	KN50L	KN60L
0	0.26 ± 0.00abcdA	0.24 ± 0.00abA	0.25 ± 0.00abA	0.23 ± 0.00abA	0.21 ± 0.00abA	0.22 ± 0.00abA
1	0.25 ± 0.00abcdB	0.26 ± 0.00abD	0.23 ± 0.00abC	0.25 ± 0.00abB	0.20 ± 0.00aA	0.20 ± 0.00abA
2	0.42 ± 0.00acdE	0.23 ± 0.01abB	0.29 ± 0.01abC	0.32 ± 0.01abD	0.26 ± 0.01abA	0.26 ± 0.00abA
3	0.26 ± 0.00abcdD	0.23 ± 0.00abC	0.22 ± 0.00aA	0.21 ± 0.00aA	0.21 ± 0.01abA	0.18 ± 0.00aB
4	0.38 ± 0.01abcdC	0.35 ± 0.01abB	0.22 ± 0.01abA	0.46 ± 0.01bD	0.23 ± 0.01abA	0.36 ± 0.01bBC
5	0.23 ± 0.00abcD	0.20 ± 0.01aAB	0.20 ± 0.00aB	0.21 ± 0.01aC	0.20 ± 0.00aAB	0.19 ± 0.00abA
6	0.37 ± 0.00abcdE	0.30 ± 0.00abC	0.27 ± 0.00abB	0.40 ± 0.01abF	0.32 ± 0.00abD	0.19 ± 0.01abA
7	0.33 ± 0.01abcdE	0.22 ± 0.00abC	0.26 ± 0.00abA	0.25 ± 0.01abA	0.30 ± 0.01abD	0.20 ± 0.00abB
8	0.44 ± 0.01adE	0.29 ± 0.01aA	0.29 ± 0.01abA	0.39 ± 0.00abD	0.36 ± 0.00bC	0.25 ± 0.02abB
9	0.35 ± 0.01abcdAB	0.36 ± 0.01bAB	0.34 ± 0.02bA	0.35 ± 0.00abAB	0.24 ± 0.01abC	0.37 ± 0.01bB
10	0.22 ± 0.01bcAB	0.36 ± 0.01bD	0.29 ± 0.01abC	0.24 ± 0.00abE	0.23 ± 0.01abB	0.19 ± 0.01abA

Los valores se presentan como media ± desviación estándar (n = 3). Las letras minúsculas representan el efecto de los días de fermentación. Las letras mayúsculas representan el efecto de las muestras. Letras diferentes indican una diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ ).

Cuadro 7.10. Capacidad antioxidante (ABTS) de kombucha con pulpa de yaca molida.

Días	ABTS (mg ET/mL)					
	KV	KV50P	KV60P	KN	KN50P	KN60P
7	0.33 ± 0.01abcdA	0.33 ± 0.00abcdA	0.27 ± 0.00abcdC	0.25 ± 0.01abcdB	0.34 ± 0.01abcdA	0.23 ± 0.01abB
8	0.44 ± 0.01bcE	0.17 ± 0.01abcA	0.25 ± 0.01abcdB	0.39 ± 0.00abcdD	0.34 ± 0.03abcdC	0.16 ± 0.01ba
9	0.35 ± 0.01abcdB	0.43 ± 0.00adD	0.11 ± 0.00bC	0.35 ± 0.00abcdB	0.24 ± 0.00abcdA	0.21 ± 0.02abA
10	0.22 ± 0.01abcdD	0.15 ± 0.01bcC	0.11 ± 0.04bB	0.24 ± 0.00bcdD	0.21 ± 0.01acdD	0.37 ± 0.02abA

Los valores se presentan como media ± desviación estándar (n = 3). Las letras minúsculas representan el efecto de los días de fermentación. Las letras mayúsculas representan el efecto de las muestras. Letras diferentes indican una diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ ).

## 7.1.10 Crecimiento microbiano

### 7.1.10.1 Densidad óptica de crecimiento (D.O.)

Los resultados presentados en la Figura 7.8a indicaron que el crecimiento microbiano en la fase líquida de las muestras de kombucha aumentó significativamente al transcurrir el tiempo de fermentación después de 7 días. No se observaron diferencias significativas entre las muestras al término de la fermentación: KV ( $7.51 \pm 1.49$  g/L), KN ( $5.31 \pm 1.43$  g/L), KV50L ( $7.73 \pm 0.00$  g/L), KN50L ( $6.20 \pm 0.29$  g/L), KV60L ( $8.07 \pm 0.76$  g/L) y KN60L ( $7.82 \pm 0.84$  g/L). Esto podría indicar que la adición de pulpa de yaca es un sustrato que el cultivo simbiótico de microorganismos aprovecha para su crecimiento y reproducción. Nuestros resultados coinciden con los reportados por Ahmed et al. (2020) y Sreeramulu et al. (2000)

quienes determinaron que la densidad óptica de crecimiento del caldo de fermentación aumentaba a medida que transcurría el tiempo de fermentación en muestras de kombucha de té verde y de té negro en un periodo de 8 y 14 días, respectivamente.

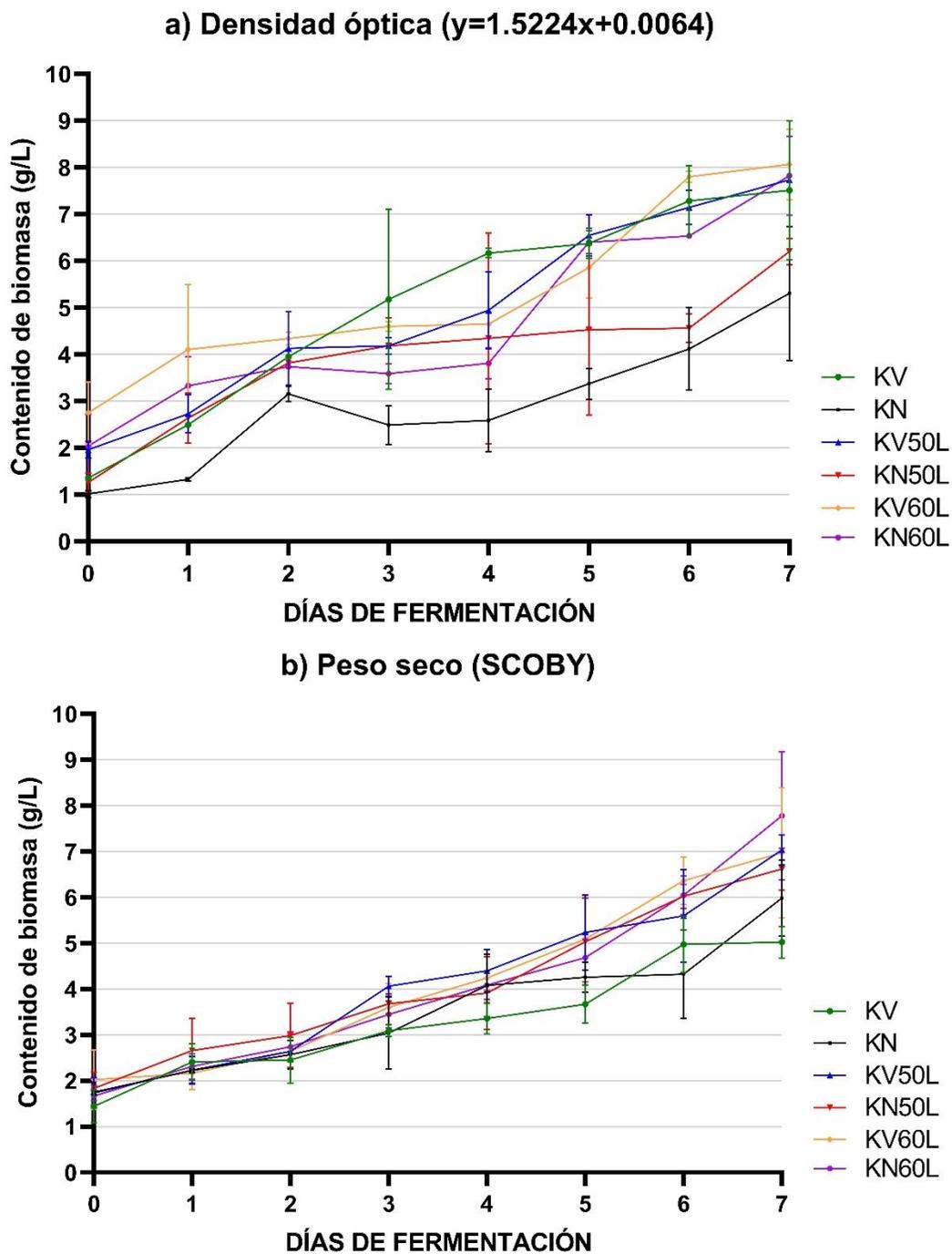


Figura 7.8 Crecimiento microbiano durante el desarrollo de la kombucha: a) densidad óptica de crecimiento (D.O.) y b) crecimiento de biopelícula (peso seco). KV (kombucha de té

verde), KN (kombucha de té negro), KV50L (kombucha de té verde con 50 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KN50L (kombucha de té negro con 50 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KV60L (kombucha de té verde con 60 g/L de pulpa de yaca lixiviada) y KN60L (kombucha de té negro con 60 g/L de pulpa de yaca lixiviada)

Abou-Taleb et al. (2017) y Talawat et al. (2006) notaron que la densidad óptica de crecimiento de la kombucha de té negro aumentó significativamente durante los primeros cuatro días y después aumentó gradualmente hasta que terminó la fermentación (14 días). Además, Neffe-Skocińska et al. (2017) encontraron que el recuento total de levaduras y bacterias del ácido acético aumentaba con la fermentación en un lapso de 10 días. Coton et al. (2017) estudiaron la evolución de las poblaciones microbianas de kombucha de la producción industrial a lo largo del tiempo (0, 2, 4 y 8 días) y observaron que la mayoría de las bacterias del ácido acético eran más abundantes en las biopelículas que en el caldo líquido al inicio de la fermentación, y después de 8 días llegaban a un equilibrio en comparación con las especies de levaduras que parecían bastante estables en ambas fases durante toda la fermentación.

