



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**Bebidas fermentadas nutraceuticas elaboradas a partir
del Hongo Kombucha y su uso potencial en el
tratamiento de Síndrome Metabólico.**

TESIS Y EXAMEN PROFESIONAL

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN QUÍMICA INDUSTRIAL**

P R E S E N T A:

SAMANTHA VERÓNICA GONZÁLEZ TÉLLEZ

Y

DAVID ADRIÁN OLIVARES VÁZQUEZ

ASESORA: DRA. RAQUEL GÓMEZ PLIEGO

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Bebidas fermentadas nutraceuticas elaboradas a partir del Hongo Kombucha y su uso potencial en el tratamiento de Síndrome Metabólico.

Que presenta la pasante: **Samantha Verónica González Téllez**
Con número de cuenta: **309093918** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Química Industrial**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Mayo de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	I.A. Miriam Alvarez Velasco	
VOCAL	Dra. Raquel Gómez Pliego	
SECRETARIO	Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Alma Susana García Barrón	
2do. SUPLENTE	M.C. Víctor Hugo Vázquez Valdez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/lmcf



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Bebidas fermentadas nutraceuticas elaboradas a partir del Hongo Kombucha y su uso potencial en el tratamiento de Síndrome Metabólico.

Que presenta el pasante: David Adrián Olivares Vázquez
Con número de cuenta: 309127668 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Química Industrial

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de Mayo de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	I.A. Miriam Alvarez Velasco	
VOCAL	Dra. Raquel Gómez Pliego	
SECRETARIO	Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Alma Susana García Barrón	
2do. SUPLENTE	M.C. Víctor Hugo Vázquez Valdez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Industrial L502-Anexo de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Raquel Gómez Pliego, y se encuentra en trámite de **Solicitud de patente MX/a/2018/006058**.

También fue galardonado con el segundo lugar a nivel licenciatura en el XIX Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología en Alimentos y IV Congreso Internacional sobre Innovación y Tendencias en Procesamiento de Alimentos, realizado en Zacatecas del 17 al 19 de mayo del 2017.

Ha sido difundido en medios impresos, electrónicos y televisivos:

- Gaceta UNAM: 12/Junio/2017
- Comunidad FESC: 10/Mayo/2017
- El Universal: 04/Agosto/2017. (Disponible en: <http://www.eluniversal.com.mx/articulo/ciencia-y-salud/salud/2017/08/4/bebidas-nutraceuticas-para-tratar-el-sindrome-metabolico>. Consulta: 24 de abril del 2018)
- Programa Creadores Universitarios del canal 4, el 06/Agosto/2017. (Disponible en: <http://noticieros.televisa.com/videos/creadores-universitarios-programa-6-agosto-2017/>. Consulta: 24 de abril del 2018)



Queremos brindar nuestro más sincero agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México que nos vio crecer desde el medio superior y que ahora nos permite egresar como profesionistas. En particular, agradecemos a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, institución que se convirtió en una segunda casa durante nuestra formación profesional y que por su excelencia y compromiso con los alumnos, nos hace sentirnos aún más orgullosos de haber pertenecido a ella y además, nos regaló algunos de los mejores años de nuestras vidas.

Agradecemos profundamente a nuestra asesora Dra. Raquel Gómez Pliego, uno de nuestros mayores ejemplos a seguir, por acogernos y brindarnos no solo los conocimientos y todo el apoyo necesario para que este trabajo se llevara a cabo, sino también su amistad y su paciencia. Gracias por transmitirnos tanta energía, por motivarnos a no desistir y por las críticas que al final dieron como resultado un trabajo excelente.

Dedicatorias Samantha:

A mi mamá y a mi papá, incondicionales e imprescindibles como nadie, artífices de vida y parte de mis ganas de seguir creciendo y luchando por lo que quiero. Gracias infinitas por siempre resguardar e impulsar mis sueños e ideas, tengo la certeza de que no habría mejores seres humanos para cumplir ese rol en mis días. No me alcanzará una vida ni palabras para agradecerles todo lo que hacen por mí.

A mi hermano Ángel, mi otro imprescindible, mi complemento siempre tan sonriente e irreverente; fuiste huracán e insurrección desde que llegaste a este mundo y hasta la fecha. Hermanito, eres la forma más grata que tengo para darme cuenta que vale la alegría continuar y el recordatorio de que debo dar lo mejor de mí en todo.

A mi Junior, quién diría que en ti iba a encontrar la forma más bonita y chiquita de terquedad y lealtad. Hasta siempre, bichobola.

Al resto de mi familia que siempre ha estado ahí para mí, tan enorme y perfecta para mí.

A mi mejor amigo Adrián, mi biker y alquimista de historias geniales, por ser parte de mi vida y de este ciclo que solo fue uno de los muchos más que viviremos juntos. Gracias por estar, no hay día en el que no me haya sentido venturosa de tenerte a mi lado.

A la UNAM y a mis maestros por ser parte del camino que me ha conducido a donde estoy ahora.

Dedicatorias Adrián:

A la UNAM por haberme abierto sus puertas, tras verme adentro de ella he comprendido que es una base no solo para mi entendimiento en el campo en el que me he visto inmerso, si no para lo que concierne a la vida y mi futuro. Le agradezco a mi institución y a mis maestros por sus esfuerzos para que finalmente pudiera graduarme como un feliz profesional.

A la persona más importante para mí, a mi madre Adriana por darme todas las herramientas, apoyos incondicionales (moral y económicamente) y a veces más para desarrollarme plenamente día a día en el transcurso de cada año de mi carrera universitaria, ella siempre fue mi inspiración para lograr terminar esta parte del recorrido, me siento muy orgulloso y feliz de tenerla. También por brindarme su comprensión, cariño y amor.

El principal motivo por el cual escogí esa carrera fue para ser como ella ya que formo parte de la primera generación de QFB en esa facultad y ese pensamiento me ayudó como modelo a seguir para concluir. Nunca podré pagarle todo lo que ha hecho por mí. Sé que no he sido el mejor hijo, pero ella ha sido la mejor madre que pudiera tener. Te quiero mucho ma.

Por otro lado a mi mejor amiga y compañera de tesis Samantha ella ha estado conmigo en las buenas y malas; me ha visto en mis peores momentos y siempre me ha ayudado. Hemos recorrido cientos de kilómetros juntos, visitados diferentes lugares como museos, bares, parques, plazas, universidades, industrias, visitados diferentes estados como Guanajuato, Jalisco, Guerrero, Veracruz, Querétaro, Puebla, Nuevo León, Zacatecas, Coahuila. Nos hemos divertido en fiestas, playas, antros, festivales de música, conciertos. Recorrimos bosques, mares, desiertos, cuevas y montañas con alegría. Juntos hemos conocido muchas personas y unido amistades. Durante estos 6 años de conocernos nos hemos enojado uno con el otro, nos vimos llorar pero siempre al final había una sonrisa para el otro. Por todo eso gracias Sam. Y recuerda que cuando juntes fuerzas las cosas van a estar mucho mejor, chica de oro.



De igual manera quiero mencionar a mis amigos Jessica, Darío, Yuzaira, Fabián, Edgar, Maximiliano, Sandra, Ximena, Ricardo, Jeovani, mi prima Mariana y mi hermana Jessica.

A todas las personas que me ayudaron de alguna manera durante estos años les quiero dedicar la Ecuación de Dirac.

$$(\partial + m) \Psi = 0$$

Esta ecuación describe el fenómeno del entrelazamiento cuántico, que afirma que “si dos sistemas interaccionan entre ellos durante cierto periodo de tiempo y luego se separan, podemos describirlos como dos sistemas distintos, pero de una forma sutil se vuelven un sistema único. Lo que ocurre a uno sigue afectando al otro, incluso a distancia de kilómetros o años luz”.

Esto es el entrelazamiento cuántico o conexión cuántica. Dos partículas que, en algún momento estuvieron unidas, siguen estando de algún modo relacionadas. No importa la distancia entre ambas, aunque se hallen en extremos opuestos del universo. La conexión entre ellas es instantánea. Es lo mismo que ocurre entre dos personas cuando les une un vínculo que solo los seres vivos pueden experimentar.

ÍNDICE	PÁGINAS
Lista de Abreviaturas	11
Índice de Figuras	13
Índice de Tablas	14
RESUMEN	15
Summary	16
1. OBJETIVOS	
1.1. Objetivo general	17
1.2. Objetivos particulares	17
2. INTRODUCCIÓN	18
3. MARCO TEÓRICO	20
3.1. Hongo Kombucha.	20
3.1.1. Composición del hongo Kombucha por su lugar de origen	20
3.1.2. Características de los microorganismos que conforman el hongo Kombucha	23
3.1.2.1. Bacterias acéticas	23
3.1.2.2. <i>Acetobacter xylum</i>	27
3.1.2.3. <i>Saccharomyces ludwigii</i>	29
3.1.2.4. <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	33
3.1.2.5. <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	35
3.2. Historia del té	35
3.2.1. Historia del té de Kombucha	36
3.2.2. Preparación del té de Kombucha tradicional	36
3.2.3. Beneficios	37
3.3. Efecto benéfico de hierbas, semillas y raíces	37
3.3.1. Cardamomo	40
3.3.2. Árnica	40
3.3.3. Cúrcuma	42
3.3.4. Menta	43
3.4. Alimentos funcionales y nutraceúticos	44
3.4.1. Probióticos y prebióticos	45
3.5. Obesidad, Síndrome Metabólico y Diabetes Mellitus Tipo II	46
4. HIPÓTESIS	50
5. METODOLOGÍA	51
5.1. Preparación y fermentación de las bebidas nutracéuticas	51
5.2. Análisis microbiológicos	56

5.3. Determinación de los compuestos bioactivos en las bebidas nutraceúticas	57
5.4. Evaluación sensorial	57
5.5. Aislamiento e identificación de bacterias y levaduras en hongo Kombucha	58
6. RESULTADOS y DISCUSIÓN	60
6.1. Estandarización y desarrollo de las bebidas fermentadas	60
6.2. Microscopía de Barrido	61
6.3. Cinética de Fermentación	61
6.4. Determinación de la actividad probiótica en las bebidas	68
6.5. Resultados de análisis microbiológicos	69
6.6. Análisis de muestras por Cromatografía de Gases	70
6.7. Evaluación sensorial por medio de una escala Hedónica	83
6.8. Aislamiento e identificación de bacterias y levaduras en hongo Kombucha	83
7. CONCLUSIONES	92
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

Lista de Abreviaturas

ABREVIATURAS	SIGNIFICADO
ACBL	Muestra de blanco de la bebida No. 1 (Árnica + Cardamomo)
ACFA	Muestra de Fermentación acética de la bebida No.1 (Árnica + Cardamomo)
ACFL	Muestra de bebida final No.1 (Árnica + Cardamomo)
A-DH	Alcohol deshidrogenasa
AF	Alimento Funcional
AGCC	Ácidos Grasos de Cadena Corta
AL-DH	Acetaldehído deshidrogenasa
AMC	Agar McConkey
ASM	Agar Sales Manitol
AST	Agar Soya Trypticasa
BAL	Bacterias Ácido Lácticas
CCBL	Muestra de blanco de la bebida No. 2 (Cúrcuma + Cardamomo)
CCFA	Muestra de Fermentación acética de la bebida No. 2 (Cúrcuma + Cardamomo)
CCFL	Muestra de bebida final No. 2 (Cúrcuma + Cardamomo)
CG	Cromatografía de gases
CG-MS	Cromatografía de gases-masas
CS	Celulosa sintasa
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
F1FC	Fructosa-1-P cinasa
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FBS	Test rápido de glucosa
FBP	Fructosa bifosfatasa
FC	Fructocinasa
F-DH	Fructosa deshidrogenasa
FGI	Fosfoglucoisomerasa
FGM	Fosfoglucomutasa
FID	International Diabetes Federation
FOSHU	Foods for specified health use
FTS	Fosfofructotransferasa
G6P-DH	Glucosa-6-P deshidrogenasa
GC	Glucocinasa
G-DH	Glucosa deshidrogenasa
GL-DH	Glicerol deshidrogenasa
GP	Glucosa permeasa
HDL	Colesterol bueno

NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido en forma oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido en forma reducida
NADPH⁺	Nicotinamida adenina fosfato en forma reducida
NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en forma oxidada
MCBL	Muestra de blanco de la bebida No. 3 (Menta + Cardamomo)
MCFA	Muestra de Fermentación acética de la bebida No. 3 (Menta + Cardamomo)
MCFL	Muestra de bebida final No. 3 (Menta + Cardamomo)
MRS	Agar Rogosa
O	Obesidad
PQQ	Quinona de pirroloquinolina
PROFECO	Procuraduría Federal del Consumidor
Scoby	Simbiotic Colony of Bacteria and Yeast
SDA	Agar Dextrosa Sabouraud
S-DH	Sorbitol deshidrogenasa
SENM	Sociedad Española de Nutraceútica Médica
SM	Síndrome Metabólico
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colonias por mililitro.
UGP	Uridin difosfato glucopirofosforilasa
UTP	Uridín trifosfato

Índice de Figuras

No. de figura	Contenido	Páginas
1	Reacciones de oxidación de alcoholes y azúcares en la membrana citoplasmática. G-DH: glucosa deshidrogenasa; A-DH: alcohol deshidrogenasa; AL-DH: aldehído deshidrogenasa; S-DH: sorbitol deshidrogenasa; F-DH: fructosa deshidrogenasa; GL-DH: glicerol deshidrogenasa	24
2	Vías metabólicas de la asimilación oxidativa del etanol: ciclo de los ácidos tricarboxílicos y del glioxilato vía acetil-CoA	25
3	Rutas metabólicas y de síntesis de celulosa en <i>A. xylum</i> . CS, celulosa sintasa; FBP, fructosa bifosfatasa; FC, fructocinasa; F1FC, fructosa-1-P cinasa, FGI, fosfoglucoisomerasa; FGM, fosfoglucomutasa; FTS, fosfofructotransferasa; GC, glucocinasa; GP, glucosa permeasa; G6P-DH, glucosa-6-P deshidrogenasa; UGP, uridin difosfato glucopirofosforilasa	28
4	Metabolismo típico de levaduras Cabtree negativas; respiratorio y respirofermentativo. Las flechas gruesas indican flujo preferencial y las flechas delgadas flujo limitado. 1: transporte del piruvato a la mitocondria, 2: Complejo piruvato deshidrogenasa, 3: Piruvato descarboxilasa, 4: Alcohol deshidrogenasa, 5: Acetaldehído deshidrogenasa, 6: Acetil CoA sintetasa (citoplasmático), 7: Acetil CoA sintetasa (mitocondrial), 8: Transporte de Acetil CoA mediado por la vía carnitina. Formación de esteres, 9: Acetil transferasa, 10: ester sintasa	31
5	Vías de utilización de carbono y nitrógeno en <i>B. bruxellensis</i> en condiciones aerobias y anaerobias	34
6	Fotografía del hongo Kombucha tomada por microscopía de barrido	61

Índice de Tablas

No. de Tabla	Contenido	Páginas
1	Microorganismos aislados e identificados en diferentes países	22
2	Componentes utilizados en la formulación y desarrollo de las bebidas nutraceuticas fermentadas	52
3	pH y acidez titulable al finalizar la fermentación	53
4	Preparación de la curva estándar de glucosa	55
5	Determinación de azúcares totales por Fenol Sulfúrico para las muestras recolectadas	56
6	Encuesta realizada para la evaluación sensorial por medio de una escala Hedónica	59
7	Fermentación a partir de Kombucha para la bebida 1 (árnica + cúrcuma), valores promedio de pH, acidez titulable, biomasa y azúcar residual a lo largo del tiempo \pm Error estándar, n=5	62
8	Fermentación a partir de Kombucha para la bebida 2 (cúrcuma con cardamomo), valores promedio de pH, acidez titulable, biomasa y azúcar residual a lo largo del tiempo \pm Error estándar, n=5	63
9	Fermentación a partir de Kombucha para la bebida 3 (menta con cardamomo), valores promedio de pH, acidez titulable, biomasa y azúcar residual a lo largo del tiempo \pm Error estándar, n=5	65
10	Recuento de bacterias lácticas (UFC/ml) durante la vida de anaquel del producto (1, 2, 3, 4 semanas)	68
11	Pruebas confirmativas del NMP	70
12	Concentraciones en $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ de los compuestos identificados en las bebidas (1-3) cardamomo + árnica, cardamomo + cúrcuma y cardamomo + menta, analizadas por triplicado en el cromatógrafo de gases	71
13	Resultados del análisis sensorial realizado a 50 panelistas	83
14	Morfología colonial, morfología bacteriana y pruebas bioquímicas primarias y secundarias se las colonias aisladas del hongo Kombucha	85
15	Microorganismos de hongo Kombucha reportados en diferentes países, incluyendo los identificados en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM	86

Resumen

El presente proyecto de investigación tiene como objetivo formular y estandarizar tres nuevas bebidas fermentadas a partir del Hongo Kombucha e infusiones de cardamomo con árnica, cardamomo con menta y cardamomo con cúrcuma, las cuales fueron fortificadas con ácido fólico, probióticos y prebióticos con el objetivo de tratar y controlar enfermedades asociadas con el Síndrome metabólico (SM), como la obesidad (O) y la Diabetes mellitus tipo 2 (DM2), patologías de gran impacto económico y social en México y en el mundo entero.

Para cumplir con los objetivos planteados a las bebidas se les realizó una cinética de fermentación en las que se determinó el pH, la acidez titulable expresada como porcentaje de ácido acético, la concentración biomasa y sustrato residual, la actividad probiótica a lo largo del tiempo, pruebas de inocuidad mediante análisis microbiológicos apegados a la norma, NOM-112-SSA1-1994, Cromatografía de Gases y un análisis sensorial (utilizando una escala hedónica de siete puntos con panelistas no entrenados). Finalmente se aislaron e identificaron las bacterias y levaduras presentes en el consorcio microbiano que forma al hongo Kombucha.