#### **7.1.10.2 Crecimiento de biopelícula (peso seco)**

En la Figura 7.8b se muestra la cinética de producción de la biopelícula durante la fermentación de las muestras de kombucha, en las cuales se observó un incremento significativo en la producción de biomasa a lo largo de la fermentación. En la Figura 7.9 se muestra el crecimiento de la biopelícula, donde no se observaron diferencias significativas entre las muestras al término de la fermentación: KV ( $5.02 \pm 0.34$  g/L), KN ( $5.98 \pm 0.83$  g/L), KV50L ( $7.04 \pm 0.32$  g/L), KN50L ( $6.62 \pm 0.46$  g/L), KV60L ( $6.97 \pm 0.142$  g/L) y KN60L ( $7.78 \pm 1.4$  g/L). Ahmed et al. (2020) obtuvieron una producción máxima de biopelícula de 9.62 g/L después de 8 días de fermentación en una muestra de kombucha de té verde. La misma tendencia de aumento del peso seco del SCOBY con el tiempo de fermentación fue establecida por Amarasinghe et al. (2018) quienes informaron que el agrandamiento del SCOBY está relacionado con una matriz celulósica compuesta por el crecimiento de bacterias de ácido acético.

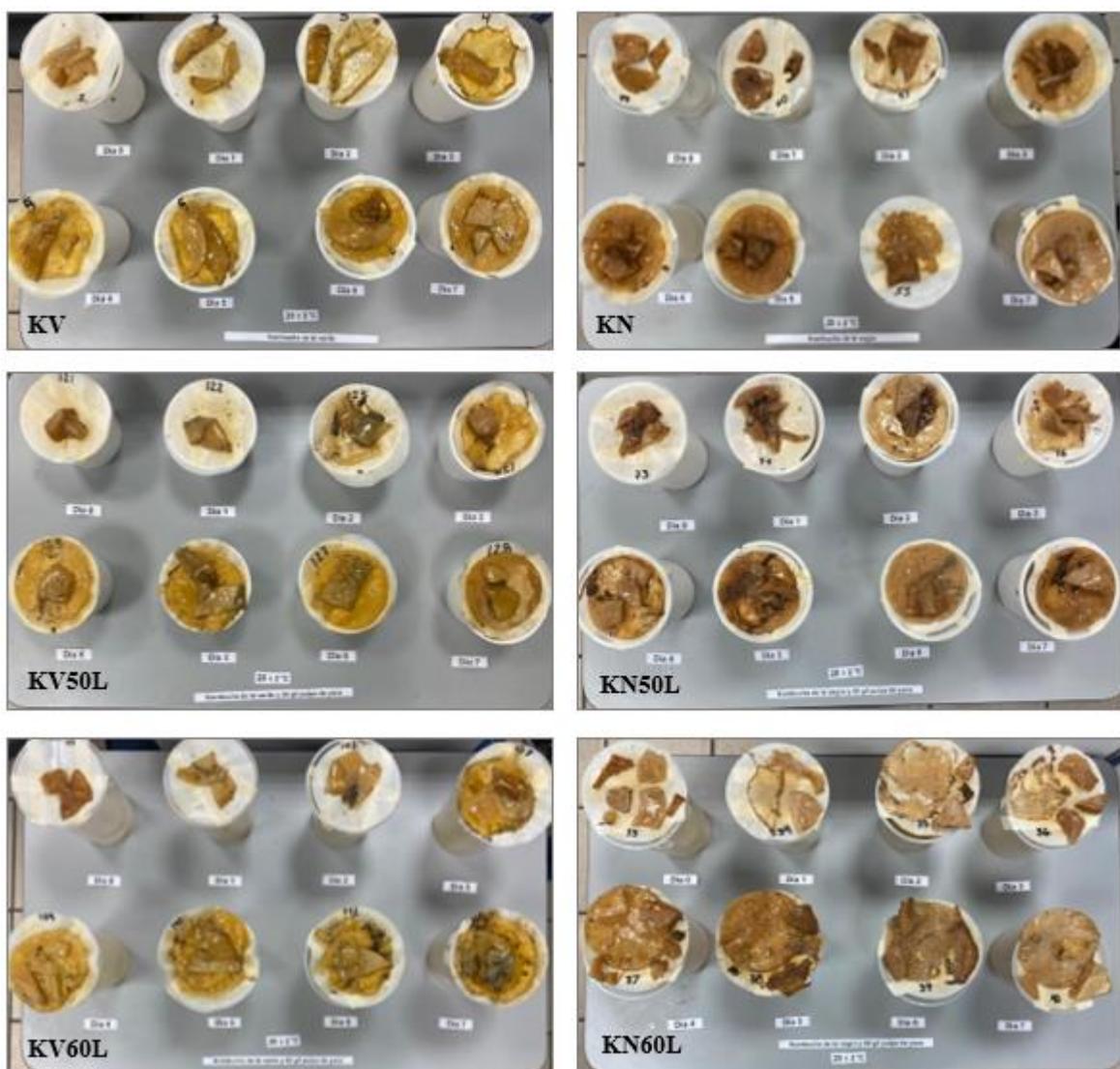


Figura 7.9 Crecimiento de la biopelícula en diferentes muestras de kombucha (húmeda).

Resultados similares fueron obtenidos por Kallel et al. (2012) quienes obtuvieron 7.2 y 8.9 g/L en muestras de kombucha de té verde y de té negro durante 15 días de fermentación, respectivamente. Sin embargo, nuestros resultados son mayores a los reportados por Leonarski et al. (2021) quienes reportan una producción de 4 g/L de biomasa en muestras de kombucha de pulpa residual de cerecita después de 15 días de fermentación. El aumento de la biomasa en la fase líquida y sólida en las muestras de kombucha con pulpa de yaca fue indicativo del éxito de la subsistencia de los microorganismos, confirmando así su capacidad de prosperar en los entornos con una tendencia similar a la del sustrato comúnmente utilizado en la preparación de esta bebida.

Existen varios tipos de bacterias que pueden producir celulosa microbiana, entre ellas *Acetobacter* y *Gluconacetobacter* (Mohite y Patil, 2014). Entre el género *Acetobacter*, la especie dominante es *Acetobacter xylinum*, que fue reclasificada como *Gluconacetobacter xylinus* y más recientemente como *Komagataeibacter xylinus* (Yamada et al., 2012). Una actividad bioquímica específica de esta bacteria es la oxidación de la glucosa a ácido glucónico, el cual se encuentra en la fase líquida, luego otro metabolismo específico conduce a la síntesis de celulosa microbiana formando la biopelícula que permanece en la superficie del líquido (Villarreal-Soto et al., 2018). Según Hornung et al. (2006), la biopelícula representa aproximadamente el 10% del total de células bacterianas, debido a que pueden quedar atrapadas en la matriz de celulosa contribuyendo de esta forma a su formación.

### **7.1.10.3 Parámetros de crecimiento microbiano**

Los parámetros de crecimiento obtenidos para las muestras analizadas se muestran en el Cuadro 7.11, donde no se observaron diferencias significativas de los parámetros calculados entre las muestras de kombucha analizadas. No encontramos estudios donde se reporten estos parámetros para este tipo de bebidas, por lo cual, no pudimos hacer la comparación. Sin embargo, consideramos que nuestros parámetros son bajos en comparación con microorganismos modelo como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

La velocidad específica máxima de crecimiento está influenciada por factores ambientales y factores endógenos. Entre los factores endógenos está la organización morfológica, la regulación y el control intracelular. Por ello, no es ilógico pensar que la velocidad máxima a la cual puede reproducirse un microorganismo dependerá esencialmente de la complejidad del sistema celular y, por ende, del tipo de microorganismo que se trate, por lo cual, a menor complejidad, mayor será la  $\mu_{\max}$  y decrecerá a medida que aumente la complejidad del sistema (Castañeda, 2019). Debido a que la biomasa evaluada en este estudio es un cultivo complejo de bacterias y levaduras se podría establecer que los parámetros obtenidos se encuentran dentro del rango para este tipo de cultivos microbianos. Se observó mayor velocidad de consumo de sustrato y de producción de ácido acético en las muestras KV50L, KV60L y KN60L. Estos resultados son coherentes, debido a que conforme la velocidad de consumo de sustrato aumenta, también la velocidad de producción se ve aumentada.

Cuadro 7.11. Velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ), velocidad específica de consumo de sustrato (qS), velocidad específica de producción de un metabolito (qP) y rendimiento efectivo (%) de las muestras fermentadas de kombucha.

<b>Muestra</b>	<b><math>\mu_{\max}</math> (día<sup>-1</sup>)</b>	<b>qS (g azúcares / g biomasa*día)</b>	<b>qP (g ac. acético / g biomasa*día)</b>	<b>qP (g etanol / g biomasa*día)</b>	<b>Rendimiento efectivo (%)</b>
KV	0.1968	0.3288	0.0087	0.4112	26.48
KN	0.1800	0.3448	0.0094	0.4180	24.70
KV50L	0.1920	0.6113	0.0535	0.3440	21.03
KN50L	0.1727	0.3970	0.0403	0.3414	22.98
KV60L	0.1608	0.8419	0.0605	0.2650	20.32
KN60L	0.1872	0.6500	0.0518	0.2595	24.18

El rendimiento efectivo obtenido para las muestras de kombucha se encontró dentro del rango de 20-26 %. Estos resultados coinciden con los reportados por Ahmed et al. (2020) quienes obtuvieron un rendimiento efectivo del 25.73 % en una muestra de kombucha de té verde fermentada durante 12 días. En general, se acepta que no todo el sustrato consumido se destinó a la síntesis de nueva biomasa, sino que parte de este se utilizó para mantener vivas las células existentes y para la síntesis de metabolitos. En consecuencia, la relación entre el consumo de sustrato dedicado al mantenimiento, crecimiento y síntesis de productos afectó el valor del rendimiento. A este consumo de sustrato que no redundaba en biomasa se le asocia con el mantenimiento de funciones vitales (recambio de material celular, mantenimiento de gradientes de concentración y movilidad) y con la síntesis de productos (Arranz y Peinado, 2017).

### **7.1.11 Análisis sensorial (etapa 1)**

La evaluación sensorial fue realizada en dos sesiones por un panel de 13 participantes preseleccionados no entrenados. Todas las muestras se presentaron al azar y se sirvieron a una temperatura entre 4-7 °C en vasos de plástico transparente codificados, se brindó agua potable para enjuagar la boca entre las muestras. Se evaluó color, olor, sabor, consistencia y aceptabilidad general, se utilizó una escala hedónica no estructurada en un rango de puntuación de 1 a 13. Después de analizar los resultados no se encontraron diferencias significativas entre las muestras de kombucha con lixiviado de pulpa de yaca para cada descriptor sensorial (Figura 7.10). Al igual que en las muestras anteriores, tampoco se

encontraron diferencias significativas en las muestras de kombucha con pulpa de yaca molida. Sin embargo, se logra visualizar que algunas muestras obtuvieron mayor promedio de calificación para cada descriptor sensorial, por ejemplo, se observa que para la aceptabilidad general (9.2-10.5) las muestras KV, KN y KV60L obtuvieron el mayor puntaje; para el olor (8.6-9.4) las muestras KV50L, KV60L y KN60L; para el sabor (9.6-11.6) las muestras KV, KN y KV60L; para la consistencia (10.9-11.7) las muestras KV y KN; y para el color (10-10.8) todas las muestras. Mientras que en las muestras de kombucha con pulpa molida todas las muestras obtuvieron valores similares en todos los atributos evaluados.

En general, las kombuchas de té verde y té negro obtuvieron los puntajes más altos, sin embargo, las muestras KV60L y KV60P se aproximaron a los valores de las muestras control, por lo que se puede afirmar que las bebidas de kombucha con la adición de pulpa de yaca serían igual de aceptadas que las bebidas tradicionales que se comercializan actualmente. A pesar de que el resto de las muestras obtuvieron valores dentro del rango de 6.5 a 13, este se encuentra entre la aceptación de “me es indiferente” y “me agrada” por parte del panel sensorial.

Ayed et al. (2016) realizaron una evaluación sensorial de kombucha de uva roja determinando un intenso sabor ácido en la muestra fermentada durante 12 días, la cual fue juzgada como inaceptable por el panel de catadores, mientras que la kombucha de uva fermentada durante 6 días recibió una buena aceptabilidad, sin embargo, obtuvo valores entre 4 (leve aversión) y 8 (gran agrado) de una escala de 9 puntos. Reiss (1994) informó que la prolongación de la fermentación por más de 10 días producía un sabor parecido al vinagre.

En otro estudio, Ayed y Hamdi (2015) obtuvieron una buena aceptabilidad general para la kombucha de tuna fermentada durante 6 días y no encontraron diferencias significativas con relación al jugo fresco de tuna. El jugo de tuna fermentado durante 12 días tuvo una menor aceptación, donde determinaron una correlación negativa entre la aceptación y la acidez.

Osiripun y Apisittiwong (2021) realizaron un análisis sensorial de kombuchas de jugo de piña, jugo de manzana y jugo de granada con 60 panelistas y una escala hedónica de 9 puntos, donde evaluaron color, sabor, olor y aceptación general de la bebida. No encontraron diferencias significativas entre las muestras para cada descriptor sensorial, concluyendo que

el jugo de piña, de manzana y de granada pueden mejorar las propiedades sensoriales de la bebida de kombucha.

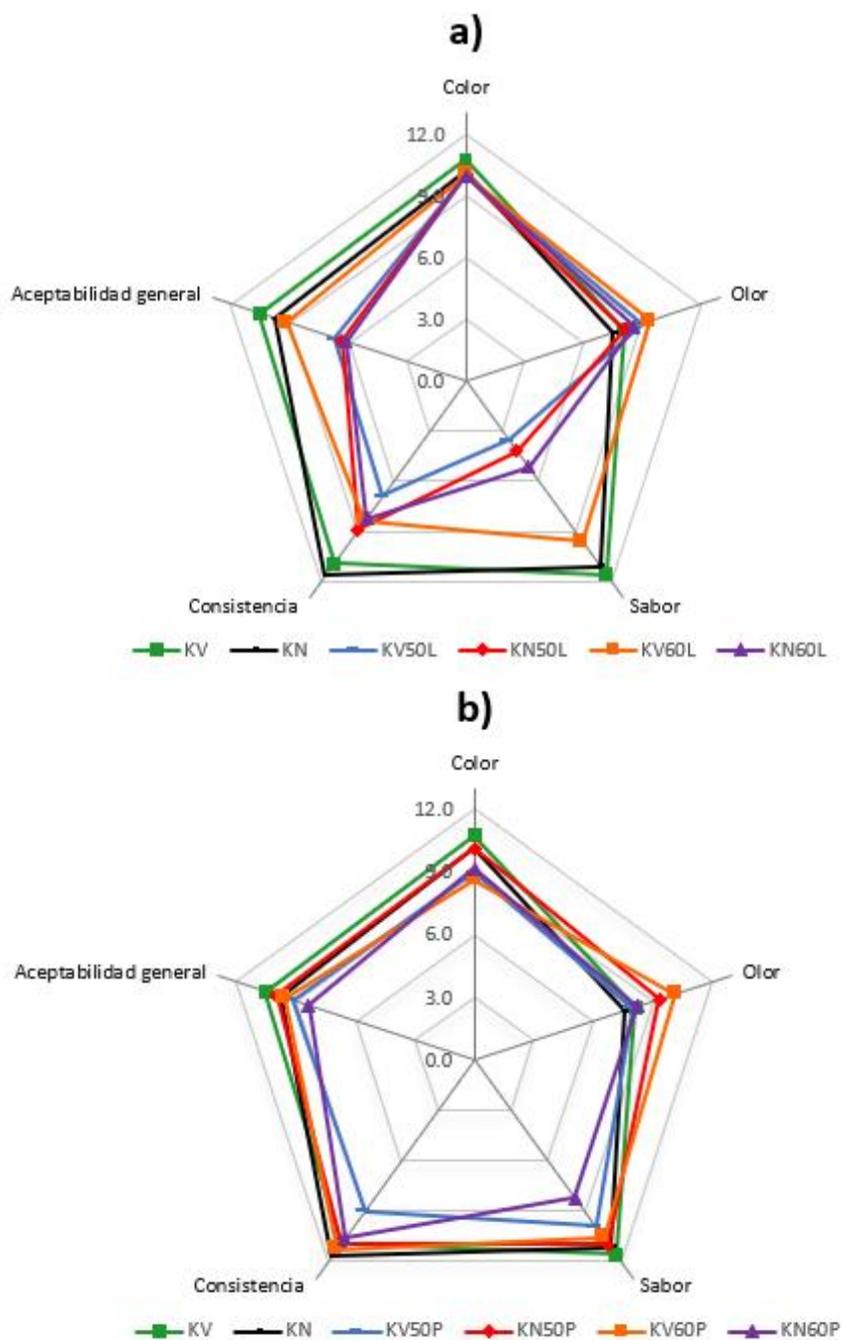


Figura 7.10 Evaluación sensorial del color, olor, sabor, consistencia y aceptabilidad general de muestras de kombucha: a) con pulpa de yaca lixiviada y b) con pulpa de yaca molida. KV (kombucha de té verde), KN (kombucha de té negro), KV50L (kombucha de té verde con 50

g/L de pulpa de yaca lixiviada), KN50L (kombucha de té negro con 50 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KV60L (kombucha de té verde con 60 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KN60L (kombucha de té negro con 60 g/L de pulpa de yaca lixiviada), KV50P (kombucha de té verde con 50 g/L de pulpa de yaca molida), KN50P (kombucha de té negro con 50 g/L de pulpa de yaca molida), KV60P (kombucha de té verde con 60 g/L de pulpa de yaca molida) y KN60P (kombucha de té negro con 60 g/L de pulpa de yaca molida).

Con base en los resultados de las evaluaciones sensoriales y los análisis realizados en la primer etapa de este estudio (SST, pH, AT, concentración de etanol, de grupos aminos libres, de proteínas, de CST, de FST y capacidad antioxidante) se eligió el té verde y la concentración de 60 g/L de pulpa de yaca, tanto para kombucha con pulpa de yaca lixiviada, como para kombucha con pulpa de yaca molida, siendo las muestras KV60L y KV60P seleccionadas para los análisis posteriores.

## **7.2 Etapa 2. Caracterización de dos formulaciones de kombucha con pulpa de yaca seleccionadas en la etapa anterior, determinación de la forma de inclusión de la pulpa de yaca, evaluación de su calidad microbiológica y análisis sensorial de las formulaciones desarrolladas en comparación con una kombucha comercial**

### **7.2.1 Caracterización de dos formulaciones de kombucha con pulpa de yaca**

En el cuadro 7.12 se muestra la caracterización de las formulaciones de kombucha con pulpa de yaca. Estos hallazgos apoyan la posibilidad de desarrollar una bebida de kombucha con pulpa de yaca con propiedades fisicoquímicas similares a la kombucha tradicional. El contenido de fenoles solubles totales fue mayor en las muestras KV60P y KV60L con respecto a la muestra KV. La capacidad antioxidante por los ensayos de FRAP y ABTS fue mejorada por la adición de pulpa de yaca, mientras que la actividad antioxidante por el ensayo DPPH fue mayor solo en la muestra KV60P con relación a KV. A pesar de que la adición de pulpa de yaca lixiviada y molida mejoran el contenido de fenoles, actividad antioxidante y características sensoriales con respecto a la bebida tradicional, se puede observar que la kombucha con la adición de pulpa de yaca molida (KV60P) presenta mejores características fisicoquímicas, sensoriales y antioxidantes que la kombucha con pulpa de yaca lixiviada (KV60L).