Los resultados mostraron que las bebidas poseen propiedades probióticas (1×10^9 UFC/ml de bacterias ácido lácticas, BAL), prebióticas, que son inocuas, y que por el tipo de compuestos bioactivos formados durante la fermentación (α -terpineol y eucaliptol) éstas pudieran poseer actividad hipoglucemiante y antiinflamatoria. El análisis sensorial de las bebidas dio como resultado un alto grado de aceptabilidad. Mediante pruebas bioquímicas primarias y secundarias, identificaron seis cepas distintas que conforman al hongo Kombucha no reportadas anteriormente en México.

Summary

In the present Project research three new fermented beverages were formulated and standardized from Kombucha mushroom and cardamom infusions with arnica, cardamom with mint and cardamom with turmeric, which were fortified with folic acid, probiotics and prebiotics with the aim of treating and control diseases associated with the metabolic syndrome (MS), such as obesity (O) and diabetes mellitus type 2 (DM2), pathologies of great economic and social impact in Mexico and the world.

In order to meet the objectives set for the beverages, a fermentation kinetics was performed in which the pH was determined, the titratable acidity expressed as percentage of acetic acid, the biomass and residual substrate concentration, the probiotic activity over time, safety tests by microbiological analysis according to the standard, NOM-210-SSA1-2014, mass spectrometry (using a seven-point hedonic scale with untrained panelists). Finally, the bacteria and yeast present in the microbial consortium that forms the Kombucha mushroom were isolated and identified.

The results showed that the beverages have probiotic properties (1×10^9 CFU/ mL of BAL), prebiotics, which are harmless, and that by the type of bioactive compounds formed during fermentation (α -terpineol and eucalyptol) these could have hypoglycaemic and anti-inflammatory activity. The sensory analysis of the beverages resulted in a high degree of acceptability. Using primary and secondary biochemical tests, six different strains that conform the Kombucha fungus were identified and they have not previously been reported in Mexico.

1. Objetivos

1.1. Objetivo General

Formular y desarrollar tres nuevas bebidas a partir de hierbas, semillas y raíces naturales, fermentadas con el hongo Kombucha, fortificada con probióticos, prebióticos y con potenciales usos para el control de enfermedades como síndrome metabólico (SM), obesidad (O) y Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2), padecimientos comunes y de gran impacto económico en la sociedad mexicana.

1.2. Particulares

1. Formulación y desarrollo de tres bebidas fermentadas a partir del hongo kombucha y un consorcio de bacterias lácticas.
2. Elaborar tres bebidas fermentadas con la fórmula estandarizada, árnica-cardamomo, cúrcuma-cardamomo y menta-cardamomo y determinar: el pH, acidez titulable, concentración de azúcar residual, concentración de biomasa y sustrato a lo largo de la fermentación (0, 24, 48, 72 y 96 horas) y la densidad al final de la fermentación (96 horas).
3. Determinar por Cromatografía de Gases los compuestos producidos antes de la fermentación y durante la fermentación acética (primera fermentación) y láctica (segunda fermentación) de las tres bebidas elaboradas.
4. Cuantificar el contenido de bacterias lácticas, por el método de dilución y sembrado masivo en agar rogosa (MRS).
5. Evaluar la inocuidad del producto obtenido mediante análisis microbiológicos, apegados a la norma, NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios.
6. Realizar pruebas sensoriales usando una escala hedónica de siete puntos a panelistas no entrenados.
7. Aislar e identificar las bacterias y levaduras que conforman el consorcio del hongo Kombucha.

2. Introducción

Según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, México ocupa el primer lugar a nivel mundial de obesidad infantil y el segundo lugar en obesidad en adultos. El Síndrome Metabólico (SM) se define como un conjunto de patologías, obesidad, insulinoresistencia, hiperglicemia, dislipidemia e hipertensión arterial, la conjunción de tres de éstas enfermedades aumenta la probabilidad de padecer Diabetes Mellitus Tipo 2, que es una de las principales causas de muerte en nuestro país y además tiene un gran impacto socioeconómico en México, considerando que aproximadamente 12 millones de personas la padecen (FID, 2015). En el 2010, el Sector Salud gastó 7734 millones de pesos en el tratamiento de estas patologías, el 75% de los gastos en complicaciones tardías (ENSANUT, 2010) y se considera que para el año 2030 no habrá presupuesto suficiente para el tratamiento de estas enfermedades, debido a que la tasa de padecimientos de enfermedades de SM y DM2 está en constante aumento.

En la búsqueda de estrategias que mitiguen el impacto producido por este tipo de enfermedades, nuestro equipo de trabajo ha puesto su atención en alimentos fermentados a partir de hongo Kombucha (*Medusomyces gisevii*), que también se conoce como Scoby u Hongo del té, que está compuesto por bacterias acéticas y levaduras que se encuentran incrustadas dentro de una matriz celulósica, y se ha utilizado desde tiempos milenarios para la producción de bebidas fermentadas a partir de té negro y té verde, las cuales tienen propiedades funcionales debido a la transformación del sustrato en productos finales bioactivos, tales como bacteriocinas y ácidos orgánicos, dando como resultado una bebida con un mejor sabor, aroma y consistencia; que dependiendo del tipo de té, el contenido y tipo de vitaminas y minerales puede cambiar su composición y por ende sus propiedades benéficas a la salud (O'Brien M. et al., 2003; Marco M. et al., 2017).

En este proyecto se desarrollaron tres nuevas bebidas fermentadas a partir de hongo Kombucha, utilizando hierbas (árnica y menta), semillas (cardamomo) y raíces (cúrcuma) como materia prima y fortificadas con ácido fólico, bacterias ácido lácticas y fibra dietética de soya con sabor a manzana; estas dos últimas le

atribuyeron a la bebida propiedades prebióticas y probióticas y también, mejoraron el sabor de las bebidas desarrolladas.

Datos de la literatura indican que árnica, cúrcuma, cardamomo y menta, contienen compuestos antioxidantes (flavonoides), anti-inflamatorias y antisépticas (antihelenalina, terpenos y timol), inmunológicas (ukonan A, B, C y D), azúcares (arabinosa, glucosa y fructosa), betacarotenos, algunos minerales (calcio, manganeso, cromo, cobalto, bromo, potasio, magnesio, fósforo, hierro, y sodio), ácidos grasos esenciales (ácido oleico, linolenico, esteárico) y vitaminas (tiamina, riboflavina, niacina).

3. Marco Teórico

3.1. Hongo Kombucha

A el hongo Kombucha, se le conoce con diversos nombres, hongo chino, *Manchurian mushroom tea*, *Pichia fermentatis*, *Cembuya orientalis*, *Tschambucco*, *Volga spring*, *mo-gu*, *Champinon de longue vie*, *Teekwass*, *Kwassan*, *Té Kargasok* y *Champagne of life* (Mayser et al., 1995) o con el nombre científico *Medusomyces gisevii* o Scoby por sus siglas en Inglés: *Symbiotic Colony of Bacteria and Yeast* (Ebersole et al., 2017).

El hongo Kombucha es un conjunto de microorganismos formado por un consorcio de levaduras y bacterias acéticas inmersas en una matriz de celulosa responsable de la fermentación del té Kombucha. Este consorcio de bacterias y levaduras se reproducen simbióticamente en dos compartimentos no exclusivos: el caldo o la bebida y la biopelícula flotando sobre ella (Chakravorty et al., 2016). La biopelícula se trata de una matriz de celulosa, donde están incrustados diferentes grupos de bacterias acéticas, *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter xylinoides*, *Bacterium gluconicum*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* y levaduras que pertenecen al género *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Brettanomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Sacharomycodes*, *Torulospora* y *Candida* (Sievers, M. et al., 1995).

3.1.1. Composición del hongo Kombucha por lugar de origen

Datos de la literatura indican que la composición del hongo kombucha cambia dependiendo del lugar de origen, ya que el medio ambiente microbiano es diferente: pH, temperatura, humedad relativa, presión atmosférica, etc. (Balentine, 1997). En la **Tabla 1**, se presenta los países e instituciones en donde se realizaron estos estudios: Australia, Estados Unidos, Serbia, Suiza y Túnez; Nótese que, *Acetobacter xylium*, *Acetobacter aceti* y *Acetobacter pasteurianus* y las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomycodes ludwigii* y *Pichia fermentans* son algunos microorganismos comunes en países como Serbia, Estados Unidos y Túnez.

- ❖ Australia. Food Science and Technology, School of Chemical Sciences, University of New South Wales, Sydney NSW 2052, Australia.

- ❖ Estados Unidos. Department of Cell and Molecular Biology, Tulane University, New Orleans, LA 70118, USA.
- ❖ Serbia. University of Novi Sad, Faculty of Technology, Novi Sad, Serbia and Montenegro.
- ❖ Suiza. Institut für Lebensmittelwissenschaft, Labor für Lebensmittelmikrobiologie, ETH-Zurich, Schmelzbergstr. 9, CH-8092 Zurich, Switzerland.
- ❖ Túnez. Laboratoire d'Analyse, Traitement et Valorisation des Polluants de l'Environnement et des Produits, Faculté de Pharmacie, rue Avicenne, 5000 Monastir, Tunisia.

Tabla 1. Microorganismos aislados e identificados en diferentes países.				
Suiza.	Túnez.	Estados Unidos.	Australia	Serbia.
<i>Zygosaccharomyces bailli</i>	<i>Acetobacter xylium</i> (Balentine, 1997)	<i>Acetobacter xylium</i>	<i>Zygosaccharomyces bailli</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Acetobacter xylium</i>	<i>Acetobacter aceti</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>
<i>Acetobacter aceti</i>	<i>Acetobacter pasteurianus</i> (Liu, Hsu, Lee, & Liao, 1996)	<i>Bacterium gluconicum</i>	<i>Candida stellata</i>	<i>Acetobacter</i>
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	<i>Zygosaccharomyces bailli</i>	<i>Bacterium katogenum</i>	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	<i>Saccharomyces bisporus</i>
(Steiger and Steinegger 1957)	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	<i>Torulospora delbruecki</i>	(Markov et al. 2001)
	<i>Bacterium gluconicum</i>	<i>Pichia fermentans</i> (Stamets, 1995)	(Jankovic and Stojanovic, 1994; Frank, 1995; Mayser et al., 1995; Liu et al., 1996).	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>			
	<i>Kloeckera apiculata</i>			
	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>			
	<i>Brettanomyces lambicus</i>			
	<i>Brettanomyces custersil</i> (Reiss, 1994)			

3.1.2 Características de los microorganismos que conforman el hongo Kombucha

3.1.2.1. Bacterias acéticas

Las bacterias del ácido acético pertenecen a la familia Acetobacteraceae. Son microorganismos Gram-negativos o Gram-positivos, de forma elipsoidal o cilíndrica que pueden encontrarse aislados, en pares o formando cadenas. Su tamaño oscila entre 0.4 a 1 μm de ancho y de 0.8 a 4.5 μm de longitud. Son móviles por flagelación polar o peritrica. Presentan actividad catalasa positiva, oxidasa negativa y no forman endosporas. Poseen metabolismo aeróbico estricto, con el oxígeno como aceptor final de electrones (Sievers y Swings 2005; Mandigan et al. 2009; Komagata et al. 2014). La temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 30 $^{\circ}\text{C}$, aunque también pueden desarrollarse a temperaturas más altas; algunas especies lo hacen a 38 a 40 $^{\circ}\text{C}$ (Saeki et al. 1997; Ndoye et al. 2006) y otras, a temperaturas más bajas (10 $^{\circ}\text{C}$), aunque su crecimiento es muy lento (Joyeux et al. 1984). El pH óptimo de crecimiento está entre 5 y 6; sin embargo, la mayoría de las cepas pueden crecer a pH inferiores a 5 (Cleenwerck y De Vos 2008), incluso a pH 2 a 2.2 (Du Toit y Pretorius 2002), pero la tolerancia a los bajos pH depende de otros parámetros, como la concentración de etanol y la disponibilidad de oxígeno (Gullo y Giudici, 2008).

- **Metabolismo de los microorganismos que conforman el hongo Kombucha**

Tienen un metabolismo estrictamente aerobio, es decir que para su desarrollo necesitan disponer de oxígeno molecular, que actúa como aceptor final de electrones. La fuente de carbono es también un factor importante para su desarrollo y dependiendo de ésta utilizan diferentes rutas metabólicas, con intermediarios y productos finales distintos.

Las bacterias acéticas realizan una oxidación incompleta de los azúcares y los alcoholes, produciendo una acumulación de ácidos orgánicos como productos finales. Cuando el sustrato es el etanol, se produce ácido acético, de ahí deriva el nombre corriente con el que se conocen a estas bacterias (Raspor y Goranovic 2008).

La oxidación del etanol a ácido acético es la característica más conocida de estas bacterias (Yamada et al. 2000; Jojima et al. 2004). Este proceso bioquímico consta de dos etapas: en la primera el etanol es transformado en acetaldehído por la enzima alcohol deshidrogenasa (A-DH) y posteriormente, el acetaldehído se transforma en ácido acético por el acetaldehído deshidrogenasa (AL-DH) (**Figura 1**). Ambas enzimas están ubicadas en la membrana citoplasmática, con el centro activo hacia el exterior, por lo que su actividad se presenta principalmente en el espacio periplasmático y no en el interior de la célula (Saeki et al. 1997).

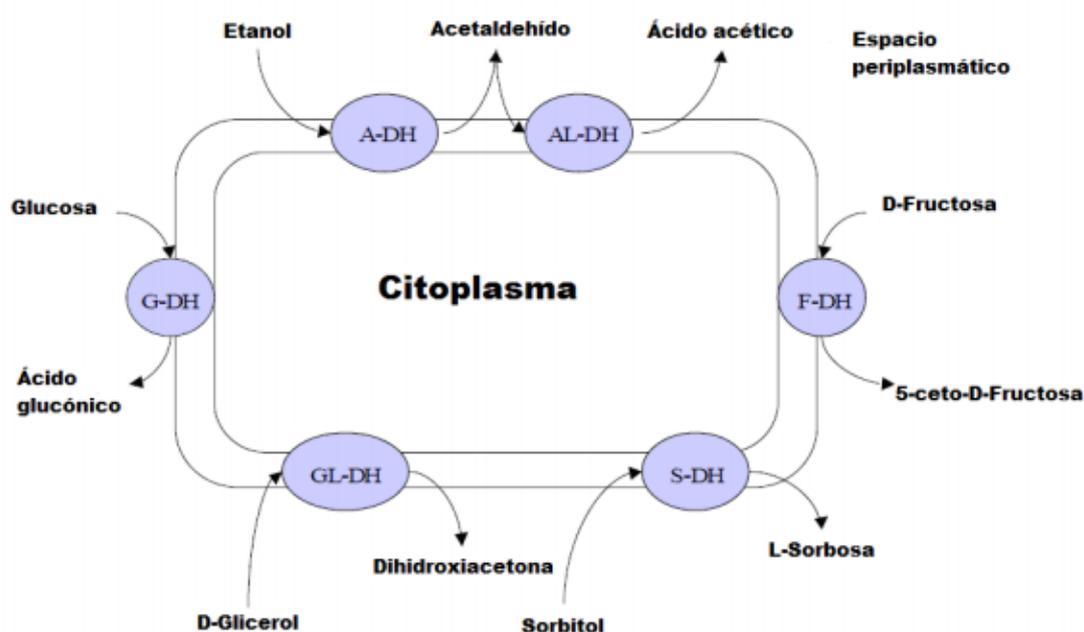


Figura 1. Reacciones de oxidación de alcoholes y azúcares en la membrana citoplasmática. G-DH: glucosa deshidrogenasa; A-DH: alcohol deshidrogenasa; AL-DH: aldehído deshidrogenasa; S-DH: sorbitol deshidrogenasa; F-DH: fructosa deshidrogenasa; GL-DH: glicerol deshidrogenasa (Saeki et al. 1997).

La A-DH ligada a la membrana tiene un pH óptimo de 4.0, aunque puede estar activa a pH inferiores, es independiente de NADP^+ y utiliza como cofactor la quinona de pirroloquinolina (PQQ). La actividad de esta A-DH es más estable, lo que puede explicar la mayor producción de ácido acético (Matsushita et al. 1994).

La AL-DH presenta un pH óptimo en un intervalo de 4.0 y 5.0, sin embargo, al igual que la A-DH, es activa a pH inferior e independiente de NADP^+ . Las enzimas A-DH y

AL-DH presentan distinta afinidad por el oxígeno, siendo más sensible la AL-DH, lo que implica que si existe limitación de oxígeno disuelto en el medio se produce una acumulación de acetaldehído, que puede llegar a ser tóxico para estas bacterias. La AL-DH también es más sensible a la concentración de etanol que la A-DH y por lo tanto, medios con alto contenido alcohólico, pueden presentar una mayor acumulación de acetaldehído (Jara, 2009). Los géneros *Acetobacter* pueden oxidar completamente el ácido acético a CO_2 y H_2O a través del ciclo de Krebs (Yamada et al. 2012) (**Figura 2**). Sin embargo, sólo sucede cuando no hay etanol, ya que esta oxidación es inhibida por la presencia de etanol en el medio y se cree que se trata de un cambio irreversible en su metabolismo y que por tanto, una vez que lo realizan ya no son capaces de oxidar etanol (De Ley et al. 1984; Drysdale y Fleet 1988; Raspor y Goranovic 2008).