Cuadro 7.12. Caracterización de formulaciones de kombucha con pulpa de yaca.

<b>Parámetro/Muestra</b>	<b>KV</b>	<b>KV60L</b>	<b>KV60P</b>
SST (°Bx)	5.70 ± 0.00	5.17 ± 0.06	5.70 ± 0.00
pH	2.92 ± 0.01	2.74 ± 0.01	2.89 ± 0.01
AT (%)	0.12 ± 0.00	0.53 ± 0.01	0.24 ± 0.01
Etanol (%)	1.38 ± 0.02	2.32 ± 0.11	2.05 ± 0.01
CST (mg/mL)	42.63 ± 0.32	42.67 ± 5.00	44.55 ± 0.47
FST (mg EAG/mL)	0.33 ± 0.01	0.39 ± 0.01	0.56 ± 0.02
DPPH (mg ET/ mL)	0.18 ± 0.00	0.15 ± 0.00	0.39 ± 0.01
FRAP (mg ET/ mL)	0.81 ± 0.01	0.90 ± 0.00	1.09 ± 0.07
ABTS (mg ET/ mL)	0.22 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.23 ± 0.04

### 7.2.2 Determinación de la forma de inclusión de la pulpa de yaca en la kombucha con base a su calidad microbiológica

Con base a la calidad microbiológica se definió la forma de inclusión de la pulpa de yaca en la kombucha. La calidad microbiológica de las bebidas de kombucha se muestra en el Cuadro 7.13. Las bacterias coliformes totales estuvieron ausentes en todas las muestras del producto final (mes 0), sin embargo, al mes de almacenamiento las muestras KV y KV60L tuvieron la presencia de este tipo de microorganismos, lo que indica deficiencia en la calidad microbiológica de las muestras, aunque su presencia no necesariamente implica un riesgo sanitario (NOM-113-SSA1-1994). Los resultados obtenidos podrían deberse a una contaminación durante el almacenamiento del producto, sin embargo, las prácticas higiénicas de fabricación utilizadas se tendrían que optimizar para la producción en masa de la bebida fermentada.

Cuadro 7.13. Recuento en placa de coliformes totales, mesofílicos aerobios y mohos y levaduras en muestras de kombucha.

<b>Análisis</b>	<b>KV</b>		<b>KV60L</b>		<b>KV60P</b>	
	<b>Mes 0</b>	<b>Mes 1</b>	<b>Mes 0</b>	<b>Mes 1</b>	<b>Mes 0</b>	<b>Mes 1</b>
Coliformes totales (UFC/mL)	0a	122.5x10 <sup>1</sup> b	0a	30x10 <sup>1</sup> a	0a	0a
Mesofílicos aerobios (UFC/mL)	15.5x10 <sup>3</sup> a	18x10 <sup>3</sup> a	37.5x10 <sup>3</sup> a	86x10 <sup>1</sup> b	61x10 <sup>3</sup> a	3.5x10 <sup>3</sup> b
Levaduras (UFC/mL)	10x10 <sup>3</sup> a	18.5x10 <sup>5</sup> b	15.5x10 <sup>3</sup> a	79.5x10 <sup>1</sup> a	0.5x10 <sup>3</sup> a	123x10 <sup>1</sup> a

En el recuento de bacterias mesofílicas aerobias no se observó diferencia significativa en la muestra KV entre el mes 0 y 1. Los valores obtenidos en dichas muestras pueden deberse a la presencia de los microorganismos que conforman el cultivo simbiótico de bacterias y levaduras presente en las kombuchas debido a que no se aplicaron métodos químicos o físicos para la conservación del alimento, por ser una característica distintiva de este tipo de bebidas. Sin embargo, se tendría que emplear algún método, como la filtración, para asegurar la misma concentración de microorganismos en la bebida al ser envasadas. Se observó una disminución significativa de la concentración de bacterias mesofílicas aerobias en las muestras KV60L y KV60P después de un mes de almacenamiento. El decremento de la concentración de mesófilos aerobios en las muestras de kombucha con pulpa de yaca podría deberse a las condiciones de almacenamiento en frío, por lo cual, se inactivan los microorganismos reduciendo el contenido de microorganismos viables, y con ello se reduce la degradación del alimento (NOM-092-SSA1-1994). Sin embargo, por la naturaleza microbiológica de la bebida, la técnica empleada no es un indicador seguro para predecir la calidad sanitaria de la bebida (Morales, 2014). Por otra parte, el recuento de psicrófilos facultativos es importante para predecir la estabilidad del producto bajo las condiciones de almacenamiento establecidas en este estudio.

Se observó diferencia significativa en el recuento de mohos y levaduras en la muestra KV entre el producto recién envasado y al mes de almacenamiento. Esta diferencia puede deberse a la presencia de levaduras que conforman la microbiota normal de la kombucha. No se observó el crecimiento de mohos en ninguna muestra, solo se notó el crecimiento de levaduras, donde las colonias eran blancas cremosas y regulares. Se observó una disminución (no significativa) de la concentración de levaduras en las muestras KV60L y KV60P después de un mes de almacenamiento. El decremento en las muestras de kombucha con pulpa de yaca podría deberse a las condiciones de almacenamiento en frío, por lo cual, se inactivan los microorganismos reduciendo el contenido de microorganismos viables en las muestras, y con ello se reduce la degradación del alimento. Es de gran importancia cuantificar los mohos y levaduras en los alimentos, puesto que, el establecer la cuenta de estos microorganismos, permite su utilización como un indicador de prácticas sanitarias y de manipulación durante la producción y el almacenamiento de los productos (NOM-111-SSA1-1994). Neffe-

Skocińska et al. (2017) obtuvieron un mayor recuento de levaduras en kombucha de una mezcla de té verde y té negro en el rango de  $10^7$  UFC/mL bajo la misma temperatura y tiempo de fermentación de este estudio (25 °C, 10 días). Probablemente, la mayor cantidad de azúcar (100 g/L) y SCOBY (50 g/L) utilizados fueron los responsables de un mayor recuento de levaduras obtenidos después de la fermentación de kombucha.

En general, la muestra KV60P presentó mejor estabilidad microbiológica, además que no se encontró la presencia de microorganismos coliformes en ningún tiempo de almacenamiento. No se encontraron estudios similares donde se evaluará la calidad microbiológica de muestras de kombucha fermentada almacenadas bajo refrigeración. Sin embargo, Cardoso et al. (2020) obtuvieron un recuento de bacterias mesófilas y levaduras entre  $10^5$  y  $10^6$  para ambos grupos de microorganismos en muestras de kombucha de té verde y de té negro, concluyendo que se obtuvo una bebida de buena calidad fisicoquímica, microbiológica y sensorial.

La calidad microbiológica de las muestras analizadas mostró diferencias en la concentración de los diferentes grupos de microorganismos evaluados, esto podría deberse a que el método de preparación no está estandarizado. Sin embargo, la presencia de ciertos microorganismos es deseable en la bebida, ya que es uno de los factores que determinan las características sensoriales e incluso los posibles efectos sobre la salud (Rubio-Castillo et al., 2021).

### **7.2.3 Análisis sensorial (prueba de ordenamiento por rangos)**

La evaluación sensorial fue realizada por un panel de 33 participantes no entrenados. Se evaluaron 4 muestras de kombucha: kombucha de té verde (KV), kombucha de té verde con 60 g/L de pulpa de yaca lixiviada (KV60L), kombucha de té verde con 60 g/L de pulpa de yaca molida (KV60P) y kombucha comercial de té verde y tamarindo (KVT). Se evaluó el color, olor, sabor, consistencia y aceptabilidad general, donde el panelista ordenó de mayor a menor grado de aceptabilidad las muestras evaluadas para cada descriptor sensorial. Se comprobó la existencia de diferencias estadísticamente significativas en todos los descriptores sensoriales entre las muestras analizadas a través de la prueba de ordenamiento por rangos (Cuadro 7.14).

Cuadro 7.14. Suma de rangos de las muestras de kombucha (prueba de ordenamiento).

<b>Muestra</b>	<b>Color</b>	<b>Olor</b>	<b>Sabor</b>	<b>Consistencia</b>	<b>Aceptabilidad general</b>
KV	90a	74b	92ab	92ab	92ab
KV60L	106a	65b	61c	81ab	67b
KV60P	91a	116a	118a	107a	115a
KVT	63b	81b	66bc	76b	73b

En cuanto al color, los panelistas encontraron más agradable la muestra KV60L, sin embargo, no se encontraron diferencias con las muestras KV y KV60P, siendo la muestra KVT la de menor agrado. Se determinó que el olor, el sabor y la aceptabilidad general de la muestra KV60P fueron de mayor agrado en relación con el resto de las muestras, encontrándose que la adición de 60 g/L de pulpa molida mejora estos atributos en la bebida fermentada. La consistencia fue de mayor agrado en las muestras KV60P, KV60L y KV, sin embargo, solo se encontraron diferencias significativas entre las muestras KV60P y KVT, por lo que, la muestra de kombucha con pulpa de yaca molida presentó mejor consistencia que la muestra de kombucha comercial. Con relación a los resultados obtenidos podemos asegurar que la kombucha de té verde con adición de 60 g/L de pulpa de yaca molida presentó las mejores cualidades sensoriales con respecto a las kombuchas de té verde, de té verde con 60 g/L de lixiviado de pulpa de yaca y de té verde con tamarindo (marca comercial).

## **CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES**

## CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES

Los resultados de los análisis fisicoquímicos (SST, pH y AT) mostraron diferencias significativas entre las muestras de kombucha con pulpa de yaca lixiviada, con pulpa de yaca molida y los controles, encontrándose que la adición de 50 y 60 g/L de pulpa de yaca lixiviada o molida proporciona azúcares fermentables que son aprovechados por el cultivo simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY) para la producción de diferentes compuestos de interés.

La determinación del contenido de etanol mostró un comportamiento similar en todas las muestras a lo largo de los días de fermentación, obteniéndose valores entre 1.38 y 2.61 %, los cuales se encuentran dentro del rango para bebidas no alcohólicas fermentadas.

Las determinaciones del contenido de FST y capacidad antioxidante (DPPH, FRAP y ABTS) mostraron diferencias significativas entre los controles y las muestras de kombucha con pulpa de yaca lixiviada y pulpa molida, siendo las muestras KV60L y KV60P las que tuvieron mayor concentración de FST y capacidad antioxidante al final de la fermentación, principalmente por el ensayo FRAP, concluyendo que los compuestos fenólicos de la kombucha actúan como quelantes frente a los radicales libres.

La fermentación durante 7 días de kombucha de té verde y de té negro con la adición de pulpa de yaca lixiviada demostró ser un material biológico alternativo para el desarrollo y crecimiento del cultivo simbiótico de bacterias y levaduras. Siendo un sustrato que mostró afinidad con el SCOBY similar a la del sustrato tradicional (té verde y té negro).

Los resultados del presente estudio confirman que la adición de pulpa de yaca (lixiviada y molida) puede utilizarse como sustrato de fermentación para la bebida de kombucha. Diez días de fermentación fueron suficientes para mejorar las características fisicoquímicas, sensoriales y antioxidantes de las kombuchas con pulpa de yaca con respecto a las kombuchas de té negro y té verde.

La muestra KV60P presentó mejor estabilidad, calidad microbiológica y aceptabilidad por parte de los potenciales consumidores, concluyendo que la producción de kombucha con pulpa de yaca molida puede ser una alternativa con alto valor agregado para los productores en la diversificación de productos con potencial bioactivo a base de yaca, además que podría ser una bebida competitiva contra bebidas similares que ya existen en el mercado.

## **CAPÍTULO 9. REFERENCIAS**

## CAPÍTULO 9. REFERENCIAS

1. Aboulwafa, M., Youssef, F., Gad, H., Sarker, S., Nahar, L., Al-Azizi, M., y Ashour, M. (2019). Authentication and discrimination of green tea samples using UV–vis, FTIR and HPLC techniques coupled with chemometrics analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 164: 653-658.
2. Abou-Taleb, K. A., Ebeed, N. M., Abd El-salam, S. S., y Amin, S. A. (2017). Antimicrobial and antiproliferative, pro-apoptotic actions of Kombucha fermented solutions against colon and heptao cancer cell lines. *World J. Pharm. Life Sci.*, 3: 120–132.
3. Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitro benzenesulfonic Acid. *J. Agric. Food Chem.*, 27(6): 1256-1262.
4. Ahmed, R. F., Hikal, M. S., y Abou-Taleb, K. A. (2020). Biological, chemical and antioxidant activities of different types Kombucha. *Annals of Agricultural Sciences*, 65(1): 35–41.
5. Álvarez-Parrilla, E., L., De la Rosa, L. A., Martínez, N. R., y González-Aguilar, G. (2007). Total phenols and antioxidant capacity of commercial and wild mushrooms from Chihuahua, México. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5: 329-334.
6. Amarasinghe, H., Weerakkody, N.S., y Waisundara, V. Y. (2018). Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha “tea fungus” during extended periods of fermentation. *Food Sci. Nut.*, 6: 659-665.
7. AOAC: 932.12-2005 Que establece la determinación de solidos solubles totales, publicada en la Association of Official Agricultural Chemists. Maryland, EE. UU.
8. AOAC: 942.15-2005 Que establece la determinación de acidez titulable, publicada en la Association of Official Agricultural Chemists. Maryland, EE. UU.
9. AOAC: 981.12-2005 Que establece la determinación de pH, publicada en la Association of Official Agricultural Chemists. Maryland, EE. UU.
10. Apaza, V., y Choque, R. (2018). Tesis de Licenciatura en Ingeniería en Alimentos. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. Arequipa, Perú.
11. Arranz, F., y Peinado, J. (2017). A mesoscopic stochastic model for the specific consumption rate in substrate-limited microbial growth. *PLoS ONE*, 12(2): 1-14.

12. Astill, C., Birch, M. R., Dacombe, C., Humphrey, P. G., y Martin, P. T. (2001). Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions. *J. Agric. Food Chem.*, 49(11): 5340-5347.
13. Ayed, L., Abid, S., y Hamdi, M. (2016). Development of a beverage from red grape juice fermented with the Kombucha consortium. *Annals of Microbiology*, 67(1): 111–121.
14. Ayed, L., y Hamdi, M. (2015). Manufacture of a beverage from cactus pear juice using “tea fungus” fermentation. *Annals of Microbiology*, 65(4): 2293–2299.
15. Azad, A.K. (2000). Genetic Diversity of Jackfruit in Bangladesh and Development of Propagation Methods. Tesis de Doctorado. University of Southampton, UK.
16. Babitha, S., Sandhya, C., y Pandey, A. (2004). Natural food colorants, *Appl Bot Abstr.*, 23: 258–266.
17. Baliga, M. S., Shivashankara, A. R., Haniadka, R., Dsouza, J., y Bhat, H. P. (2011). Phytochemistry, nutritional and pharmacological properties of *Artocarpus heterophyllus* Lam (jackfruit): A review. *Food Research International*, 44(7): 1800–1811.
18. Battikh, H., Bakhrouf, A., y Ammar, E. (2012). Antimicrobial effect of Kombucha analogues. *LWT Food Science and Technology*, 47(1): 71-77.
19. Benzie, I., y Strain, J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70–76.
20. Bhattacharya, D., Bhattacharya, S., Patra, M. Chakravorty, S., Sarkar, S., Chakraborty, W., Koley, H., y Gachhui, R. (2016). Antibacterial Activity of Polyphenolic Fraction of Kombucha Against Enteric Bacterial Pathogens. *Curr. Microbiol.*, 73(6): 885–896.
21. Bhattacharya, D., Sinha, R., Mukherjee, P., Howlader, D. R., Nag, D., Sarkar, S., Koley, H., Withey, J. H., y Gachhui, R. (2020). Anti-virulence activity of polyphenolic fraction isolated from Kombucha against *Vibrio cholerae*. *Microbial Pathogenesis*, 140.
22. Bhattacharya, S., Gachhui, R., y Sil, P. C. (2013). Effect of Kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, 60: 328-340.

23. Biworo, A., Tanjung, E., Iskandar, K., y Suhartono, E. (2015). Antidiabetic and Antioxidant Activity of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) Extract. *Journal of Medical and Bioengineering*, 4(4): 318–323.
24. Blanc, P.J. (1996). Characterization of the tea fungus metabolites. *Biotechnology Letters*, 18: 139-142.
25. Burin, V. M., Falcão, L. D., Gonzaga, L.V., Fett, R., Rosier, J. P., y Bordignon-Luiz, M. T. (2010) Colour, phenolic content and antioxidant activity of grape juice. *Cienc Tecnol Aliment.*, 30(4):1027–1032.
26. Cabrera, C., Giménez, R., y López, M. C. (2003). Determination of tea components with antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.*, 51: 4427–4435.
27. Cardoso, O., Donato, M., Luxo, C., Almeida, N., Liberal, J., Figueirinha, A., y Batista, M. (2018). Anti-*Helicobacter pylori* potential of *Agrimonia eupatoria* L. and *Fragaria vesca*. *J. Funct. Foods*, 44: 299-303.
28. Cardoso, R. R., Neto, R. O., Dos Santos, C. T., Do Nascimento, T. P., Pressete, C. G., Azevedo, L., Martino, H. S., Cameron, L. C., Ferreira, M. S., y Barros, F. A. (2020). Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food Research International*, 128.
29. Castañeda, M. (2019). Estequiometría y cinética del crecimiento microbiano. Universidad Tecnológica Nacional- Facultad Regional La Plata.
30. Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D., y Gachhui, R. (2016). Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology*, 220: 63–72.
31. Chandrika, U. G., Jansz, E. R., y Warnasuriya, N. D. (2005). Chandrika-Analysis-of-Carotenoid-2005.pdf (pp. 186–190).
32. Chen, C., y Liu, B. Y. (2000). Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 89(5), 834–839.
33. Chen, H., y Sang, S. (2014). Biotransformation of tea polyphenols by gut microbiota. *J. Funct. Foods*, 7: 26-42.
34. Cheung, I. W., y Li-Chan, E. C. (2017). Enzymatic production of protein hydrolysates from steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) skin gelatin as inhibitors of dipeptidyl-

- peptidase IV and angiotensin-I converting enzyme. *Journal of Functional Foods*, 28: 254–264.
35. Chu, S. C., y Chen, C. (2006). Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chemistry*, 98(3): 502-507.
  36. Corazza, M. L., Rodrigues, D. G., y Nozaki, J. (2001). Preparação e caracterização do vinho de laranja. *Química Nova*, 24: 449–452.
  37. Coskun, O., Kanter, M., Korkmaz, A., y Oter, S. (2005). Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Pharmacological Research*, 51(2): 117-123.
  38. Coton, M., Pawtowski, A., Taminiou, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloume-Labarthe, L., Fall, A., Daube, G., y Coton, E. (2017). Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(5): 1-16.
  39. Crane, J. H., y Balerdi, C. F. (2000). La jaca en Florida. Departamento de Horticultural Sciences, Servicio de Extensión Cooperativa de la Florida, Instituto de Alimentos y Ciencias Agrícolas, Universidad de la Florida. (UF/IUFAS).
  40. Cusano, E., Simonato, B., y Consonni, R. (2018). Fermentation process of apple juice investigated by NMR spectroscopy. *LWT - Food Science and Technology*.
  41. Czaja, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S., y Brown, R. M. (2006). Microbial cellulose - The natural power to heal wounds. *Biomaterials*, 27(2): 145–151.
  42. De Almeida Souza, C., De Oliveira, I., De Oliveira, V., y Bittencourt C. (2020). Traditional Fermented Foods as an Adjuvant Treatment to Diabetes. *Current Geriatrics Reports*, 9: 242–250.
  43. De Faria, A. F., De Rosso, V. V., y Mercadante, A. Z. (2009). Carotenoid composition of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) determined by HPLC-PDA-MS/MS. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(2): 108–115.
  44. De Filippis, F., Troise, A., Vitaglione, P., y Ercolini, D. (2018). Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. *Food Microbiology*, 73: 11-16.
  45. De Roos, J., y De Vuyst, L. (2018). Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. *In Current Opinion in Biotechnology*, 49: 115–119.