Algunas bacterias pueden producir altas concentraciones de ácido acético, hasta 150 g/L (Sievers et al. 1997; Lu et al. 1999). La resistencia al ácido acético depende de la cepa (Nanba et al. 1984). La enzima citrato sintasa desempeña un papel clave en esta resistencia, debido a que ayuda a remover el ácido acético mediante su incorporación en los ciclos tricarboxílicos o del glioxilato, sin embargo, este comportamiento sólo es posible cuando el etanol no está presente (Raspor y Goranovic 2008).

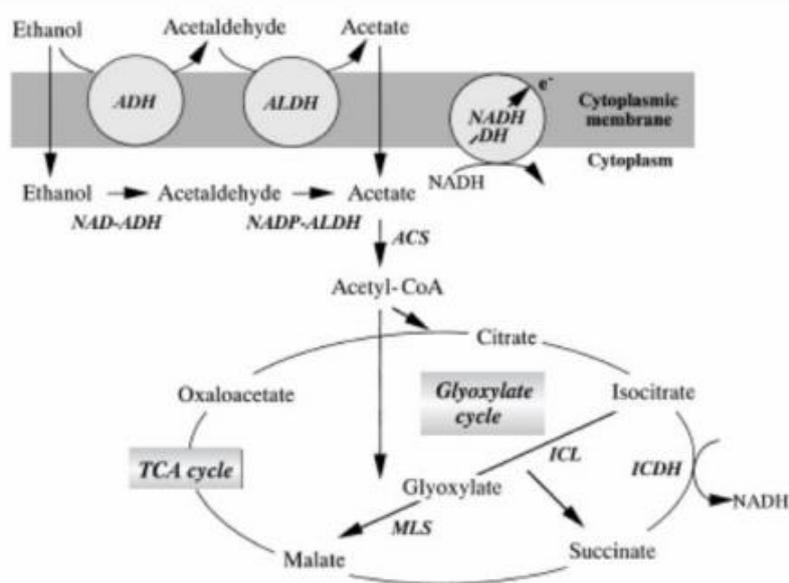


Figura 2. Vías metabólicas de la asimilación oxidativa del etanol: ciclo de los ácidos tricarboxílicos y del glioxilato vía acetil-CoA (Chinnawirotpisan et al. 2003).

- **Metabolismo de los azúcares**

Las bacterias acéticas pueden utilizar diferentes carbohidratos como fuente de carbono, siendo la glucosa la más utilizada. La oxidación directa de los azúcares, sin fosforilación e incompleta conduce a las cetosas correspondientes; así la glucosa es oxidada a ácido glucónico, reacción catalizada por la glucosa oxidasa (Ribéreau Gayón et al. 2003). Además, pueden utilizar otras fuentes de carbono: fructosa, sacarosa, galactosa, arabinosa, manosa, ribosa, xilosa (De Ley et al. 1984).

Las cetosas no son fácilmente oxidadas por las bacterias. La oxidación de la fructosa puede conducir a ácido glucónico y a ceto-5-fructosa y en algunos casos la cadena carbonada se rompe y se acumulan ácidos glicéricos, glicólico y succínico (Ribéreau Gayón et al. 2003). La ruta por la cual las bacterias oxidan la glucosa depende del pH y de la concentración de glucosa (Qazi et al. 1991). Los productos finales pueden ser oxidados completamente hasta CO₂ y H₂O a través del ciclo de Krebs y de la cadena respiratoria (Ribéreau Gayón et al. 2003). Los géneros *Acetobacter* pueden llevar a cabo la oxidación completa, aunque la presencia de glucosa/fructosa o etanol reprimen el funcionamiento de esta ruta metabólica y por tanto, ésta se dará sólo cuando se hayan consumido completamente las fuentes de carbono presentes en el medio (Saeki et al. 1997).

- **Metabolismo de los ácidos orgánicos**

Las bacterias acéticas también pueden oxidar los ácidos orgánicos. Esta oxidación la realizan a través del ciclo de Krebs, obteniéndose como productos finales CO₂ y H₂O. (Raspor y Goranovic 2008). Las bacterias acéticas pueden llevar a cabo una oxidación incompleta de los ácidos orgánicos generando metabolitos intermedios. Por ejemplo, los ácidos D y L láctico (fuente de carbono) puede ser oxidado totalmente a CO₂ y H₂O o parcialmente hasta ácido acético, por diferentes rutas metabólicas y con distintos productos finales. El primer intermediario es el piruvato, luego descarboxilado a acetaldehído y CO₂, por acción de la enzima piruvato descarboxilasa y posteriormente el acetaldehído es oxidado a ácido acético por la enzima acetaldehído deshidrogenasa (Ribéreau Gayón et al. 2003).

3.1.2.2. *Acetobacter xylosum*

Es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia Acetobacteraceae; aerobio estricto que realiza la oxidación incompleta de diversos azúcares y alcoholes (proceso conocido como fermentación oxidativa). Su hábitat natural son frutas y vegetales en proceso de descomposición; es capaz de producir celulosa bacteriana sobre medios líquidos y sólidos formando una “película” o “nata” sobre la superficie. La película funciona como un mecanismo de “flotación”, permitiéndole a *A. xylosum* estar en la interfase aire/líquido para obtener con mayor facilidad el O₂ necesario para su crecimiento. La película es una barrera física que protege a la bacteria de la radiación UV, aumenta la capacidad de colonizar sustratos y su carácter altamente hidrofóbico le permite retener humedad previniendo la desecación del sustrato (William et al. 1989).

- **Producción de celulosa**

La celulosa es un polímero formado por la unión de moléculas de glucosa mediante enlaces β -1,4-O-glucosídico (Chávez-Pacheco et al. 2004; Raspor y Goranovic 2008).

La celulosa bacteriana formada no forma parte de la pared celular, sino que se organiza como una matriz exterior a la pared, donde las bacterias se encuentran incrustadas en una maraña de microfibrillas de celulosa. Cuando estas bacterias crecen en un frasco sin agitación, forman una película superficial de celulosa, en la cual se desarrollan las bacterias. Dado que son aerobias estrictas, la capacidad de formar dicha película puede ser un medio para asegurarse la permanencia en la superficie del líquido, donde hay más oxígeno (Mandigan et al. 2009). La producción depende de la composición del medio del cultivo (de la fuente de carbono y de nitrógeno), del pH y de la tensión de oxígeno (Jaramillo et al. 2012).

- **Biosíntesis de celulosa microbiana**

Existen dos vías importantes: el ciclo de las Pentosas fosfato y el ciclo de Krebs (Ross et al. 1991). El primero participa en la oxidación de carbohidratos mientras el segundo oxida ácidos orgánicos. La bacteria es capaz de producir glucosa a partir de sustratos como glicerol, citrato y otros intermediarios del ciclo de Krebs mediante gluconeogénesis y puede convertir hexosas fosfato (fructosa, manosa) a glucosa-6-

fosfato, para la síntesis del polisacárido (Weinhouse et al. 1974). La ruta biosintética de celulosa en *A. xylosum* empieza con la producción del polisacárido, esta se realiza a partir de glucosa transportada desde el exterior u obtenida de fuentes internas (**Ver Figura 3**), la cual es fosforilada a glucosa-6-fosfato mediante la enzima glucocinasa. En seguida, glucosa-6-fosfato se convierte a glucosa-1-fosfato por la enzima fosfoglucomutasa; la UDPG pirofosforilasa a partir de glucosa-1-fosfato y en presencia uridín trifosfato (UTP) cataliza la producción de UDP-glucosa; este nucleótido azúcar es el sustrato de la enzima celulosa sintasa (Swissa et al. 1980) (**Figura 3**). Existe controversia acerca de la forma en la que el sustrato es utilizado por la celulosa sintasa; una hipótesis implica la asociación de UDPglucosa a lípidos de la membrana plasmática (Matthysse, et al. 1995), mientras la otra variante (Brown et al. 2000) considera que el precursor soluble interactúa directamente con la celulosa sintasa. No existen datos contundentes para validar alguna de estas propuestas. El aporte energético para la síntesis proviene del metabolismo aerobio, por lo cual la cadena respiratoria juega un papel importante en la síntesis de celulosa.

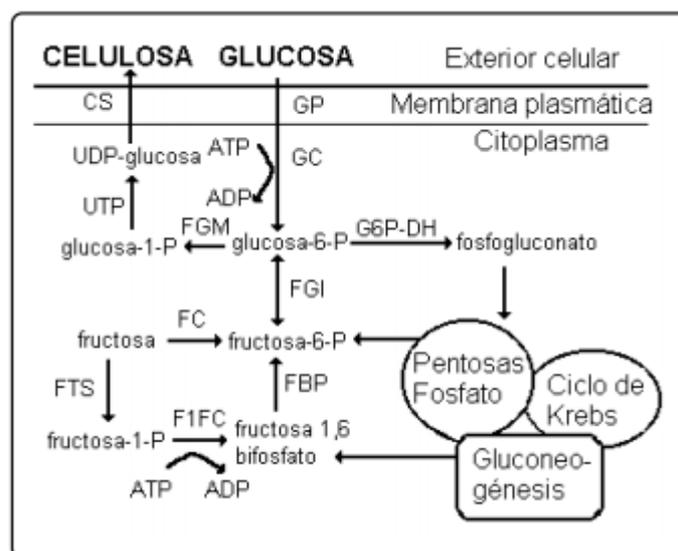


Figura 3. Rutas metabólicas y de síntesis de celulosa en *A. xylosum*. CS, celulosa sintasa; FBP, fructosa bifosfatasa; FC, fructocinasa; F1FC, fructosa-1-P cinasa, FGI, fosfoglucoisomerasa; FGM, fosfoglucomutasa; FTS, fosfofructotransferasa; GC, glucocinasa; GP, glucosa permeasa; G6P-DH, glucosa-6-P deshidrogenasa; UGP, uridin difosfato glucopirofosforilasa (Matthysse, et al. 1995).

3.1.2.3. *Saccharomycodes ludwigii*

Saccharomycodes ludwigii es una levadura no-*Saccharomyces* (Thomas 1993). Estas levaduras habitan lugares donde hay fuentes de azúcares fermentables y sustancias nutritivas que les permita crecer, como por ejemplo en jugos de fruta, frutas dañadas y néctar de flores (Combina et al. 2005; Polsinelli 1996).

Las levaduras no-*Saccharomyces* durante la fermentación convierten los azúcares en etanol, dióxido de carbono y en un sin número de compuestos volátiles y no volátiles que contribuyen a la composición química y sensorial de las bebidas que fermentan (Jolly et al. 2006; Fleet et al. 1992; Lambrechts et al. 2000; Swiegers et al. 2005). En general, se considera que las levaduras no-*Saccharomyces* cumplen un rol importante en la definición del perfil sensorial bebidas fermentadas (Jolly et al. 2006; Romano 2003).

- **Metabolismo de azúcares en *Saccharomycodes ludwigii***

Los azúcares fermentables son la fuente de energía más importante en el metabolismo de levaduras. *Saccharomycodes ludwigii* al igual que las demás levaduras utiliza vías metabólicas comunes para la degradación de azúcares. Los azúcares para ser utilizados deben ser transportados hacia el interior de la célula mediante mecanismos de transporte específicos (Van et al. 1989; Flores et al. 2000). La velocidad de utilización de azúcares está influenciada por la concentración y el tipo de azúcar, la concentración de oxígeno disuelto en el medio, la temperatura de fermentación y el pH, entre otros factores (van Dijken 1993; Goffrini 2002).

Una vez dentro de la célula, el azúcar es fosforilado y así entra a la vía de la glucólisis, la cual termina en la formación de piruvato, proceso llevado a cabo en el citosol (Entian et al. 1992). Luego, el piruvato formado puede ser incorporado, bien al metabolismo respiratorio o al fermentativo, dependiendo de la concentración de azúcar y oxígeno disuelto en el medio (van Dijken 1993; Kresze et al. 1981; Gailusis et al. 1964).

Existen pocas investigaciones desarrolladas sobre la actividad fermentativa de *Saccharomycodes ludwigii*, sin embargo, se le considera una levadura "Crabtree negativo" (Bulder et al. 1964; De Deken 1966; Middelhoven et al. 2003).

Las levaduras "Crabtree negativas" presentan un metabolismo respiratorio aún cuando la concentración de azúcar en el medio es relativamente alta (De Deken 1966). Esta característica ha servido para denominarlas levaduras oxidativas. Estas levaduras en medios con altas concentraciones de azúcar y en condiciones aerobias, el piruvato se metaboliza preferentemente vía piruvato deshidrogenasa hasta acetil-CoA y luego éste entra al ciclo de Krebs para su oxidación completa (van Dijken 1993; Gancedo 1989); esto se debe a que presentan bajos niveles de piruvato descarboxilasa y una alta actividad de enzimas respiratorias como la piruvato deshidrogenasa, acetaldehído deshidrogenasa y acetil-CoA sintetasa (Postma et al. 1989). La ausencia de oxígeno en el medio es crucial y conduce a la cesación del crecimiento de las levaduras "Crabtree negativas" (van Dijken 1993; Bulder et al. 1964). Sin embargo, ha sido reportado que a condiciones anaerobias, *Saccharomyces ludwigii* es capaz de crecer (Blomberg et al. 1992).

Existen datos que indican que estas levaduras además producen acetato, glicerol y etanol, esto pudiera ser debido a una baja actividad de las enzimas respiratorias especialmente la piruvato deshidrogenasa, acetaldehído deshidrogenasa y la acetil-CoA sintetasa como resultado de la limitación de oxígeno en el medio (van Dijken 1993), lo que a la vez conduce a una disminución de la tasa de respiración y a la estimulación del metabolismo respirofermentativo.

Así mismo, la producción de glicerol en medios con alta concentración de azúcar, estaría conectado a un mecanismo de adaptación que utiliza la levadura frente al estrés osmótico y así prevenir su deshidratación. La formación de glicerol está acoplado a la oxidación de NADH a NAD⁺, lo que causa un desbalance redox en el citosol (NADH:NAD⁺), el cual es corregido con la producción de ácido acético cuya síntesis reconvierte nuevamente NAD⁺ a NADH (Blomberg 1992; Remize et al. 1992).

En la **Figura 4** se presenta en forma general el metabolismo respiratorio y respirofermentativo en levaduras "Crabtree negativas".

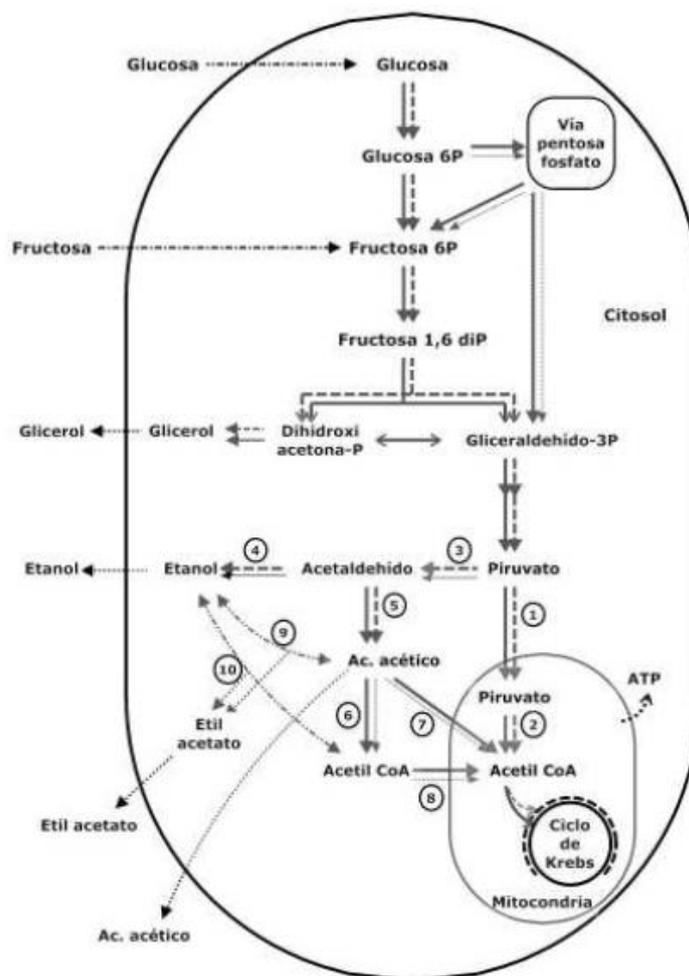


Figura 4. Metabolismo típico de levaduras Crabtree negativas; respiratorio y respirofermentativo. Las flechas gruesas indican flujo preferencial y las flechas delgadas flujo limitado. 1: transporte del piruvato a la mitocondria, 2: Complejo piruvato deshidrogenasa, 3: Piruvato descarboxilasa, 4: Alcohol deshidrogenasa, 5: Acetaldehído deshidrogenasa, 6: Acetil CoA sintetasa (citoplasmático), 7: Acetil CoA sintetasa (mitocondrial), 8: Transporte de Acetil CoA mediado por la vía carnitina. Formación de esteres, 9: Acetil transferasa, 10: ester sintasa (van Dijken 1993).

En condiciones de limitación de oxígeno se estimula el metabolismo respirofermentativo (van Dijken 1993), y el piruvato es convertido en acetaldehído por la piruvato descarboxilasa y éste puede ser reducido a etanol por la alcohol deshidrogenasa (Bison et al. 1993; Lutstorf et al. 1968), u oxidado a ácido acético por la acetaldehído deshidrogenasa NADP-dependiente (Jacobson 1974). El acetaldehído funciona como receptor terminal de electrones cuya reducción por el NADH genera etanol (Boulton 1996). En levaduras "Crabtree negativas" en

presencia de oxígeno, el acetaldehído es preferentemente oxidado a acetato por la acetaldehído deshidrogenasa y luego convertido en acetil CoA por la acetil-CoA sintetasa (Van Urk 1990; Remize 2000). Sin embargo, la acumulación de ácido acético bajo condiciones de limitación de oxígeno resultaría de la insuficiente actividad de la acetil-CoA sintetasa requerida para la oxidación completa del acetato (Van Urk 1990). Por otro lado, la producción de glicerol estaría también ligada a la necesidad de reoxidar el NADH generado durante la glucólisis (Prior et al. 1997).