46. Deghrigue, M., Chriaa, J., Battikh, H., y Abid, K. (2013). Antiproliferative and antimicrobial activities of kombucha tea. *African Journal of Microbiology Research*, 7(27): 3466-3470.
47. Dembinska-Kice, A., Mykkanen, O., Kice-Wilk, B., y Mykkanene, H. (2008). Total phenolic content, antioxidant activity and inhibitory potential against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase of fifteen tropical fruits. *Brit J Nut.*, 99: 109-117.
48. Devasagayam, P. A., Tilak, J. C., Bloor, K. K., Ketaki, S., Saroj, S., Ghaskadbi, L., y Lele, R. D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *JAPI*, 52: 291-297.
49. Dickmann, M., Schneider, R., Armando, S., Seehusen, K., y Hager, P. (2017). Analysis of the role of acidity and tea substrate on the inhibition of  $\alpha$ -amylase by Kombucha. *J. Nutr. Food Technol.*, 1: 1-5.
50. Dufresne, C., y Farnworth, E. (2000). Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Research International*, 33: 409-421.
51. Ďuračková, Z. (2010). Some current insights into oxidative stress. *Physiological Research*, 59(4): 459-469.
52. Dutta, D., y Gachhui, R. (2007). Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter kombuchae* sp. nov., isolated from Kombucha tea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 353–357.
53. Elfazazi, K., Harrak, H., Achchoub, M., y Benbati, M. (2020). Physicochemical criteria, bioactive compounds, and sensory quality of Moroccan traditional carob drink. *Materials Today: Proceedings*, 5: 21-26.
54. Esa, F., Tasirin, S. M., y Rahman, N. A. (2014). Overview of bacterial cellulose production and application. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2: 113–119.
55. Escudero, B., Cerrillo, I., Herrero, G., Hornero, D., Gil, A., Medina, S., Ferreres, F., Berna, G., Martín, F., y Fernandez, M. (2013). Fermented Orange Juice: Source of Higher Carotenoid and Flavanone Contents *J. Agric. Food Chem.*, 61: 8773–8782.
56. Fan, Z., Wang, Z., y Liu, J. (2011). Cold-field fruit extracts exert different antioxidant and antiproliferative activities *in vitro*. *Food chemistry*, 129(2): 402-407.

57. Fang, S. C., Hsu, C. L., y Yen, G. C. (2008). Anti-inflammatory effects of phenolic compounds isolated from the fruits of *Artocarpus heterophyllus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12): 4463–4468.
58. Ferri, M., Gianotti, A. y Tassoni, A. (2013). Optimization of assay conditions for the determination of antioxidant capacity and polyphenols in cereal food components. *Journal of Food Composition and Analysis*, 30: 94–101.
59. Frank, S., y Günther, F. (1991). Kombucha: Healthy Beverage and Natural Remedy from the Far East, *Ennsthaler*.
60. Fu, C., Yan, F., Cao, Z., Xie, F., y Lin, J. (2014). Antioxidant activities of Kombucha prepared from three different substrates and changes in content of probiotics during storage. *Food Science and Technology (Campinas)*, 34(1): 123-126.
61. Gaggia, F., Baffoni, L., Galiano, M., Nielsen, D., Jakobsen, R., Castro-Mejía, J., Bosi, S., Truzzi, F., Musumeci, F., Dinelli, G., y Di Gioia, D. (2019). Kombucha Beverage from Green, Black and Rooibos Teas: A Comparative Study Looking at Microbiology, Chemistry and Antioxidant Activity *Nutrients*, 11: 1-22.
62. González, M., y González, V. (2013). Organic acids. In L. M. L. Nollet, y Fidel Toldrá (Eds.), *Food Analysis by HPLC* (pp. 443–465), third edition. Boca Raton: CRC Press Taylor y Francis Group.
63. Graham, H. N. (1992). Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine*, 21: 334–350.
64. Gramza-Michałowska, A., Kulczyński, B., Xindi, Y., y Gumienna, M. (2016). Research on the effect of culture time on the kombucha tea beverage's antiradical capacity and sensory value. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 15(4): 447–457.
65. Greenwalt, C. J., Steinkraus, K. H., y Ledford, R. A. (2000). Kombucha, the fermented tea: Microbiology, composition, and claimed health effects. *Journal of Food Protection*, 63(7): 976–981.
66. Guo, Q., Zhao, B., Li, M., Shen, S., y Xin, W. (1996). Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1304: 210–222.
67. Hamilton, H. K., y Rose, M. B. (1985). *Diagnóstico Clínico*. México: Interamericana: 106-115.

68. Haq, N. (2006). Jackfruit, *Artocarpus heterophyllus*, Southampton Centre for Underutilised Crops, University of Southampton, Southampton, UK.
69. Holetz, F. B., Pessini, G. L., Sanches, N. R., Cortez, A. G., Nakamura, C. V., y Diasfilho, B. P. (2002). Triagem de algumas plantas utilizadas na medicina popular brasileira para o tratamento de doenças infecciosas. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97: 1027-1031.
70. Hornedo-Ortega, R., Krisa, S., García-Parrilla, M., y Richard, T. (2018). Effects of gluconic and alcoholic fermentation on anthocyanin composition and antioxidant activity of beverages made from strawberry. *LWT - Food Science and Technology*, 69: 382-389.
71. Hornung, M., Ludwig, M., Gerrard, A., y Schmauder, H. (2006). Optimizing the Production of Bacterial Cellulose in Surface Culture: Evaluation of Substrate Mass Transfer Influences on the Bioreaction (Part 1). *Eng. Life Sci*, 6: 537–545.
72. Hur, S. J., Lee, S. Y., Kim, Y. C., Choi, I. y Kim, G. B. (2014). Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chem.*, 160: 346–356.
73. Ivanišová, E., Meňhartová, K., Terentjeva, M., Godočiková, L., Árvay, J., y Kacaniova, M. (2019). "Kombucha Tea Beverage: Microbiological Characteristic, Antioxidant Activity, and Phytochemical Composition". *Acta Alimentaria*, 48: 324-31.
74. Ivanišová, E., Meňhartová, K., Terentjeva, M., Harangozo, L., Kántor, A., y Kačániová, M. (2020). The evaluation of chemical, antioxidant, antimicrobial and sensory properties of kombucha tea beverage. *Journal of Food Science and Technology*, 57: 1840–1846.
75. Jafari, R., Naghavi, N., Khosravi-Darani, K., Doudi, M., y Shahanipour, K. (2020). Kombucha microbial starter with enhanced production of antioxidant compounds and invertase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29: 1-9.
76. Jagtap, U. B., Panaskar, S. N., y Bapat, V. A. (2010). Evaluation of antioxidant capacity and phenol content in jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) fruit pulp. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(2): 99–104.
77. Jagtap, U. B., Waghmare, S. R., Lokhande, V. H., Suprasanna, P., y Bapat, V. A. (2011). Preparation and evaluation of antioxidant capacity of Jackfruit (*Artocarpus*

- heterophyllus* Lam.) wine and its protective role against radiation induced DNA damage. *Industrial Crops and Products*, 34(3): 1595–1601.
78. Jakubczyk, K., Kałdu, J., Kochman, J., y Janda, K. (2020). Chemical Profile and Antioxidant Activity of the Kombucha Beverage Derived from White, Green, Black and Red Tea. *Antioxidants*, 9: 447-462.
  79. Jarvis, B. (1996). Cider, perry, fruit wine and other alcoholic fruit beverages. Fruit Processing. *London: Academic Press.:* 97-103.
  80. Jayabalan, R., Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., y Sathishkumar, M. (2014). A review on kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4): 538–550.
  81. Jayabalan, R., Malini, K., Sathishkumar, M., Swaminathan, K., y Yun, S. E. (2010). Biochemical characteristics of tea fungus produced during kombucha fermentation. *Food Sci. Biotechnol.*, 19: 843–847.
  82. Jayabalan, R., Marimuthu, S., Thangaraj, P., Sathishkumar, M., Binupriya, A. R., Swaminathan, K., y Sei, E. Y. (2008). Preservation of Kombucha tea - effect of temperature on tea components and free radical scavenging properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19): 9064-9071.
  83. Jayabalan, R., Marimuthu, S., y Swaminathan, K. (2007). Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*, 102: 392–398.
  84. Jayasekera, S., Molan, A. L., Garg, M., y Moughan, P. J. (2011). Variation in antioxidant potential and total polyphenol content of fresh and fully fermented Sri Lanka tea. *Food Chemistry*, 125: 536–541.
  85. Junior, R. J., Batista, R. A., Rodrigues, S. A., Filho, L. X., y Silva Lima, A. (2009). Antimicrobial activity of broth fermented with kombucha colonies. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 1: 72–78.
  86. Kallel, L., Desseaux, V., Hamdi, M., Stocker, P., y Ajandouz, E. (2012). Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. *Food Research International*, 49: 226–232.

87. Khan, R., Zerega, N., Hossain, S., y Zuberi, M. I. (2010). Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) diversity in Bangladesh: Land use and artificial selection. *Economic Botany*, 64(2): 124–136.
88. Khokhar, S., y Owusu-Apenten, R. K. (2003). Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure-activity relations. *Food Chemistry*, 81: 133–140.
89. Kim, O. M., Jang, S. Y., Woo, S. M., Jo, Y. J., Choi, M. S., y Jeong, Y. J. (2010). Changes in the physicochemical properties of tomato wine by alcohol fermentation. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 39(10): 1516-1521.
90. Kole, A., Jones, H., Christensen, R., y Gladstein, J. (2009). A Case of Kombucha Tea Toxicity. *Journal of Intensive Care Medicine*, 24(3): 205-208.
91. Krinsky, N. I., Landrum, J. T., y Bone, R. A. (2003). Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. *Annu. Rev. Nutr.*, 23: 171-201.
92. La Torre C., Fazio A., Caputo P., Plastina P., Caroleo M. C., Cannataro R., Cione E. (2021). Effects of Long-Term Storage on Radical Scavenging Properties and Phenolic Content of Kombucha from Black Tea. *Molecules*, 26: 5474.
93. Leonarski, E., Cesca, K., Zanella, E., Stambuk, B., De Oliveira, D., Poletto, P. (2021). Production of kombucha-like beverage and bacterial cellulose by acerola byproduct as raw material. *LWT - Food Science and Technology*, 135: 1-8.
94. Lira, V., Camacho, N., Wachter-Rodarte, C., y Trejo, M. (2008). Estudio comparativo de enzimas que degradan la pared celular en diferentes variedades de mango durante su maduración. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*.
95. Liu, C. H., Hsu, W. H., Lee, F.L., y Liao, C. C. (1996). The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation. *Food Microbiology*, 13: 407–415.
96. Lobo, R., Dias, F., y Shenoy, C. (2017). Kombucha for healthy living: evaluation of antioxidant potential and bioactive compounds. *Int. Food Res. J.*, 24: 541-546.
97. Loewus, F. (1952). Improvement in Anthrone Method for Determination of Carbohydrates. University of Minnesota. Minneapolis, Minn.
98. Lončar, E., Đurić, M., Malbaša, R., Kolarov, L., y Klasnja, M. (2006). Influence of working conditions upon kombucha conducted fermentation of black tea. *Food and Bioproducts Processing*, 84: 186–192.

99. Lozano, J., Juárez-Flores, B., Pinos-Rodríguez, J., Aguirre-Rivera, J.R., Álvarez-Fuentes, G. (2012). Supplementary effects of vinegar on body weight and blood metabolites in healthy rats fed conventional diets and obese rats fed high-caloric diets. *J. Med. Plants Res.*, 6: 4135–4141.
100. Maia, G. S., Andrade, E. H., y Zoghbi, M. B. (2004). Aroma volatiles from two fruit varieties of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus Lam.*). *Food Chemistry*, 85: 195-197.
101. Maier, T., Schieber, A., Kammerer, D. R., y Carle, R. (2009). Residues of grape (*Vitis vinifera*) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chem*, 112: 551–559.
102. Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., y Čanadanović-Brunet, J. M. (2011). Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food Chemistry*, 127(4): 1727–1731.
103. Malbaša, R., Lončar, E., y Djuric, M. (2008). Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. *Food Chemistry*, 106: 1039–1045.
104. Mani-López, E., García, H., y López-Malo, A. (2012). Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food Res Int*, 45: 713-721.
105. Marsh, A., O'sullivan, O., Cotter, P., Marsh, A. J., Hill, C., Ross, R. P., y Cotter, P. D. (2014). Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiol*, 38:171–178.
106. Martínez, C., y Ramos, M. (2004). Propuesta de un método económico para la cuantificación de alcohol etílico. *Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica*, 29.
107. Mata-Montes de Oca, M., Osuna-García, J. A., Hernández-Estrada, A., Ochoa-Villarreal, M., y Tovar-Gómez, B. (2007). Efecto del 1-metilciclopropeno y calidad de frutos de jaca (*Artocarpus heterophyllus Lam.*). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 13(2): 165–170.
108. Mizuta, A. G., De Menezes, J. L., Dutra, T. V., Ferreira, T. V., Castro, J. C., Da Silva, C. A., Pilau, E. J., Machinski, M., y Abreu, B. A. (2020). Evaluation of antimicrobial activity of green tea kombucha at two fermentation time points against *Alicyclobacillus* spp. *LWT - Food Science and Technology*, 130: 1-8.
109. Mohite, B.V., y Patil, S.V. (2014). A novel biomaterial: bacterial cellulose and its new era applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 61: 101–110.

110. Montreau, F. (1972). Sur le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins par la méthode Folin-Ciocalteu. *OENO One*, 6(4 SE-Original research articles), 397–404.
111. Morelos-Flores, D. (2020). Estudio de la simulación de mercadeo en yaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam) tratada con 1-metilciclopropeno. Tesis de Maestría en Ciencias en Alimentos. Instituto Tecnológico de Tepic, Tepic, Nayarit, México.
112. Mousavi, S. M., Hashemi, S. A., y Amani, A. M. (2018). “Pb (II) removal from synthetic wastewater using Kombucha Scoby and graphene oxide/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>,” *Physical Chemistry Research.*, 6(4): 759–771.
113. Mukprasirt, A., y Sajjaanantakul, K. (2004). Physico-chemical properties of flour and starch from jackfruit seed. *International Journal Food Science Technology*, 39(3): 271–276.
114. Muniz, C. R., Borges, F., Abreu, F. A., Nassu, R. T., y Freitas, C. A. (2002). Bebidas fermentadas a partir de frutos tropicais. *Boletim Do CEPPA*, 20: 309–322.
115. Nagao, T., Komine, Y., Soga, S., Meguro, S., Hase, T., y Tanaka, Y. (2005). Ingestion of a tea rich in catechins leads to a reduction in body fat and malondialdehyde-modified LDL in men<sup>1</sup>. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81: 122–129.
116. Neffe-Skocińska, K., Sionek, B., Ścibisz, I., y Kołożyn-Krajewska, D. (2017). Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological, and sensory properties. *CyTA - Journal of Food*: 1-8.
117. Neto, E., y Cruz, J. (2010). Elaboration a beverage fermented alcoholic of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, 4(2): 186-197.
118. Nguyen, N. K., Nguyen, P. B., Nguyen, H. T., y Le, P. H. (2015). Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional Kombucha for high-level production of glucuronic acid. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2): 1149-1155.
119. Norma Oficial Mexicana NOM-199-SCFI-2017. Bebidas alcohólicas. Denominación, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. Publicada en el Diario Oficial de la Federación. Ciudad de México, México.

120. Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Publicada en el Diario Oficial de la Federación. Ciudad de México, México.
121. NORMA Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. Publicada en el Diario Oficial de la Federación. Ciudad de México, México.
122. Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Publicada en el Diario Oficial de la Federación. Ciudad de México, México.
123. Ong, B. T., Nazimah, A. H., Osman, A., Quek, S. Y., Voon, Y. Y., Hashim, D. M., Chew, P. M., y Kong, Y. W. (2006). Chemical and flavour changes in jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) cultivar J3 during ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 40(3): 279–286.
124. Osiripun, V., y Apisittiwong, T. (2021). Polyphenol and antioxidant activities of Kombucha fermented from different teas and fruit juices. *Journal of Current Science and Technology*, 11(1): 188-196.
125. Panda, S. K., Behera, S. K., Sahu, U. C., Ray, R. C., Kayitesi, E., y Mulaba-Bafubandi, A. F. (2016). Bioprocessing of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* L.) Pulp into wine: Technology, proximate composition, and sensory evaluation. *African Journal of Science, Technology, Innovation and Development*, 8(1): 27–32.
126. Pedrero, D., y Pangborn, R. (1997). Evaluación Sensorial de los Alimentos. Métodos analíticos. 1ª edición. Ed. Alhambra Mexicana. México.
127. Pellegrini, R., Pannala, N., Yang, A., y Rice-Evans, M. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.*, 26: 1231–1237.
128. Pérez-Jiménez, J., Arranza, S., Taberner, M., Díaz-Rubio, M., Serrano, J., Goñi, I., y Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils, and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41(3): 274-285.
129. Piña-Dumoulin, G., Quiroz, J., y Ochoa, A. (2010). Physical-Chemistry Characterization of Fresh Fruits. *Agronomía Tropical*, 60(1): 35–42.

130. Podolich, O., Zaets, I., Kukharenko, O., Orlovska, I., Reva, O., Khirunenko, L., y Kozyrovska, N. (2016). The first space-related study of a Kombucha multimicrobial celluloseforming community: Preparatory laboratory experiments. *Origins Life Evol Biospheres*: 1–17.
131. Prior, R. L., y Cao, G. (2000). Antioxidant Phytochemicals in Fruits and Vegetables. *Diet and Health Implications*, 35(617): 588–589.
132. Reis, B. A., Kosińska-Cagnazzo, A., Schmitt, R., y Andlauer, W. (2014). Fermentation of plant material - effect on sugar content and stability of bioactive compounds. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 64(4): 235–241.
133. Reiss, J. (1994) Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Z Lebensm Unters Forsch*, 198: 258–61.
134. Reva, O. N., Zaets, I. E., Ovcharenko, L. P., Kukharenko, O. E., Shpylova, S. P., Podolich, O. V., y Kozyrovska, N. O. (2015). Metabarcoding of the Kombucha microbial community grown in different microenvironments. *AMB Express*, 5(1):124–132.
135. Rubio-Castillo, A., Méndez-Romero, I., Reyes-Díaz, R., Santiago-López, L., Vallejo-Cordoba, B., Hernández-Mendoza, A., Sáyago-Ayerdi, S., y González-Córdova, A. (2021). Tejuino, a Traditional Fermented Beverage: Composition, Safety Quality, and Microbial Identification. *Foods*, 10(10): 2446–2461.
136. Ruiz-Montañez, G., Burgos-Hernández, A., Calderón-Santoyo, M., López-Saiz, C. M., Velázquez-Contreras, C. A., Navarro-Ocaña, A., y Ragazzo-Sánchez, J. A. (2015). Screening antimutagenic and antiproliferative properties of extracts isolated from Jackfruit pulp (*Artocarpus heterophyllus* Lam). *Food Chemistry*, 175: 409–416.
137. Ruka, D. R., Simon, G. P., y Dean, K. M. (2012). Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 89(2): 613–622.
138. Santos, S. C., Almeida, S. S., Toledo, A. L., Santana, J. C. y Souza, R. R. (2005). Elaboração e análise sensorial do fermentado de acerola. *Brazilian Journal of Food Technology*, 5: 47–50.