- **Efecto del etanol en *Saccharomyces ludwigii***

Existen reportes que indican que *Saccharomyces ludwigii* tiene la capacidad de tolerar altas concentraciones de etanol (Granchi et al. 2002). Tan es así que se ha observado la producción de etanol en concentraciones de hasta 12-14% v/v (Ciani 2002). El etanol inhibe la tasa de crecimiento específico y la tasa específica de fermentación (Sa-Correira 1983; Pina 2004; Ricci 2004). Se considera que el etanol provoca la disminución del contenido de esteroides en la membrana celular y esto afecta el transporte de azúcares. Así mismo, se considera que el etanol tendría un efecto inhibitorio sobre la actividad del sistema hexoquinasa, enzimas responsables de transferir grupos fosfato de una molécula a otra en la glucólisis (Ricci 2004; D'amore 1990; Nagodawithana 1977). En general, la tolerancia al etanol depende en la habilidad de la célula de la levadura para exportar el etanol producido hacia el exterior, un proceso que depende de la composición y fluidez de la membrana citoplasmática (Nagodawithana 1977).

- **Producción de compuestos de importancia sensorial por *Saccharomyces ludwigii***

Las condiciones de cultivo que conducen al metabolismo respirofermentativo en levaduras resultan en la producción de compuestos de importancia sensorial, los cuales dependiendo de sus concentraciones pueden influir positiva o negativamente en la calidad organoléptica de las bebidas fermentadas. Estos compuestos incluyen, el etanol, glicerol, ácido acético y además un sin número de compuestos volátiles. Entre los compuestos volátiles producidos están los ésteres, alcoholes superiores, cetonas, aldehídos y ácidos orgánicos, etc. La síntesis de ésteres es de mayor interés, ya que su presencia determina el sabor, olor y aroma afrutado de las bebidas fermentadas (Berry 1987; Torija 2003). Los ésteres son producidos

mediante reacción enzimática dentro de la célula de la levadura, la enzima que cataliza la reacción es la éster sintasa (Malcorps 1991; Yoshioka 1984; Mason 2000). Los alcoholes superiores, por otra parte, son formados a partir de α -cetoácidos, éstos pueden derivar de los correspondientes aminoácidos (valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, etc.), por desaminación a través de la vía de Ehrlich o a partir del metabolismo de la glucosa como precursores en la síntesis de aminoácidos (Ouchi 1980; Mauricio et al. 1997). Estudios realizados con *Saccharomyces ludwigii* reportaron una elevada producción de isobutanol, isoamil-alcohol, etil-acetato y ácido acético (Granchi 2002; Ciani 2002). Concentraciones de alcoholes superiores de 400 mg/L contribuyen negativamente a la calidad organoléptica (Rapp 1987). A excepción de 2-feniletanol el cual presenta aroma floral (Ribereau-Gayon 2006), y cuyo valor umbral de percepción es 10 mg/L (Guth 1997), los demás alcoholes superiores imparten características sensoriales desagradables (Rous 1983).

3.1.2.4. *Brettanomyces bruxellensis*

Brettanomyces bruxellensis es tolerante al etanol, anaerobio facultativo y Crabtree positivo (Hellborg y Piskur, 2009). Puede fermentar en condiciones aerobias y en concentraciones altas de glucosa (Kurtzman y Fell, 1998; Piskur et al., 2006). *B. bruxellensis*, pueden reproducirse cuando la concentración de nutrientes es baja, por lo que pueden denominarse levaduras nutricionalmente poco exigentes (Suarez et al., 2007).

En adición, El efecto Custers (también llamado Efecto Pasteur negativo) en las levaduras *Brettanomyces* es específico para este género, estimula la producción de etanol y ácido acético en condiciones aeróbicas (Scheffers y Wiken, 1969). También se ha encontrado que *B. bruxellensis* es resistente a grandes cambios en el pH y temperatura, puede tener un metabolismo más eficiente bajo condiciones limitadas de oxígeno (Blomqvist et al., 2010). Todavía no está claro con respecto al crecimiento de *B. bruxellensis*, ya que se produce de manera eficiente grandes cantidades de biomasa en condiciones limitadas de nutrientes (Uscanga et al., 2000). Actualmente, no está claro qué fuentes de nitrógeno y carbono utiliza en un ambiente deficiente en nutrientes.

- **Utilización de carbono y nitrógeno**

Se ha reportado que *B. bruxellensis* es capaz de crecer utilizando una variedad de fuentes de carbono y nitrógeno. (Smith, 1998a; Uscanga et al., 2000; Conterno et al., 2006; Rozpe, dowska Et al., 2011; Crauwels et al., 2015).

- **Fuentes de carbono**

B. bruxellensis es capaz de utilizar muchas fuentes de carbono, incluyendo glucosa, sacarosa, fructosa, maltosa, manosa, etanol, ácido acético y glicerol (Dias et al., 2003; Conterno et al., 2006; Galafassi et al., 2011).

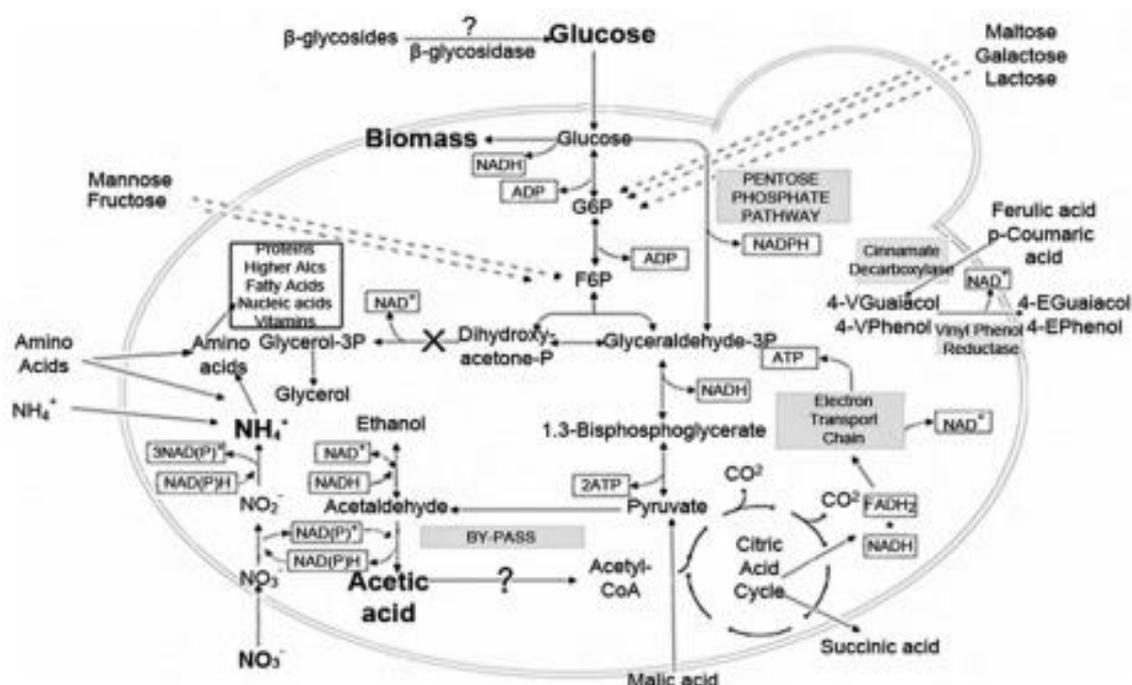


Figura 5. Vías de utilización de la fuente de carbono y nitrógeno en *B. bruxellensis* en condiciones aerobias y anaerobias.

La **figura 5** se muestra una representación de las vías de utilización de carbono y nitrógeno en *B. bruxellensis* en condiciones aerobias y anaerobias. Adaptado de (Galafassi et al., 2013). Los signos de interrogación representan vías que potencialmente podrían ser utilizadas por *B. bruxellensis*, pero son dependientes de la cepa. La marca X en la vía de formación de glicerol (**Figura 5**), indica que sólo ciertas cepas tienen una expresión génica suficientemente alta para formar glicerol.

La asimilación de nitratos suprime el efecto Custers, resaltado con una fuente más grande, mediante la reducción de nitrato a amonio. El efecto Custers sólo se produce en condiciones anaeróbicas cuando NADP no está disponible. En condiciones aeróbicas la coenzima es reoxidada a través de la vía respiratoria (Carrascosa et al., 1981).

3.1.2.5. *Schizosacaromyces pombe*

S. pombe utiliza compuestos orgánicos como fuente de energía y no requiere luz para crecer (**Ver figura 4**). Estas levaduras de fisión pueden crecer bajo condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Las levaduras de fisión son facultativamente fermentativas y exhiben fermentación aeróbica en presencia de exceso de azúcar (Sakurai et al. 2004). La alcohol deshidrogenasa (A-DH) cataliza la reducción de acetaldehído a etanol en el último paso de la fermentación alcohólica. Esta reducción se combina con la oxidación de NADH y proporciona el NAD⁺ esencial para la oxidación de gliceraldehído-3-fosfato en la glucólisis. Por lo tanto, la producción de etanol es importante para mantener el equilibrio redox en el citoplasma (Sakurai et al 2004).

3.2. Historia del té

Las infusiones de té han sido consumidas en muchos países desde tiempos milenarios, y hoy en día el interés por esta bebida resurgió debido a que reportes científico indican que el té puede traer muchos beneficios para la salud y puede ayudar a prevenir enfermedades crónicas. Las infusiones de té fueron introducidas inicialmente desde China a países Europeos por exploradores portugueses y alemanes como una hierba medicinal. Al paso de los años, se asoció el consumo de té con los hábitos alimenticios, de la misma forma que se acostumbraba tomar café o alguna bebida suave sin tener en cuenta sus beneficios (Hollman et al., 2001). El crecimiento de la población, las limitaciones de la medicina moderna y el creciente interés por alimentos funcionales y nutraceúticos contribuyeron a que mucha gente optara por nuevas maneras del cuidado de su salud y la tendencia del uso del té proliferara hasta nuestras generaciones (C. Dufresne & E. Farnworth, 2000).

Las dos variedades más populares de té son *Camellia sinensis* var. *sinensis*, procedente de zonas montañosas situadas entre China e India y *Camellia sinensis* var. *assamica* (té de Assam), procedente de Sri Lanka, antes Ceylan (Kiple & Ornelas, 2000).

3.2.1. Historia del té de Kombucha

El té de Kombucha, nombrado en ese entonces como *Divine Tsche*, también se originó en China en el año 220 a.C. y en Manchuria durante la dinastía de Tsin, donde fue utilizado por el Divino Che por sus propiedades desintoxicantes y energizantes (Roche, 1998). En el año 414, el Doctor Kombu trajo el hongo del té a Japón desde Corea para tratar los problemas digestivos del emperador Ankō. Después, fue introducido a Rusia y a Europa Oriental por mercantes orientales, hasta que poco a poco se fue propagando de casa en casa por su sabor refrescante y sus propiedades benéficas (Dufresne & Farnworth, 2000). Dichas propiedades benéficas a la salud han propiciado a que la bebida haya sido consumida alrededor del mundo a lo largo del tiempo, lo que incrementa el interés de su estudio.

3.2.2. Preparación del té de Kombucha tradicional

Cuando el hongo del té es fermentado en una mezcla que contenga agua, té negro o verde y azúcar, los microorganismos se combinan en un cultivo de fermentación compleja. Este cultivo produce compuestos que han sido considerados como tónicos para la salud a través de los siglos (Yapar et al., 2010). El té negro y el azúcar blanca son los mejores sustratos para la preparación de Kombucha, aunque también se puede utilizar té verde sin ningún problema (Reiss, 1994).

La preparación de la Kombucha tradicional consiste en añadir las hojas del té en agua hirviendo y dejar reposar durante diez minutos para obtener la infusión del té; posteriormente, se remueven las hojas y se añaden 50 g/L de sacarosa. Una vez que el azúcar esté disuelto, se vierte el té en un recipiente de vidrio que puede ser acidificado con vinagre o simplemente adicionarle el hongo Kombucha. El hongo del té se queda reposando en la superficie del recipiente, y tiene que ser cubierto correctamente con un paño limpio. La preparación se deja incubar a una temperatura de 20-30 °C, durante 1-8 semanas (Dufresne & Farnworth, 2000). El

producto final de esta fermentación es una bebida ligeramente dulce y ácida carbonatada.

3.2.3. Beneficios

Ha sido reportado que la bebida de Kombucha ayuda a la digestión, actúa como laxante, alivia los dolores causados por la artritis, tiene propiedad antimicrobiana, propiedades profilácticas, terapéuticas, anticancerígenas, antimicrobianas y ayuda a combatir el estrés. Otros estudios y testimonios afirman que la Kombucha también puede prevenir enfermedades cardiovasculares, reforzar el sistema inmunológico y reducir los problemas de inflamación y obesidad (Mohammadshirazi & Kalhor, 2016). En cuanto a sus propiedades antimicrobianas, se han hecho estudios con *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis* serotipo phymurium and *Bacillus cereus* que avalan esta propiedad que posee la Kombucha (Dufresne & Farnworth, 2000). Además, la ingestión regular de Kombucha contribuye significativamente a la disminución de peso corporal y a la longevidad (Hartmann et al., 2000).

Existe un estudio que comprueba que la Kombucha puede resultar una alternativa para curar y tratar el cáncer, debido a que acelera la producción de células-t y disminuye las molestias causadas por el tratamiento de este (Hauser, 2003). También disminuye la presión arterial, combate el acné, alivia el dolor por artritis e incluso puede restaurar el color original del cabello canoso.

Todos estos beneficios se atribuyen a la producción de distintos compuestos bioactivos y antimicrobianos que se producen durante la fermentación con el consorcio hongo Kombucha, entre los cuáles se encuentran algunos ácidos orgánicos como acético, láctico, glucónico y glucorónico (Dufresne & Farnworth, 2000).

3.3. Efecto benéfico de hierbas, semillas y raíces

Las plantas son fuentes naturales y tradicionales de la medicina en muchas partes del mundo. Las hierbas y especias se han utilizado desde la antigüedad para tratar una gran variedad de enfermedades humanas, pero muchas de ellas tienen que

pasar las pruebas de control dentro de la experimentación clínica moderna (Kochhar, 2008a; 2008b; Iyer et al, 2009). Algunas especias se utilizan en cantidades relativamente pequeñas por amplios sectores de la población mundial para mantener una mejor calidad de vida (Modak et al, 2007). En este sentido, no hay dudas que dentro de los hábitos alimentarios saludables, el consumo de hierbas, semillas y raíces han sido muy recomendados como componentes de la dieta debido a su extensa gama de fitoquímicos y nutrientes promotores de efectos benéficos para una salud (Liu, 2003; 2004; Mizrahi et al, 2009; Badimon et al, 2010; Massaro et al, 2010, Figuera et al, 2012).

Las palabras hierba y especia a menudo se utilizan indistintamente; pero, generalmente la hoja de una planta puede ser denominada hierba y cualquier otra parte de la planta seca, se llama especia (principalmente por contener sustancias aromáticas). Las especias pueden ser yemas (clavos), corteza (canela), rizomas o raíces (cúrcuma y jengibre), bayas (pimienta), semillas aromáticas (cardamomo y comino) y hasta el estigma de una flor. Muchas de las de semillas aromáticas llamadas especias son realmente obtenidas de plantas a base de hierbas cuando han terminado la floración. El prefijo “fito” deriva de la palabra griega *phyto* que significa planta; por lo tanto, el término fitoquímico se refiere a los químicos presentes en las plantas, definidos como compuestos bioactivos sin nutrientes presentes en cualquier parte de las plantas, con efectos benéficos a la salud que contrarrestan el riesgo de las enfermedades crónicas (Liu, 2004). Puesto que estos compuestos, en general son promotores de la salud, más allá de sus aportes básicos nutricionales, en los últimos años también se les ha denominado nutracéuticos (Wildman, 2007).

Las especias dietéticas tienen influencia en varios sistemas del cuerpo incluyendo al sistema gastrointestinal, cardiovascular, reproductivo y nervioso dando como resultado diversas acciones metabólicas y fisiológicas (Kochhar, 2008b). Mediante el uso de las herramientas y técnicas de la fisiología contemporánea o más antigua. Los investigadores de hoy en día están dilucidando los mecanismos que justifican el uso tradicional de las especias como potenciadores del apetito, como digestivos y antiflatulentos, así como, su funcionamiento en la diarrea y el estreñimiento a partir de los estudios realizados por estos investigadores pioneros (Clair, 1961; Pruthi,

1976; Farnsworth, 1985), el vaciado gástrico, la motilidad gastrointestinal, secreción de ácido gástrico, secreción de bicarbonato intestinal, secreción biliopancreática, procesos de absorción y microflora bacteriana (Kang et al, 1988; Newberne, 1988; Udupihille, 1993). Por lo tanto, en la actualidad el uso de hierbas y especias como ingredientes funcionales para mejorar los beneficios de los alimentos es una alternativa interesante.

La mayoría de los beneficios de las hierbas y especias culinarias se deben principalmente a sus propiedades antioxidantes. Las especies reactivas, como los radicales libres y afines se generan en el cuerpo como resultado de reacciones metabólicas, la acumulación de radicales libres causa daños en los sistemas vivos como consecuencia del estrés oxidativo. Los eliminadores de radicales libres (antioxidantes) tienen potencial para prevenir, retrasar o aliviar muchas enfermedades crónicas como el envejecimiento, cáncer, diabetes, enfermedades cardíaca, derrames cerebrales, malaria y artritis reumatoide. (Mariutti et al, 2008).

Una gama de sustancias bioactivas presentes en las hierbas y especias han sido analizadas (Kitts, 1994), pero el desafío consiste en integrar este conocimiento para determinar si los efectos se observan en los seres humanos. Las sustancias bioactivas están clasificados de acuerdo a sus grupos funcionales, por ejemplo alcoholes, aldehídos, aminas, ésteres, éteres, cetonas, tioles, etc; como constituyentes de los aceites esenciales presentes en las especias (Zachariah, 1995; Menon, 2000). Varios ingredientes activos de especias como la capsaicina (pimienta roja), curcumina (cúrcuma), ácido eugenésico (clavo) y ácido ferúlico (cúrcuma), han demostrado tener influencia en el metabolismo de los lípidos, mayormente por movilización de los ácidos grasos (Srinivasan y Satyanarayana, 1987).

La actividad antimicrobiana de hierbas y especias es una de las funciones que brindan estas gracias a sus múltiples compuestos bioactivos. Hay muchos fitoquímicos tales como carotenoides, compuestos fenólicos y organosulfurados que poseen actividad biológica más allá de antioxidación. El aceite de clavos (*Syzygium aromaticum*), por ejemplo, tiene diversas actividades biológicas que incluyen propiedades antibacteriana, antifúngica, antioxidante e insecticida. El alto nivel de

eugenol presente en el aceite de clavo imparte una fuerte actividad biológica y antimicrobiana (Raghavenra et al, 2006).

Las hierbas y especias tienen una gran capacidad de estimulación visual y olfativa, de ahí que sean tan usuales en los alimentos, estas pueden añadir atractivo visual y olfativo ya que adicionan color y aromas a una amplia gama de alimentos. Algunos fitoquímicos dan a las hierbas y especias sus colores indicando también sus funciones fisiológicas únicas. También resultan convenientes para su uso en la cocina diaria puesto que están disponibles durante todo el año, ya sea en forma fresca o seca, son económicas, variadas y bastante gustosas. Además de proporcionar variedad, sabor, color y aroma a la dieta diaria pueden reducir la necesidad de utilizar otros aromas menos saludables como sal, grasa o azúcar.

3.3.1. Cardamomo

El cardamomo, es un fruto que principalmente se usa en la gastronomía como especia, pero también posee propiedades medicinales, ya que contiene compuestos como cineol, y sirve para remediar naturalmente la tos y despejar los bronquios. Posee la capacidad de preservar la salud bucal inhibiendo el crecimiento bacteriano y de otros microorganismos. El cardamomo aporta fortaleza a los intestinos y el estómago. Además, reduce las flatulencias y facilita la expulsión de gases al exterior, aliviando el dolor ejercido sobre las paredes intestinales. Contiene vitaminas y otros compuestos de acción antienviejimiento que protegen a las células de los radicales libres. Asimismo, promueve la acción de la tripsina, sus principales compuestos son el cinamaldehído, el ácido oléico, linolénico, esteárico, también contiene vitaminas como la tiamina, riboflavina, niacina y monoterpenos como el cineol, p-cimeno, citronelol, citronelal, limoneno, linalol, bornaol, felandreno, alfa-pineno, beta-pineno, sabineno, geraniol, alfa-felandreno, alfa-terpineno, gamma-terpineno, alfa-terpineol, alfa-thujeno, mirceno, nerol. Los monoterpenos son los principales responsables del intenso sabor de sus semillas ya que son compuestos muy aromáticos, además es una de las fuentes naturales más ricas en cineol. (Duke, 1998; Kuklinski, 2000).

3.3.2. Árnica

El árnica (*Arnica montana*) es una planta perenne que crece en las montañas, pastizales, bosques claros y prados alpinos. Las raíces y las flores de árnica se han

usado durante miles de años en la medicina tradicional para muchos propósitos de salud (Sutovská et al, 2014). El extracto de raíz ha sido utilizado para tratar hematomas y esguinces, dolor reumático, flebitis, inflamación de la piel y en preparaciones homeopáticas para la estimulación del sistema inmune. Por otro lado, las hierbas y flores de esta planta también se utiliza como auxiliar en el tratamiento de amigdalitis, anemia, anginas, circulación sanguínea deficiente, diarrea, dolor de garganta, enfermedades estomacales, cardiovasculares, de la columna vertebral, del hígado, hipertensión, hipotensión, inflamación, inflamación de la boca, inflamación de las mucosas bucales y mareo. Se recomienda como analgésico, antiespasmódico, antiinflamatorio, antiséptico, diurético, estimulante de la circulación sanguínea y reductor de inflamaciones (Font-Quer, 1962; Saury, 2004).

El aceite esencial de los tallos, hojas y flores de árnica cuenta con múltiples compuestos químicos, entre los que se destacan una gran cantidad de terpenos y polifenoles (Rodríguez-Chávez et al, 2017). Los compuestos activos y componentes principales se mencionan a continuación.

En las flores:

- Aceite esencial (0,1-0,3%): contiene derivados del timol, del florol, compuestos poliacetilénicos y sustancias parecidas al azuleno de la manzanilla.
- Aceites fijos: glicéridos de los ácidos palmítico, oleico y láurico.
- Resina que contiene citisina, ácido gálico y pigmentos amarillos.
- Alcaloides: arnicina.
- Flavonoides (0,2%): quercetol-3-glucogalacturónido, astragalósido, isoquercitósido.
- Ácidos orgánicos: ácidos fórmico, angélico, cafeico y clorogénico.
- Principios amargos: helenanina y dihidrohelenanina.
- Alcoholes triterpénicos (4%): faradiol, arnidiol.
- Pigmentos carotenoides: xantofila, xantofilepósido y zeaxantina.

En la raíz:

- Aceite esencial (0,5-1,5%), ácidos orgánicos: ácidos cafeico, fumárico, y succínico, gomas, fructosa, taninos y sacarosa.

Se han reportado compuestos tóxicos en el aceite esencial de la planta, los cuáles son el timol, cineol, ácido caféico y ácido clorogénico. Estos dos últimos con

propiedades rubefacientes, es decir que provocan enrojecimiento en la piel. También contiene principios amargos llamados lactonas sesquiterpénicas, como la helénica (Duke, 1998; Kuklinski, 2000; Gotfredsen, 2009).

3.3.3. Cúrcuma

Los rizomas secos de la planta de cúrcuma (*Curcuma longa*) son conocidos por su uso como especia y propiedades medicinales en el tratamiento de la úlcera péptica y efectos carminativos (Van Wyk y Wink, 2005). La curcumina [1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-1-6-hepatadina-3-5-diona], demetoxicurcumina y bisdemetoxicurcumina, son miembros de la familia de los curcuminoides que representan los pigmentos amarillos aislados de la cúrcuma. Otros compuestos hallados en el rizoma son: bisabolano, guaiano, α - y β -turmerona, curlona y zingibereno. Sus propiedades inmuno-moduladoras incluyendo antioxidantes, antiinflamatorias y antitumorales están bien documentadas (Govindrajan, 1980).

La curcumina ejerce efectos beneficiosos en la colitis y en las enfermedades inflamatorias originadas por las tensiones oxidativas (Platel y Srinivasan, 1996). La capacidad inmunonutricional de la curcumina también ha demostrado su papel activo en el tratamiento de alergias (Govindrajan, 1980). La cúrcuma contiene aceites esenciales, aceites grasos y 2 a 5% de curcuminoides; no obstante, algunas variedades pueden contener hasta un 9% de estos últimos. Contiene todos los nutrimentos principales tales como carbohidratos, proteínas y grasas, proporciona muchos otros en pequeñas cantidades y es muy rica en ácidos grasos omega-3. Los curcuminoides son compuestos polifenólicos con un fragmento β -dicetona, que difieren en cuanto a sus grupos hidroxilo y metilo, denominados curcumina I, II y III. Los esfuerzos actuales de investigación se centran en la ciencia basada en la evidencia para determinar los beneficios funcionales de los compuestos bioactivos.

La cúrcuma entera o los curcuminoides extraídos parecen ser activos en muchos procesos de enfermedades con referencia específica a las dolencias crónicas tales como patologías cardiovasculares, degenerativas, infecciosas, trastornos inflamatorios y cáncer. El ácido embélico y la cúrcuma son hipolipidémicos potenciales y agentes hipocolesterolémicos (Dixit et al, 1988). La propiedad quimiopreventiva y bioprotectiva de la curcumina aumenta la sensibilidad de las

células cancerígenas hacia ciertos medicamentos antitumorales, haciendo que la quimioterapia sea más eficaz. También posee una fuerte actividad antimicrobiana, antioxidante (Lim et al, 2001) e inhibe a la proteína integrasa del VIH-1 (Li et al, 1993). La curcumina y la capsaicina hacen menos litogénica la secreción de sales biliares a la vez que reducen los niveles de colesterol, sin ningún efecto significativo en la absorción de grasa; además, la capsaicina también actúa como un lipotrópico, evitando la acumulación de triglicéridos, estimulando la movilización de lípidos, reduciendo el peso del tejido adiposo perirrenal y los triglicéridos del suero de ratas alimentadas con dietas ricas en grasas (Dixit et al, 1988). La curcumina, eugenol y ácido ferúlico reducen la biosíntesis de ácidos grasos en el hígado de ratas e incrementan la actividad de la lipoproteína lipasa del músculo esquelético (Srinivasan y Satyanarayana, 1987).

3.3.4. Menta

La menta es una hierba aromática perteneciente al género *Mentha* y la familia Lamiaceae. A nivel mundial, el género *Mentha* comprende más de 30 especies distribuidas principalmente en regiones templadas, tropicales y subtropicales. El número de taxonómicamente las especies válidas en el género no se pueden determinar con certeza, ya que los miembros libremente cruzar entre ellos, produciendo muchas formas intermedias. La mayoría de las especies son plantas perennes con corredores frondosos, estolones o portainjertos subterráneos (Lawrence, 2006).

El aceite de menta se compone por más de 200 constituyentes dependiendo de la especie, cultivo, las condiciones climáticas, ubicación geográfica y el método de extracción. Su contenido en aceites esenciales es del 1 al 3%, sobretodo de mentol, ácido caféico, y L-carvone como responsable del característico olor de la menta. Otro de sus componentes es el limoneno. Un compuesto presente en los cítricos, cariofileno y dihirocarvol. (Font-Quer, 1962; Saury, 2004). Estos dan a la hierba las propiedades medicinales y aromáticas que la caracterizan.

El mentol en la hierba ayuda al revestimiento del tracto digestivo y estimula la producción de bilis, que es un fluido digestivo esencial. También es utilizado como una hierba medicinal para tratar el dolor de estómago y dolores de pecho. Por otro

lado, se utiliza comúnmente para aliviar la picazón, especialmente la causada por picaduras de insectos (a menudo mezclada con alcanfor). El mentol tiene un efecto analgésico y se puede combinar con otros productos para hacer geles o cremas para el alivio de dolores menores y dolores provocados por calambres musculares y esguinces. También se consume como té para bajar los niveles de estrés, tratar trastornos de sueño y como fuente de antioxidantes (Taneja & Chandra, 2012).

3.4. Alimentos funcionales y nutraceuticos

Actualmente, existe la tendencia de consumo de alimentos nutraceuticos o funcionales porque se ha reportado que previenen algunas enfermedades degenerativas y contribuyen a mantener la buena salud de sus consumidores, lo cual ha provocado un mayor interés en el estudio de éstos (Aparicio, 2017).

El término Alimento Funcional (AF) fue propuesto por primera vez en Japón en la década de los 80's con la publicación de la reglamentación para los "Alimentos para uso específico de salud" ("Foods for specified health use" o FOSHU) (Alvídrez et al, 2002). Los alimentos funcionales son aquellos que tienen efectos benéficos específicos en la salud del consumidor como resultado de sus ingredientes (prebióticos, probióticos, antioxidantes, ácidos grasos omega-3, ácido fólico, fitoesteroles, fitoestrógenos, entre otros), o porque se le han removido aquellos componentes del alimento que pueden tener un efecto perjudicial en la salud, como por ejemplo la remoción de componentes alérgenos, irritantes, hipercalóricos, entre otros (Yamada, 2008).

El término nutraceutico fue establecido en 1989 por el Dr. Stephen DeFelice, Presidente de la Fundación para la Innovación en Medicina (Foundation for Innovation in Medicine), en Cranfor, Nueva Jersey, Estados Unidos (SENM). Proviene de combinar las palabras nutrimento (componente aislado de un alimento) con farmacéutico (una forma galénica de prescripción) que resulta en un producto concentrado comercializado como suplementos nutricionales y/o suplementos dietéticos (Thakur et al, 2010; Singh et al, 2012); cuya fuente, casi exclusiva, la constituyen las plantas. En tanto que, un alimento funcional se refiere a todo alimento convencional que haya demostrado satisfactoriamente tener propiedades

fisiológicas beneficiosas y/o reduce el riesgo de contraer enfermedades crónicas más allá de sus efectos nutricionales básicos (Dalle Zotte y Szendrő, 2011), donde se incluyen a las hierbas y especias culinarias ampliamente reconocidas como alimentos que proporcionan beneficios a la salud al disminuir el riesgo de enfermedades crónicas (Tapsell et al, 2006; Kochhar, 2008; Iyer et al, 2009; Mann, 2011).

3.4.1. Probióticos y prebióticos

Los probióticos y prebióticos son de los componentes más frecuentes en los alimentos nutraceúticos y funcionales. Desde el punto de vista metabólico-nutricional, las bacterias del colon o probióticos, tienen una función más que importante sobre la fibra y los sustratos considerados como prebióticos (Sastre, 2003).

Los probióticos son microorganismos viables selectivos administrados en cantidad adecuada conferir beneficios a la salud más allá de la nutrición general. Estos microorganismos son promotores de varios beneficios a la salud como prevenir las infecciones del tracto intestinal, mejorar el metabolismo de la lactosa, reducen los niveles de colesterol sérico, mejorar la inmunidad, estimular la absorción de calcio, mejorar la digestibilidad de las proteínas, promover la síntesis de vitaminas (vitamina B, ácido nicotínico y ácido fólico) y contrarrestar los efectos de los patógenos transmitidos por los alimentos (Panghala et al, 2018).

La definición original de prebióticos fue presentada por Gibson y Roberfroid en 1995 y sigue vigente. Los definen como: “Ingredientes dietéticos no digeribles que afectan benéficamente la salud de los consumidores al estimular selectivamente el crecimiento y/o la actividad de un número limitado de bacterias en el colon, por lo tanto mejorar la salud del huésped” (Gibson y Roberfroid, 1995). Esta definición incluye sustancias naturales, así como las producidas químicamente. Por lo tanto, muchas sustancias de fibra dietética están incluidas bajo esta definición.

Torwell definió a la fibra dietética como polisacáridos que no son digeridos por enzimas humanas. Dicha definición incluye sustancias de pared celular como celulosa, semicelulosa, pectina y lignina, así como polisacáridos intracelulares como

gomas y mucílagos; dentro de este grupo también se incluye el almidón resistente, que son productos procedentes de la degradación del almidón no digerible en el intestino delgado (Folch, 2018).

La fibra y los probióticos trabajan en conjunto cuando la fibra dietética alcanza el colon, los polímeros de glucosa son hidrolizados a monómeros por la acción de las enzimas extracelulares de las bacterias del colon. El metabolismo continúa en la bacteria hasta la obtención de piruvato, a partir de la glucosa, en la vía metabólica de Embden-Meyerhoff. Este piruvato es convertido en ácidos grasos de cadena corta (AGCC): acetato, propionato, butirato y también en productos gaseosos finales: CO₂, H₂ y CH₄. Más del 50% de la fibra consumida se degrada en el colon, el resto se elimina con las heces. (Sastre, 2003).

Más de 25 enfermedades han sido asociadas con la microbiota en el tracto gastrointestinal, de aquí la importancia de generar nuevos alimentos nutraceúticos y funcionales para el beneficio de la salud (Parker, 2018).

3.5. Obesidad, Síndrome Metabólico y Diabetes Mellitus Tipo II

La obesidad, el Síndrome Metabólico (SM) y Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2) son tres enfermedades interrelacionadas que comparten mecanismos de aparición y evolución y con frecuencia se van combinando sucesivamente y ocasionan complicaciones cardiovasculares. Su prevalencia crece alarmantemente y debería impulsar a los profesionales de la salud y a los gestores a implantar medidas urgentes para prevenir la aparición de complicaciones. Las más eficaces, aunque menos practicadas, son las relacionadas con el estilo de vida. También son necesarios tratamientos farmacológicos destinados al control de los factores de riesgo (hipertensión, dislipemias, trombofilia), las alteraciones metabólicas y el propio exceso de peso (Alegría et al, 2008).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de grasa corporal (adiposidad) que puede deteriorar salud. La Adiposidad, como otros rasgos humanos (por ejemplo, presión arterial y glucosa en sangre), es un rasgo continuo y por lo tanto, la clasificación de

individuos en estas enfermedades no es sencilla. A pesar de eso, se ha puesto énfasis en obtener un diagnóstico más preciso para este padecimiento, lo cual resulta fundamental en el cuidado y la práctica clínica, ya que con base en estos resultados se justifican los tratamientos, pronósticos, y la justificación administrativa del uso de los recursos con los que se atenderá al paciente (Lazo & Bilal, 2016). Las causas de la obesidad se pueden dividir en dos categorías: causas médicas y no médicas. Las causas médicas son aquellos derivados de condiciones médicas que directa o indirectamente aumentan la adiposidad; dichas causas pueden ser neuroendocrinas, genéticas o inducidas por el efecto de medicamentos.