139. Santos, W. C., Barbosa, C. D., y Lacerda, I. A. (2017). Obtenção e caracterização de kombucha de chá preto. 69a Reunião Anual Da SBPC - 16 a 22 de Julho de 2017, 22–24.
140. Saxena, A., Bawa, A. S., y Raju, P. S. (2009). Optimization of a multitarget preservation technique for jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* L.) bulbs. *Journal of Food Engineering*, 91(1): 18–28.
141. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2019). Información: Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. SIAP, Ciudad de México, México. Sitio web: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
142. Shamsudin, R., Ling, C., Nyuk, C., Muda, N., y Hassan, O. (2009). Chemical Compositions of the Jackfruit Juice (*Artocarpus*) Cultivar J33 During Storage. *Journal of Applied Sciences*, 9(17): 3202-3204.
143. Sievers, M., Lanini, C., Weber, A., Schuler-Schmid, U., y Teuber, M. (1995). Microbiology and Fermentation Balance in a Kombucha Beverage Obtained from a Tea Fungus Fermentation. *System. Appl. Microbiol*, 18: 590-594.
144. Sreeramulu, G., Zhu, Y., y Knol, W. (2000). Kombucha Fermentation and Its Antimicrobial Activity. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 2589-2594.
145. Srihari, T., Karthikesan, K., Ashokkumar, N., y Satyanarayana, U. (2013). Antihyperglycemic efficacy of Kombucha in streptozotocin-induced rats. *Journal of Functional Foods*, 5(4): 1794-1802.
146. Srihari, T., y Satyanarayana, U. (2012). Changes in free radical scavenging activity of Kombucha during fermentation. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, 4: 1978-1981.
147. Stahl, W., y Sies, H. (2005). Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim Biophys*, 1740: 101-107.
148. Sun, T. Y., Li, J. S., y Chen, C. (2015). Effects of blending wheatgrass juice on enhancing phenolic compounds and antioxidant activities of traditional kombucha beverage. *Journal Food Drug Analysis*, 23: 709–718.
149. Talawat, S., Ahantharik, P., Laohawiwattanakul, S., Premasuk, A., y Ratanapo, S., (2006). Efficacy of fermented teas in antibacterial activity. *Kasetsart Journal-Natural Science*, 40: 925–933.

150. Talebi, M., Frink, L. A., Patil, R. A., y Armstrong, D. W. (2017). Examination of the varied and changing ethanol content of commercial kombucha products. *Food Analytical Methods*, 10(12): 4062–4067.
151. Torino, M. I., Limón, R. I., Martínez-Villaluenga, C., Makinen, S., Pihlanto, A., Vidal-Valverde, C., y Frias, J. (2013). Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid-state fermented lentils. *Food Chemistry*, 136(2): 1030-1037.
152. Troy, A. A., y Terra, A. G. (2014). A simplified method for measuring secreted invertase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry & Pharmacology: Open Access*, 3(6): 151–156.
153. Torskangerpoll, K., y Andersen, O. M. (2005). Color stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values. *Food Chem*, 89: 427-440.
154. Tu, C., Tang, S., Azi, F., Hu, W. y Dong, M. (2019). Use of kombucha consortium to transform soy whey into a novel functional beverage. *Journal of Functional Foods*, 52: 81-89.
155. Vargas-Torres, A., Becerra-Loza, A. S., Sayago-Ayerdi, S. G., Palma-Rodríguez, H. M., García-Magaña, M. L., y Montalvo-González, E. (2017). Combined effect of the application of 1-MCP and different edible coatings on the fruit quality of jackfruit bulbs (*Artocarpus heterophyllus* Lam) during cold storage. *Scientia Horticulturae*, 214: 221–227.
156. Velićanski, A., Cvetković, D., Markov, S., Šaponjac, T., y Vuli, J. (2014). Antioxidant and Antibacterial Activity of the Beverage Obtained by Fermentation of Sweetened Lemon Balm (*Melissa offi cinalis* L.) Tea with Symbiotic Consortium of Bacteria and Yeasts. *Food Technol. Biotechnol.*, 52(4): 420–429.
157. Velićanski, A., Cvetković, D., y Markov, S. (2013). Characteristics of Kombucha fermentation on medicinal herbs from *Lamiaceae* family. *Romani*, 18: 8034–8042.
158. Vijayaraghavan, R., Singh, M., Rao, P., Bhattacharya, R., Kumar, P., Sugendran, K., Kumar, O., Pant, S., y Singh, R. (2000). Subacute (90 days) oral toxicity studies of Kombucha tea. *Biomed. Environ. Sci*, 13: 293-299.
159. Villalobos, M. (2017). Jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) fruta exótica en Nayarit. Enciclopedia centenario de Nayarit.

160. Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J. P., Renard, T., Rollan, S., y Taillandier, P. (2019). Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. *Process Biochemistry*, 83: 44–54.
161. Villarreal-Soto, S. A., Jalloul-Bouajila, S. B., Souchard, J.P., y Taillandier, P. (2018). Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of Food Science*, 83: 580-588.
162. Vīnas, I., Semjonovs, P., Linde, R., y Deniņa, I. (2014). Current Evidence on Physiological Activity and Expected Health Effects of Kombucha Fermented Beverage. *J Med Food*, 17(2): 179–188.
163. Vitas, J. S., Cvetanović, A. D., Mašković, P. Z., Švarc-gajić, J. V. y Malbaša, R. V. (2018). Chemical composition and biological activity of novel types of kombucha beverages with yarrow. *Journal of Functional Food*, 44: 95-102.
164. Vitas, J. S., Malbaša, R. V, Grahovac, J. A., y Lončar, E. S. (2013). The antioxidant activity of kombucha fermented milk products with stinging nettle and winter savory. *Chemical Industry y Chemical Engineering Quarterly*, 19(1): 129–139.
165. Watawana, M. I., Jayawardena, N., Gunawardhana, C. B., y Waisundara, V. Y. (2016). Enhancement of the antioxidant and starch hydrolase inhibitory activities of king coconut water (*Cocos nucifera* var. *aurantiaca*) by fermentation with kombucha “tea fungus.” *International Journal of Food Science and Technology*, 51(2): 490–498.
166. Watawana, M. I., Jayawardena, N., Ranasinghe, S. J., y Waisundara, V. Y. (2017). Evaluation of the Effect of Different Sweetening Agents on the Polyphenol Contents and Antioxidant and Starch Hydrolase Inhibitory Properties of Kombucha. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(1).
167. Wei, B. L., Weng, J. R., Chiu, P. H., Hung, C. F., Wang, J. P., y Lin, C. N. (2005). Antiinflammatory flavonoids from *Artocarpus heterophyllus* and *Artocarpus communis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10): 3867–3871.
168. World Health Organization, WHO, (2018). <http://www.who.int/news-room/factsheets/detail/cholera>.
169. Yalcin, H., y Çapar, T. D. (2017). Chapter 21 Bioactive Compounds of Fruits and Vegetables. *Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables*, 21: 723–745.

170. Yamada, Y., Yukphan, P., Vu, H.T., Muramatsu, Y., Ochaikul, D., Tanasupawat, S., y Nakagawa, Y. (2012). Description of *Komagataeibacter* gen. nov. with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*). *Journal of General and Applied Microbiology*, 58: 397-404.
171. Yavari, N., Assadi, M. M., Larijani, K., y Moghadam, M. B. (2010). Response surface methodology for optimization of glucuronic acid production using kombucha layer on sour cherry juice. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(8): 3250–3256.
172. Yavari, N., Assadi, M. M., Moghadam, M. B., y Larijani, K. (2011). Optimizing Glucuronic acid production using tea fungus on grape juice by response surface methodology. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(11): 1788–1794.
173. Zhi-Wei, Y., Bao-Ping, J., Feng, Z., Bo, L., Yangchao, L., Li, Y. y Tao, L. (2008). Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of kombucha tea in high cholesterol fed mice. *J Sci Food Agric*, 89: 150–156.
174. Zhu, K., Yao, S., Zhang, Y., Liu, Q., Xu, F., Wu, G., Dong, W., y Tan, L. (2019). Effects of in vitro saliva, gastric and intestinal digestion on the chemical properties, antioxidant activity of polysaccharide from *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Jackfruit) Pulp. *Food Hydrocolloids*, 87: 952–959.
175. Zhu, K., Zhang, Y., Nie, S., Xu, F., He, S., Gong, D., Wu, G., y Tan, L. (2017). Physicochemical properties and in vitro antioxidant activities of polysaccharide from *Artocarpus heterophyllus* Lam. pulp. *Carbohydrate Polymers*, 155: 354–361.
176. Zubaidah, E., Dewantari, F. J., Novitasari, F. R., Srianta, I., y Blanc, P. J. (2018). Potential of snake fruit (*Salacca zalacca* (Gaerth.) Voss) for the development of a beverage through fermentation with the Kombucha consortium. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13: 198-203.

## **ANEXOS**