La prevalencia de la obesidad en México es la más alta del mundo, con casi el 70% de los adultos clasificados como sobrepeso u obesidad, siendo la enfermedad que representa el mayor factor de riesgo en muertes prematuras en nuestro país (Martínez et al, 2015). Según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, Gutiérrez et al., 2012), la prevalencia de sobrepeso y obesidad en adolescentes, en mujeres aumentó de 33.4 a 35.8% y en hombres creció 34.1%. En el grupo de mayores de 20 años, en mujeres, el porcentaje pasó de 71.9 a 73% y en hombres ascendió al 69.4%.

El SM es un problema de salud pública en México, su fisiopatología más reconocida es la resistencia a la insulina y la disfunción endotelial, que elevan el riesgo de diabetes y de eventos cardiovasculares. Según los criterios del *National Cholesterol Education Program* (con modificación de los valores de cintura conforme la Federación Internacional de Diabetes), el SM tiene una prevalencia de 42.3% en los adultos mexicanos mayores de 20 años (Córdoba et al, 2007). Los tres elementos más comunes de este síndrome en México son: obesidad abdominal, hipoalfalipoproteinemia y elevación de la tensión arterial (Carranza & López, 2008).

El SM es una combinación de cinco anomalías clínicas: insulinoresistencia, alteración de la regulación de glucosa, dislipidemia, hipertensión y obesidad. Dichos padecimientos aumentan el riesgo de padecer enfermedades mortales como lo es la DM2. El riesgo de padecer SM aumenta debido a deficiencias nutricionales, daño celular, disminución de la producción de energía y un bajo potencial antioxidante de

la célula. Se ha reportado que el aumento en el índice de masa corporal puede ser otra de las causas (Bathla et al, 2017). La Organización Mundial de la Salud (OMS) toma como criterios para definir al SM la insulinoresistencia y/o niveles alterados de glucosa en ayunas y/o tolerancia alterada y dos o más de los padecimientos que se mencionan a continuación (Alberti & Zimmet, 1998):

- Aumento de la circunferencia de la cintura (80 cm para las mujeres y 90 cm para los hombres).
- Presión arterial sistólica de 130 mm de Hg y/o presión arterial diastólica de 85 mm Hg (o en tratamiento para la hipertensión).
- Niveles de triglicéridos de 150 mg/dl o en tratamiento específico para esta anomalía.
- Niveles de HDL de 40 mg/ dl para los hombres y 50 mg / dl para las mujeres o en tratamiento específico para esta anomalía.
- Test rápido de glucosa (FBS) de 100 mg / dl (o en tratamiento específico para diabetes mellitus).

La DM2 es una patología profundamente ligada a la obesidad y al SM. Es una enfermedad degenerativa que tiende a presentarse en personas jóvenes. Se define como un grupo de enfermedades metabólicas caracterizada por hiperglucemia crónica, como resultado de defectos en la secreción de insulina. Uno de los factores de riesgo es la prediabetes, que es un estado precedente de la diabetes donde se presentan anomalías en la homeostasis de la glucosa (Sánchez & Menjívar, 2016).

La DM2 de México es cada vez más frecuente afectando a las personas en su edad productiva, elevando la posibilidad de que una mayor proporción de personas con diabetes tengan que lidiar con complicaciones en una etapa relativamente temprano de su vida (Barquera et al., 2013; Villalpando et al., 2010). La DM2 es una de las principales causas de muerte en nuestro país y tiene un gran impacto económico en México considerando que aproximadamente 12 millones de personas la padecen (FID, 2015) Además, solo una minoría de mexicanos puede manejar con éxito su condición de diabetes; se estima que el 70 % de las personas con diabetes llevan un mal control de su enfermedad (Villalpando et al., 2010). Además, muchos mexicanos



tienen trabajos informales, lo que posiblemente limite su acceso a un cuidado de su salud de calidad y por lo tanto, las opciones de tratamiento adecuadas son limitadas.

4. HIPÓTESIS

Si se emplean hierbas (árnica y menta), semillas (cardamomo) y raíces (cúrcuma) para realizar infusiones de té fermentadas con hongo Kombucha, se extraerán diferentes compuestos bioactivos con propiedades antiinflamatorias, hipoglucemiantes y antihipertensivas que, en conjunto con los efectos benéficos de probióticos (BAL) y prebióticos (fibra de soya), producirán una bebida innovadora con potenciales usos para el control y tratamiento de patologías asociadas con el Síndrome Metabólico, como Obesidad y Diabetes Mellitus Tipo 2 cuya característica principal es la inflamación celular y los niveles altos de azúcar en la sangre.

5. METODOLOGÍA

Los reactivos utilizados fueron de la marca Sigma de Aldrich y los medios de cultivo Becton Dickinson, el hongo *Kombucha* fue obtenido de Kombucha México y los cultivos de bacterias lácticas fueron marca Bioprox, las hierbas, semillas y raíces fueron adquiridas en el mercado de Sonora de la Ciudad de México. Para cumplir con los objetivos planteados en éste proyecto se llevaron a cabo las siguientes metodologías.

Bebidas elaboradas. Se prepararon tres bebidas, árnica + cardamomo (bebida No. 1), cúrcuma + cardamomo (bebida No. 2) y menta + cardamomo (bebida No. 3).

Preparación de las infusiones. Las hierbas, semillas y raíces se limpiaron (tierra, piedras, basura, etc), se pesaron (100 g/L) y se hirvieron por separado a temperatura de ebullición durante 30 minutos. A estas infusiones se le agregó azúcar (40 g/L) y ácido fólico (0.1%).

Hongo Kombucha. Para reproducirlo durante toda la investigación, se inocularon 24 g de Scoby en una infusión de un litro de agua con 100 g de sacarosa y 6 g \pm 0.1 g de té negro.

Microscopía de barrido. Para conocer la morfología microscópica del hongo Kombucha, se utilizó un microscopio de barrido JEOL JSM- 6010LA, a 19 Kv a una distancia de trabajo de 16 mm y un haz de 26. Barra de 10 μ m X 1500 A.

Bacterias lácticas. Se utilizó un cultivo de bacterias lácticas de la marca Bioprox *Lactobacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.*

5.1. Preparación y fermentación de las bebidas nutraceuticas

Para la formulación y desarrollo de las bebidas se pesaron las cantidades correspondientes para cada una, presentadas en la **Tabla 2**, todos los experimentos se realizarón cinco veces (n=5).

Tabla 2. Componentes utilizados en la formulación y desarrollo de las bebidas nutraceúticas fermentadas.			
Componente	Bebida No. 1 (Árnica + Cardamomo) (g/L)	Bebida No. 2 (Cúrcuma + Cardamomo) (g/L)	Bebida No. 3 (Menta + Cardamomo) (g/L)
Agua	554.0	625.0	675.0
Infusión de Cardamomo	180.0	18.0	18.0
Infusión de Árnica	180.0	---	---
Infusión de Cúrcuma	---	11.0	---
Infusión de Menta	---	---	60.0
Scoby	25.0	25.0	25.0
Azúcar	40.0	40.0	40.0
Ácido fólico	0.001	0.001	0.001
Fibra de soya	20.0	20.0	20.0
Sabor manzana	0.06 ppm	0.06 ppm	0.06 ppm

1. Una vez pesadas las cantidades de materias primas correspondientes para cada bebida a preparar, se colocaron en un frasco de vidrio, se agregó el agua y se esterilizó a 15 lb/in² durante 15 minutos.
2. Sacar del autoclave y atemperar hasta alcanzar la temperatura ambiente, agregar el Scoby (50g/L).
3. Envasar las bebidas en botellas de vidrio estériles y conservarlas a temperatura ambiente.

Determinación de pH. El equipo usado para este análisis fue un Potenciómetro marca HANNA modelo pH 213, el cual dispone de un electrodo combinado de pH modelo HI 1131B, con su brazo-soporte, y una sonda de temperatura, esta determinación se realizó cada 24 horas durante el tiempo que duró la fermentación (1, 2, 3 y 4 días), la temperatura a la que se midió el pH fue de 18 a 20 °C.

Determinación del porcentaje de acidez titulable expresada como ácido acético. Esta se realizó mediante una titulación de la siguiente manera:

1. Pesar 9 gramos de muestra en un matraz Erlenmeyer.
2. Adicionar 20 ml a 30 ml de agua destilada y 3 a 5 gotas de fenolftaleína 0.5 % (p/v)
3. Titular con la solución estándar de NaOH 0.1 N marca Sigma-Aldrich. El final de la valoración es cuando se obtiene un color ligeramente rosado y que

persiste con la agitación. El porcentaje de acidez titulable se determinó mediante la siguiente fórmula.

$$\% \text{ acidez titulable} = \text{gasto del álcali (mL)} \times N(0.1) \times (\text{meq ácido. acético}) \times 100/\text{g de muestra.}$$

Los valores finales de pH y acidez titulable expresada como ácido acético para cada bebida se presentan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. pH y % acidez titulable al finalizar la fermentación.			
	Bebida No. 1 (Árnica + Cardamomo)	Bebida No. 2 (Cúrcuma + Cardamomo)	Bebida No. 3 (Menta + Cardamomo)
% acidez titulable (expresada en ácido acético)	0.20 %	0.19 %	0.15 %
pH	3.7-3.8	3.9-4.0	4.0-4.1

4. Una vez alcanzada la acidez y el pH correspondientes, separar el hongo Kombucha del sobrenadante por filtración con papel filtro (0.22 μm), y se esterilizaron a 15 lb/in² durante 15 minutos. (para eliminar cualquier forma de vida incluyendo esporas). Después de esterilizar, se enfriaron las bebidas y se agregaron bacterias lácticas igualando la turbidez del tubo 5 del Nefelómetro de McFarland (1.5×10^9 UFC/ml medio). Se realizó el recuento de biomasa por peso húmedo (Hongo Kombucha) y bacterias lácticas (actividad probiótica) por sembrado masivo en agar rogosa (MRS) a 45 °C, cada semana durante un mes (1, 2, 3, y 4 semanas) y se determinó el azúcar residual por el método de fenol sulfúrico, se realizaron pruebas microbiológicas que aseguren la inocuidad de las bebidas y pruebas sensoriales para determinar el grado de aceptación de las bebidas.

Determinación de biomasa por peso húmedo. Esta prueba se realizó durante cuatro días (24, 48, 72, 96 hrs), por sacrificio de matraces.

1. Preparar 500 ml de cada té de acuerdo a la **Tabla 2** y distribuir 100 mL en cinco matraces Erlenmeyer de 250 ml, numerarlos del 0 al 4 (blanco, 24, 48, 72 y 96 hrs). Esterilizar los matraces a 15 lb/in² durante 15 minutos.
2. Una vez que alcancen la temperatura ambiente, añadir 2.5 g de Scoby en peso húmedo a cada matraz y dejar fermentar.
3. Transcurridas 24 h, tomar el matraz 1 y separar el hongo Kombucha del medio mediante filtración con papel filtro poro fino previamente pesado. Pesar el papel con la biomasa bacteriana. Realizar el mismo procedimiento cada 24 h, hasta el tiempo 96 horas.
4. Se realizarón cinco repeticiones (n=5) para cada una de las bebidas (bebida No. 1 bebida No. 2 y bebida No. 3).

Determinación de bacterias ácido lácticas (actividad probiótica), por el método de sembrado masivo en medio MRS en las bebidas desarrolladas

1. Tomar 10 g de cada bebida (1, 2 y 3) y diluir en 90 ml de solución salina estéril (solución madre).
2. Realizar diluciones seriadas (1×10^{-1} a 1×10^{-12}), en tubos de ensaye con 4.5 ml de solución salina estéril, vertiendo 0.5 ml de la solución madre en el primer tubo hasta llegar a la dilución 1×10^{-12} .
3. Tomar las diluciones 1×10^{-8} , 1×10^{-10} y 1×10^{-12} . Sembrar cada dilución por triplicado las diluciones en una caja petri con medio MRS con un asa bacteriológica calibrada de 0.001 ml y distribuir las colonias por sembrado masivo.
4. Incubar las cajas a 37 ± 0.5 °C por 72 horas en condiciones de anaerobiosis.
5. El recuento de BAL se realizó durante cuatro semanas, para evaluar la actividad probiótica y la vida de anaquel del producto.

Determinación de azúcares totales por el método de fenol sulfúrico

Preparación del stock de glucosa. Tomar 0.200 g de glucosa anhidrida grado reactivo con exactitud hasta la décima de mg. Disolver y ajustar a aforo de 100 ml con agua desionizada. Empacar en viales de 10 ml y rotular correctamente. Conservar en congelación para su posterior uso (usar un vial cada vez que se haga un ensayo).

Preparación del reactivo fenol al 5%. Tomar 5.0000 g de fenol grado reactivo pesados con actitud hasta la décima de gramo. Disolver y aforar a 100 ml con agua desionizada, almacenar en un frasco ámbar y rotular correctamente. El reactivo es muy estable, por lo tanto puede conservarse a temperatura ambiente.

Preparación de la curva de calibración

1. Realizar la curva estándar de glucosa como se indica en la **Tabla 4** en tubos limpios y secos. Las agitaciones se deben llevar a cabo en un vortex.
2. Leer la absorbancia de cada tubo a 490 nm y trazar la curva de Absorbancia/concentración (mg/ml).

Tabla 4. Preparación de la curva estándar de glucosa.						
No. de tubo	1	2	3	4	5	6
Solución de glucosa (mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Agua destilada (mL)	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0
Fenol 5% (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Agitar (seg)	10	10	10	10	10	10
Enfriar en baño de hielo (min)	5	5	5	5	5	5
H ₂ SO ₄ concentrado frío (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Agitar (seg)	10	10	10	10	10	10
Reposar a temperatura ambiente (min)	10	10	10	10	10	10
Incubar en baño maría a 30°C (min)	20	20	20	20	20	20

Determinación de sustrato residual de las diferentes muestras recolectadas durante la fermentación (24, 48, 72 y 96 horas), para cada bebida elaborada

1. Centrifugar aproximadamente las 5 ml de muestra a 2500 rpm durante 10 minutos.
2. Tomar el sobrenadante y realizar una dilución 1/100 agua destilada.
3. Tomar 0.5 mL de la dilución y colocarlo en un tubo de ensayo.

4. Realizar a cada muestra la metodología que se indica en la **Tabla 5**.
5. Leer la absorbancia a cada tubo a 490 nm y trazar la curva de Absorbancia/concentración (mg/ml), realizar cada experimento cinco veces (n=5).

Tabla 5. Determinación de azúcares totales por Fenol Sulfúrico para las muestras recolectadas.							
Dilución de la muestra (mL)	Fenol 5% (mL)	Agitar (seg)	Enfriar en baño de hielo (min)	H ₂ SO ₄ concentrado frío (mL)	Agitar (seg)	Reposar a temperatura ambiente (min)	Incubar en baño maría a 30°C (min)
0.5	0.5	10	5	2.5	10	10	20

5.2. Análisis microbiológicos

El análisis microbiológico se llevo a cabo siguiendo la NOM-112-SSA1-1994. La determinación de microorganismos coliformes totales y fecales se realizó por la técnica de número más probable (NMP), *Pseudomonas* por métodos rápidos Pseudolert ® y *Escherichia coli* por el método de Colilert ®.

Determinación de microorganismos coliformes totales y fecales por la técnica de número más probable (NMP)

Prueba presuntiva.

1. Agitar a muestra e inocular 10 mL en 3 tubos de Caldo Lactosado Rojo de Fenol (CLRF) concentración doble (200%).
2. Inocular 1 mL de muestra en 3 tubos de CLRF concentración sencilla.
3. Inocular 0.1 mL de muestra en 3 tubos de CLRF concentración sencilla.
4. Incubar los tubos a 37 ± 0.5 °C durante 24-48 horas.
5. Examinar cuidadosamente cada tubo y observar si hay formación de gas en la campana, además de un cambio de color de rojo a amarillo.
6. Se tomará como positivo a coliformes totales aquel tubo que presente formación de gas en la campana de fermentación y cambio de color.

NOTA: Todos los tubos deben contener una campana de fermentación.

Prueba confirmativa

1. De cada tubo positivo de prueba presuntiva, tomar 2 o 3 asadas y transferirlas a 4 tubos de Caldo Lactosado Bilis Verde Brillante (CLBVB) al 2% con campana de fermentación.
2. Incubar dos de esos tubos a 45 ± 0.5 °C y los dos restantes a 37 ± 0.5 °C durante 48 horas. Solamente cuando todos los tubos presenten cambios de color o formación de gas (a ambas temperaturas), se indicará la presencia de coliformes fecales.
3. Realizar identificación con pruebas bioquímicas y medios selectivos.

Análisis microbiológico con Colilert® y Pseudoalert®

1. Añadir 10 mL de muestra a una botella de dilución con 90 mL de solución salina estéril.
2. Agregar el contenido de un blíster de **Colilert®** o **Pseudoalert®** a la botella de dilución y homogeneizar.
3. Incubar a 35 ± 0.5 °C de 18 a 24 horas.
4. Observar si hay cambio de color. Considerar la prueba positiva si al irradiar la muestra con luz UV se observa un color azul o verde.

5.3. Determinación de los compuestos bioactivos en las bebidas nutraceuticas

Para determinar que compuestos se produjeron durante las fermentaciones realizadas, las bebidas fueron analizadas por triplicado en un Cromatógrafo de Gases Instrument Control Parameters: modelo 6850 y un Espectrómetro de Masas modelo 5975C, utilizando un estándar de Timol a una concentración de 100 µg/100 ml. Para analizar cada bebida (1-3), Árnica + Cardamomo, Cúrcuma + Cardamomo y Menta + Cardamomo, se llevó a cabo una extracción usando 1 ml de Cloroformo por 2 ml de muestra (1:2).

5.4. Evaluación sensorial. Las bebidas (1-3) se evaluaron utilizándose como parámetro de respuesta una escala hedónica estructurada con 7 puntos, los cuales se muestra en la **Tabla 9** (Surco y Alvarado, 2011). La escala de calificación fue de 1-7, donde la máxima puntuación fué 7 me gusta mucho, 6 me gusta moderadamente 5 me gusta poco, 4 no me gusta ni me disgusta, 3 me disgusta

poco, 2 me disgusta moderadamente y la mínima 1 me disgusta mucho, el análisis sensorial se llevó a cabo con 50 panelistas no entrenados entre 20 y 50 años de edad (hombres y mujeres). El cuestionario aplicado se presenta en la **Tabla 6**.

Finalmente, se realizó un análisis microbiológico para determinar el tipo de microorganismos que conforman el hongo Kombucha (bacterias y levaduras), y se realizó un estudio bibliográfico comparativo del tipo de microorganismos presentes en México y con lo reportado en otros países.

Para la caracterización de las bacterias y levaduras del hongo Kombucha usado en éste trabajo de investigación se llevaron a cabo las siguientes metodologías.

5.5. Aislamiento e identificación de bacterias y levaduras en hongo Kombucha

1. Tomar 0.2 g del consorcio y colocarlo en un tubo con 5 mL de caldo nutritivo. Dejar 24 horas a temperatura ambiente (Muestra A).
2. Preparar los siguientes medios y servir en cajas Petri de 90 x 15 mm:
 - Agar Dextrosa Sabouraud (SDA).
 - Agar McConkey (AMC)
 - Agar Sales Manitol (ASM)
 - Agar Soya Trypticase (AST)
3. Sembrar por sembrado masivo dos cajas de cada medio e incubar una caja de cada medio a $28 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y la otra a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.
4. Aislar las colonias obtenidas en las cajas Petri por el método de estría americana en los medios AST, ASM, AMC, SDA por duplicado. Incubar a $28 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ o a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, según sea el caso.
5. Comprobar que las colonias estén aisladas determinando la morfología macroscópica de cada una.
6. Realizar pruebas bioquímicas primarias (catalasa, oxidasa y O/F) y secundarias (SIM, MR-VP, Nitratos y Gelatina) a las colonias puras obtenidas.

Tabla 6. Encuesta realizada para la evaluación sensorial por medio de una escala Hedónica.

Calificación	Nivel de agrado	Textura	Color y apariencia	Olor	Sabor	Sensación en la boca	Aceptabilidad general
(7)	Me gusta mucho						
(6)	Me gusta moderadamente						
(5)	Me gusta poco						
(4)	No me gusta ni me disgusta						
(3)	Me disgusta poco						
(2)	Me disgusta moderadamente						
(1)	Me disgusta mucho						

Por favor responda las siguientes preguntas

¿Qué bebida le gustó más?

¿Qué bebida le gustó menos?

¿Compraría las bebidas que degustó?

Sí ()

No ()

¿Por qué?

¿Le cambiaría algo al producto?

Sí ()

No ()

¿Qué? _____ ¿Por qué? _____

Comentarios: _____

¡Muchas Gracias!

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Estandarización y desarrollo de las bebidas fermentadas

Después de varios ensayos, se logró estandarizar tres bebidas nutraceúticas fermentadas, tomando en cuenta el sabor, aroma, sensación en la boca y apariencia de la bebida, determinando las condiciones óptimas de pH y % acidez titulable expresado en ácido acético.

En la **Tabla 2** se muestran las materias primas y porcentajes utilizados en la elaboración de las nuevas bebidas fermentadas. La razón de la elección de las semillas, raíces y hierbas fue la funcionalidad que tendrían sobre nuestras bebidas fermentadas terminadas, con base en los efectos benéficos en la salud del consumidor que producen éstas hierbas, raíces y semillas reportados en la literatura.

El cardamomo tiene propiedades antimicrobianas por la promoción de la acción de péptidos antimicrobianos (que promoverá el fortalecimiento de los intestinos y del estómago); y antioxidantes debido a su contenido de terpenos y flavonoides; también contiene vitaminas como la tiamina, riboflavina y niacina y otros ácidos grasos esenciales, brindando un enriquecimiento adicional a nuestra bebida. Además, mejora el tránsito intestinal (Duke, 1998; Kuklinski, 2000), resultando un efecto potencial para el tratamiento en pacientes con obesidad.

Entre las múltiples propiedades que se le atribuyen a árnica, se reporta que tiene propiedades antiinflamatorias, lo cual resulta una propiedad potencial para utilizarla en el tratamiento de síndrome metabólico. Además tiene un efecto en la regulación de la tensión arterial, tomando en cuenta que la hipertensión es una de las cinco patologías principales asociadas al SM (Font-Quer, 1962; Saury, 2004).

La cúrcuma contiene curcumina, ácido embélico y la capsaicina, los cuales poseen propiedades hipolipidémicas y lipotrópicas (Dixit et al, 1988), que ayudan al tratamiento de la obesidad al disminuir los niveles de grasa en la sangre y favorecen el metabolismo hepático de lípidos, respectivamente. Por otro lado, la menta ayuda al revestimiento del tracto digestivo.

6.2. Microscopía de Barrido

En la **Figura 6** se presenta la morfología del Hongo Kombucha, nótese que el consocio microbiano forma estructuras filamentosas, que son la matriz celulósica en la que están inmersas las bacterias y levaduras que conforman éste consorcio microbiano.

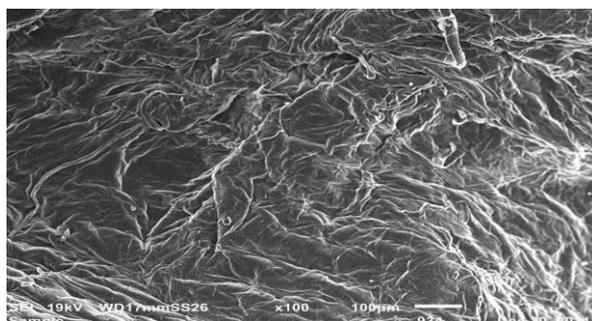


Figura 6. Fotografía del hongo Kombucha tomada por microscopía de barrido, microscopio J EOL JSM- 6010LA, a 19 Kv a una distancia de trabajo de 16 mm y un haz de 26. Barra de 10 μm X 1500 A.

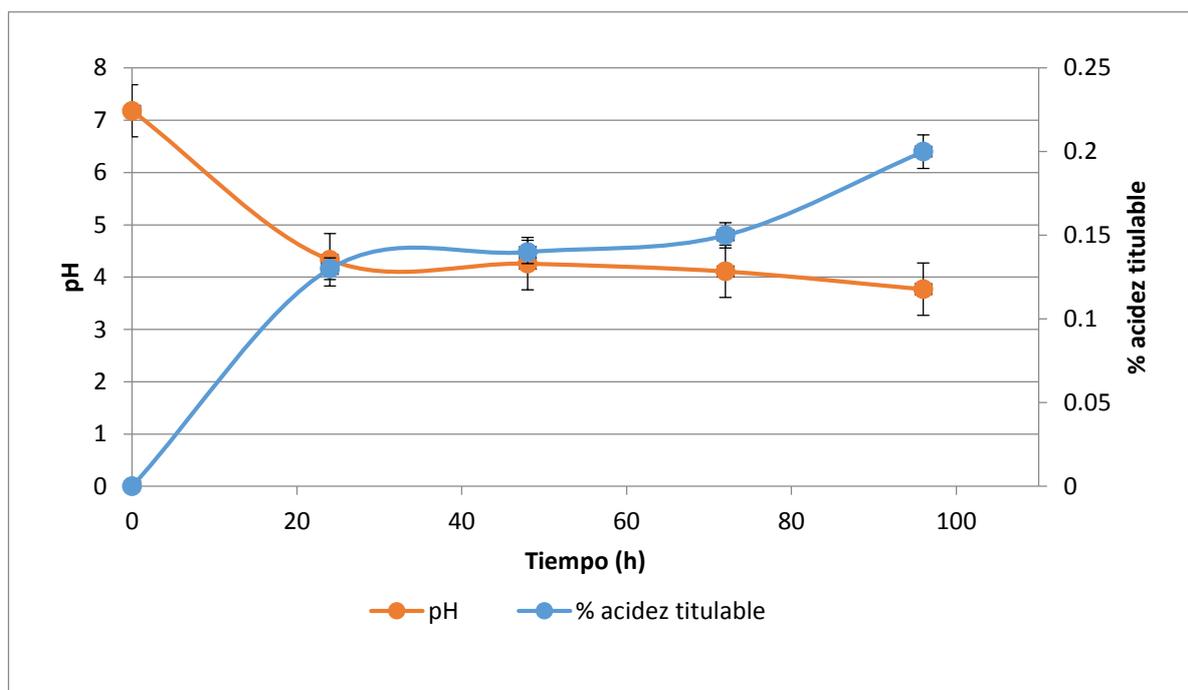
6.3. Cinética de Fermentación

Para determinar la cinética de crecimiento, realizamos ensayos determinando el pH, el porcentaje de acidez titulable expresado en ácido acético, el crecimiento del hongo Kombucha, la actividad probiótica mediante el recuento de BAL, el consumo de sustrato mediante la determinación de la concentración de azúcar residual por el método de fenol-ácido sulfúrico, cuya metodología se señala en el apartado **5.5**.

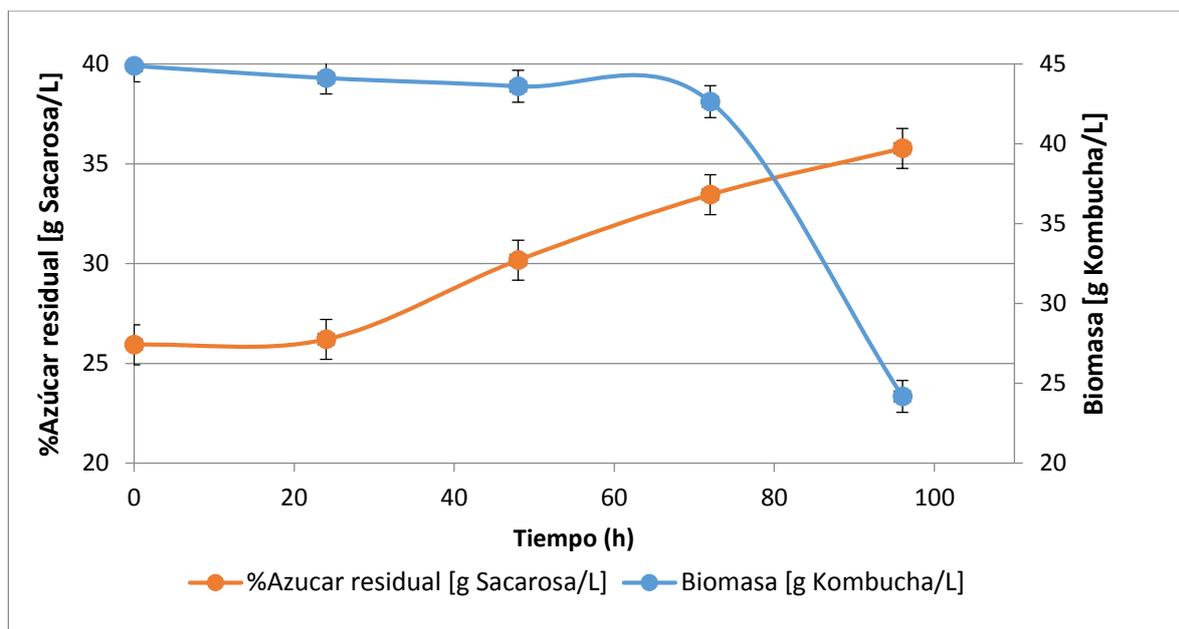
En las **Tablas 7, 8 y 9**, se presentan los valores promedio de pH, acidez titulable (ácido acético), el aumento en la concentración de biomasa (g Kombucha/ L), expresado en base húmeda y azúcar residual a lo largo del tiempo (g sacarosa/ L) \pm error estándar, $n=5$ y el contenido calórico para cada: **bebida No. 1** (árnica + cardamomo), **bebida No. 2** (cúrcuma + cardamomo) y para la **bebida No. 3** (menta + cardamomo).

Tabla 7. Fermentación a partir de Kombucha para la **bebida 1** (árnica + cúrcuma), valores promedio de pH, % acidez titulable, biomasa y azúcar residual a lo largo del tiempo \pm Error estándar, n=5.

Tiempo (h)	pH	% acidez titulable (ácido acético)	Biomasa [g Kombucha/L]	Azúcar residual Sacarosa [g/L]
0	7.18 \pm 0	0.000	25.94 \pm 0.00	44.88 \pm 0.01
24	4.33 \pm 0.01	0.13 \pm 0.06	26.21 \pm 0.02	44.12 \pm 0.08
48	4.26 \pm 0.03	0.14 \pm 0.01	30.18 \pm 0.01	43.6 \pm 0.03
72	4.11 \pm 0.00	0.15 \pm 0.01	33.46 \pm 0.04	42.64 \pm 0.14
96	3.77 \pm 0.01	0.20 \pm 0.01	35.78 \pm 0.24	24.19 \pm 0.01
Contenido calórico: 9.68 cal/100 mL				



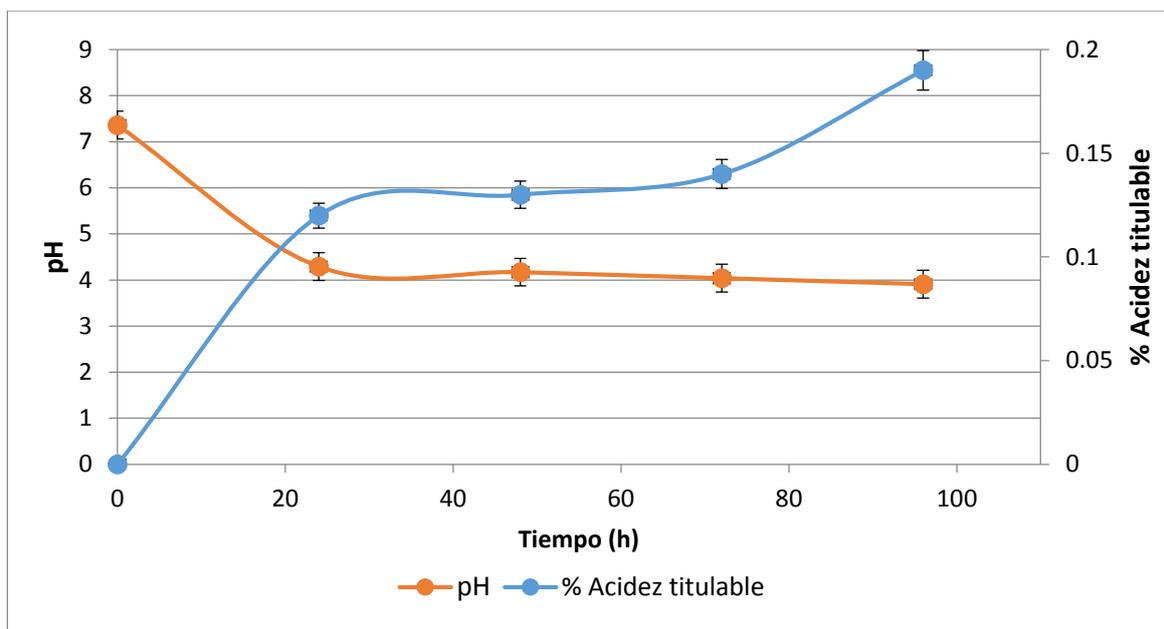
Gráfica 1. Cambios ocurridos en el pH y % acidez titulable a lo largo del tiempo durante la fermentación con Kombucha y BAL (0 a 96 h), para la bebida No. 1 (árnica con cardamomo), n=5



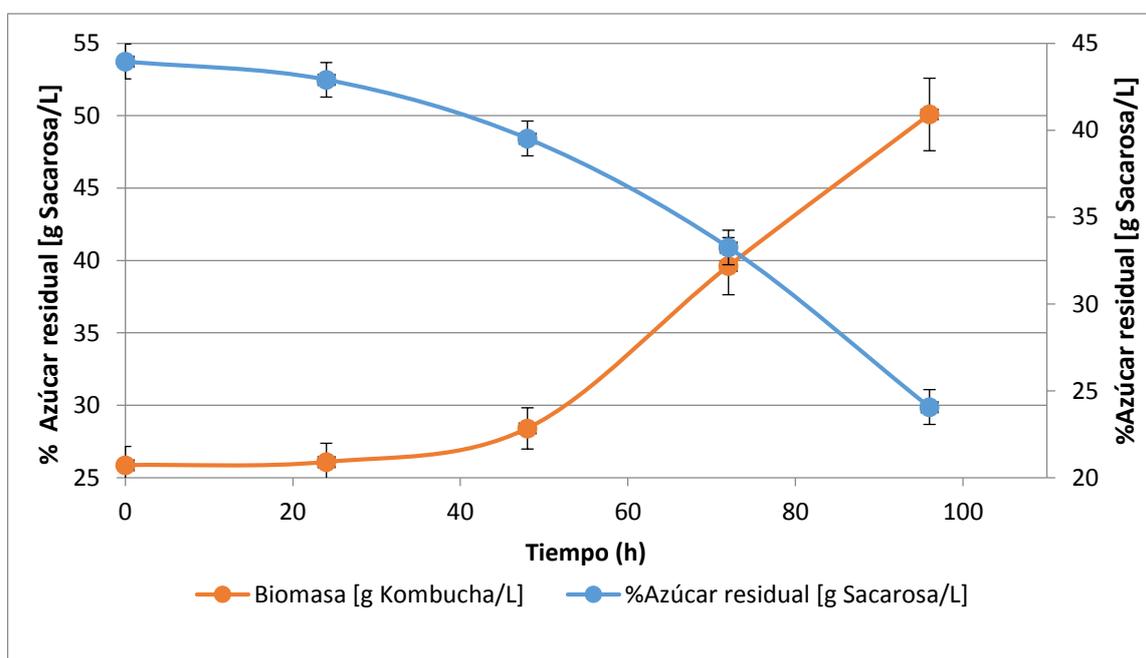
Gráfica 2. Cambios ocurridos en la biomasa (g kombucha/L) y la concentración de azúcar residual (g sacarosa/L, durante la fermentación, para la bebida No. 1 (árnica con cardamomo), n=5.

Tabla 8. Fermentación a partir de Kombucha para la **bebida 2** (cúrcuma con cardamomo), valores promedio de pH, % acidez titulable, biomasa y azúcar residual a lo largo del tiempo \pm Error estándar, n=5.

Tiempo (h)	pH	% acidez (ácido acético)	Biomasa [g Kombucha/L]	Azúcar residual Sacarosa [g/L]
0	7.36 \pm 0.01	0.000	25.86 \pm 0.02	43.95 \pm 0.00
24	4.29 \pm 0.02	0.12 \pm 0.06	26.08 \pm 0.02	42.90 \pm 0.01
48	4.17 \pm 0.02	0.13 \pm 0.01	28.40 \pm .01	39.52 \pm 0.02
72	4.04 \pm 0.01	0.14 \pm 0.0	39.61 \pm 0.01	33.25 \pm 0.16
96	3.91 \pm 0.01	0.19 \pm 0.0	50.09 \pm 0.35	24.06 \pm 0.07
Contenido calórico 9.60 cal/100 mL				



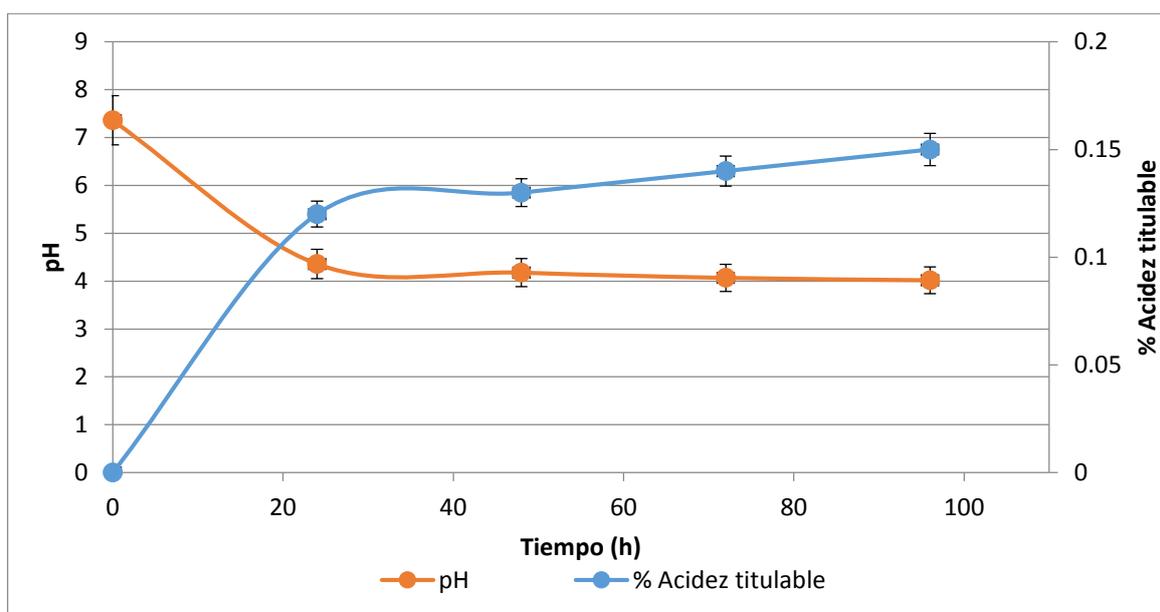
Gráfica 3. Cambios ocurridos en el pH y % acidez titulable a lo largo del tiempo durante la fermentación con Kombucha y BAL (0 a 96 h), para la bebida No. 2 (cúrcuma con cardamomo), n=5.



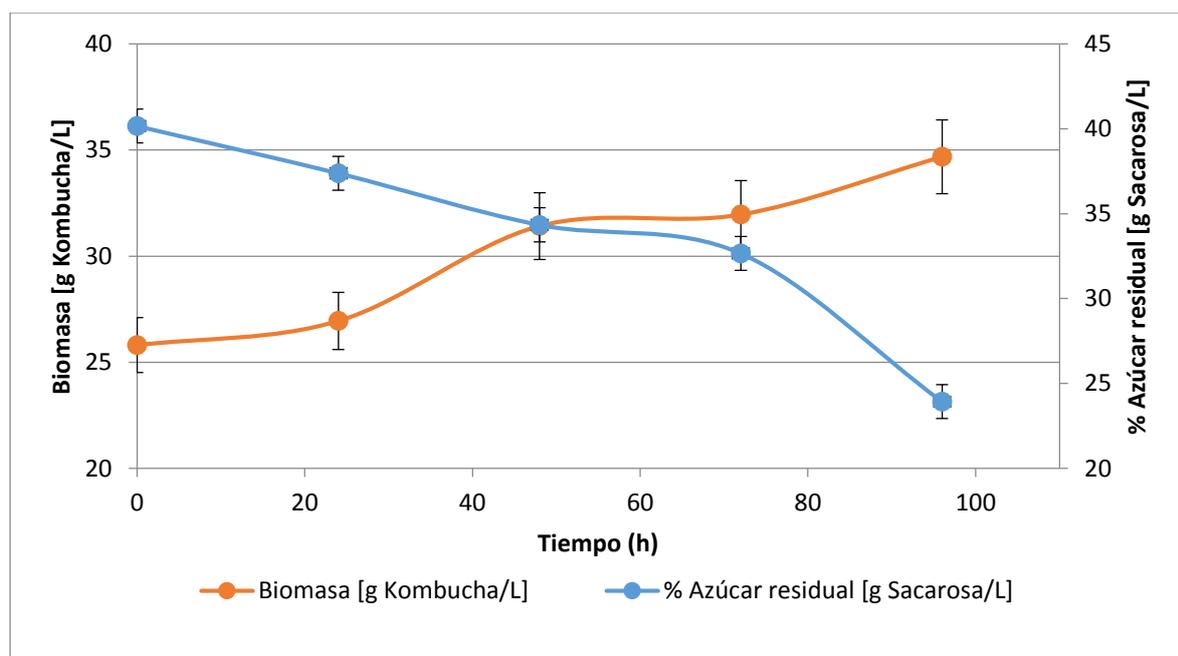
Gráfica 4. Cambios ocurridos en la biomasa (g kombucha/L) y la concentración de azúcar residual (g sacarosa/L, durante la fermentación, para la bebida No.2 (cúrcuma con cardamomo), n=5.

Tabla 9. Fermentación a partir de Kombucha para la **bebida 3** (menta con cardamomo), valores promedio de pH, acidez titulable, biomasa y azúcar residual a lo largo del tiempo \pm Error estándar, n=5.

Tiempo (h)	pH	% acidez titulable (ácido acético)	Biomasa [g Kombucha/L]	Azúcar residual Sacarosa [g/L]
0	7.36 \pm 0	0.000	2.581 \pm 0.00	40.16 \pm 0.01
24	4.36 \pm 0.0152	0.12 \pm 0.01	2.695 \pm 0.06	37.38 \pm 0.05
48	4.18 \pm 0.0152	0.13 \pm 0.01	3.142 \pm 0.03	34.34 \pm 0.05
72	4.07 \pm 0.065	0.14 \pm 0.01	3.196 \pm 0.03	32.66 \pm 0.02
96	4.02 \pm 0.0953	0.15 \pm 0.02	3.468 \pm 0.04	23.93 \pm 0.01
Contenido calórico 9.56 cal/100 mL				



Gráfica 5. Cambios ocurridos en el pH y % acidez titulable a lo largo del tiempo durante la fermentación con Kombucha y BAL (0 a 96 h), para la bebida No. 3 (menta con cardamomo), n=5.



Gráfica 6. Cambios ocurridos en la biomasa (g kombucha/L) y la concentración de azúcar residual (g sacarosa/L, durante la fermentación, para la bebida No. 3 (menta con cardamomo), n=5.

Los resultados de las **Tablas 7, 8 y 9** indican que a medida que transcurre el tiempo la concentración de biomasa celular se incrementa en todas las bebidas, mientras que la concentración de sustrato residual disminuye [g sacarosa/L] (**Gráficos 2, 4, 6**), esto es lógico ya que durante el crecimiento celular Kombucha utiliza como fuente de carbono y energía a la sacarosa. Nótese que el pH disminuye y la acidez titulable expresada como ácido acético, éste se incrementa a lo largo del tiempo en todas las bebidas (**Gráficos 1, 3, 5**), estos resultados pueden explicarse debido a que durante ésta fermentación se producen diversos ácidos orgánicos: acético principalmente, láctico, tartárico, málico y en menor cantidad cítrico, los cuales le dan a la bebida un sabor áspero y astringente.

En las Tablas **Tablas 7, 8 y 9** también se muestra el contenido calórico de las bebidas desarrolladas que fue determinada a las bebidas finales, (9.68 cal/100 mL para la bebida No. 1, 9.60 cal/100 mL para la bebida No. 2 y 9.56 cal/100 mL para la bebida No. 3), nótese que las bebidas elaboradas en este proyecto de investigación se caracterizan por su bajo contenido calórico ya que la Organización Mundial de la Salud (OMS) establece que la cantidad máxima ideal de azúcar añadida a las bebidas, no debe ser mayor a 100 calorías. Reportes emitidos por

(PROFECO, 2014) indican que las bebidas azucaradas consumidas con mayor frecuencia en México como el té helado, refrescos y jugos comerciales tienen un contenido de azúcar que rebasa en un 200% la cantidad de azúcar recomendada por la OMS.

Considerando lo sugeridos por la OMS, las bebidas elaboradas en este proyecto son una alternativa para emplearse como bebida refrescantes por su bajo contenido en azúcar y por ende su bajo contenido calórico.

Es importante resaltar que al añadir las BAL la acidez titulable expresada como ácido acético disminuye, esto es debido a que existe un crecimiento de BAL y se produce ácido láctico, el cuál al incrementarse disminuye la concentración de ácido acético; este hecho es de suma importancia dado que al disminuir el ácido acético la bebida es menos áspera y astringente, y por la formación de compuestos aromáticos como el diacetilo y acetaldehído, le dan al producto final un sabor y aroma muy agradables; de igual manera, se elimina el sabor amargo y astringente del ácido málico y cítrico.

El contenido de BAL en las bebidas refrescantes actúa en conjunto con el contenido de prebióticos (fibra de soya) añadidos a la bebida, estimulando el crecimiento de la microbiota gastrointestinal, lo que protegerá al organismo ante la invasión de gérmenes patógenos (efecto barrera), inducirá la producción de AGCC (actividad realizada en conjunto con los prebióticos añadidos a la bebida). Otra de las funciones de la microbiota gastrointestinal es promover la síntesis de vitamina K e intervenir en procesos relacionados con la absorción del calcio, magnesio y hierro (Sastre, 2003). Además, estudios confirman que *Lactobacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.* ayudan a reducir la absorción de colesterol, mientras que *Lactobacillus Rhamnosus*, y *Lactobacillus Lactis* tienen efectos positivos ante la hipertensión. El cultivo liofilizado de BAL empleado para realizar el preinóculo añadido a las bebidas cuenta con *Lactobacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.*

Por otro lado, el comité de expertos de la FAO y la OMS, recomienda una ingesta de 25 gramos de fibra dietética al día. En México, los adultos consumen entre 16 y 18 gramos de fibra al día, una cantidad mucho menor a la recomendada. Si se

consumieran 600 ml de alguna de nuestras bebidas (**1, 2 y 3**), que es la presentación convencional más pequeña de la mayoría de las bebidas refrescantes, se estaría consumiendo alrededor del 50% de la cantidad de fibra dietética diaria recomendada por la FAO y la OMS, la cual que podría complementarse al ingerir vegetales y frutas en la dieta diaria, cubriendo los 25 g/día recomendados por la OMS.

También se le añadió ácido fólico al 0.001% para enriquecer la bebida. El ácido fólico participa en la síntesis de nucleótidos purínicos y pirimidínicos, y en la metilación de homocisteína donde se obtiene metionina (Rodríguez, 1998). La deficiencia de ácido fólico eleva los niveles de homocisteína en el organismo, lo que puede derivar en el desarrollo de enfermedades neurológicas y cardiovasculares como Alzheimer y demencia. Además, los niveles altos de homocisteína son un factor de riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, como el aumento de colesterol, hipertensión arterial y diabetes. La ingesta recomendada de folato dietético en los adultos es de 400 µg/día. En el embarazo y la lactancia se recomienda un aporte de 600 y 500 µg/día, respectivamente, y en la infancia entre 150 y 300 µg/día (Rosa & Pintó, 2003). Nuestra bebida cubre la dosis de ácido fólico recomendada diariamente, aunque se consumiera una cantidad mínima de 100 ml.

6.4. Determinación de la actividad probiótica en las bebidas

Tabla 10. Recuento de bacterias lácticas (UFC/ml) durante la vida de anaquel del producto (1, 2, 3, 4 semanas).				
Bebida desarrollada	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Bebida 1 Cardamomo + Árnica	> 300 UFC/Placa	$4 \times 10^{12} \pm 2 \times 10^{12}$	$8 \times 10^{11} \pm 3 \times 10^{11}$	$7 \times 10^9 \pm 2 \times 10^9$
Bebida 2 Cardamomo + Cúrcuma	> 300 UFC/Placa	$5 \times 10^{10} \pm 1 \times 10^{10}$	$7 \times 10^9 \pm 2 \times 10^9$	$2 \times 10^8 \pm 5 \times 10^7$
Bebida 3 Cardamomo + Menta	> 300 UFC/Placa	$6 \times 10^{12} \pm 1 \times 10^{12}$	$2 \times 10^{11} \pm 1 \times 10^{10}$	$2 \times 10^9 \pm 2 \times 10^8$

Todas las bebidas presentaron una cantidad incontable de colonias hasta la dilución de 10^{-12} . Durante la segunda semana, la cantidad de UFC/ml de BAL fue contable

dando valores de 1×10^{12} a 6×10^{12} , los resultados variaron en las tres bebidas. En la semana 3 puede notarse un decaimiento en la cantidad de UFC/ml de BAL, con valores de 5×10^9 a 1×10^{12} para las bebidas **1**, **2** y **3**. Finalmente, en la semana 4 podemos notar que la bebida **1** los valores de UFC/ml de BAL van de 5×10^9 a 1×10^{10} UFC/ml, la bebida **2** presenta un valor de mínimo de 2×10^8 hasta 1×10^8 . Para el caso de la bebida **3** tenemos como resultado de 1×10^8 a 5×10^9 (**Tabla 10**).

Considerando los valores registrados en el recuento de BAL, los resultados indican que a pesar de que el contenido de BAL disminuyen a los largo de tiempo, nuestras bebidas conservan su actividad probióticas durante un mes de almacenamiento ya que considerando que para que un producto pueda ofrecerse como tal debe contener una cantidad mínima de 1×10^8 UFC/ml de BAL.

Esto también nos puede indicar que la vida de anaquel de nuestro producto es de 4 semanas en condiciones de refrigeración ($4-5^\circ\text{C}$) debido a la disminución de BAL. La inoculación de BAL tuvo un efecto benéfico en la vida de anaquel, debido a que éstas inhiben el crecimiento de coliformes totales, siendo en este grupo de microorganismos un indicador de la calidad microbiológica. El ácido láctico producido durante la fermentación tiene propiedades antimicrobianas por lo que pudiera estar inhibiendo el crecimiento de coliformes. (Helander Von Wright y Mattila-Sandholm, 1997).

6.5. Resultados de análisis microbiológicos

Se realizaron los análisis microbiológicos de las bebidas (**1**, **2** y **3**), éste se hizo por triplicado para cada una. Los análisis microbiológicos que se llevaron a cabo son los establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos (Consulta febrero 8, 2018). Los resultados obtenidos indicarán que para la prueba presuntiva se obtuvo un índice del NMP/100 ml igual a cero lo cual es logico por el pH que tienen las bebidas. Esto indica que las bebidas elaboradas son inocuas y aptas para el consumo humano (los resultados no son mostrados).

Así mismo las pruebas rápidas Colilert® y Pseudoalert®, resultaron negativas, para las tres bebidas desarrolladas (**Tabla 11**), la las pruebas rápidas Colilert® confirma los resultados presentados arriba.

Tabla 11. Resultados de pruebas confirmativas del NMP.			
	Bebida 1 Árnica + Cardamomo	Bebida 2 Cúrcuma + Cardamomo	Bebida 3 Menta + Cardamomo
Pseudoalert®	Negativa	Negativa	Negativa
Colilert®	Negativa	Negativa	Negativa

6.6. Análisis de muestras por Cromatografía de Gases

En la **Tabla 12**, se muestran los valores promedio de las concentración de los compuestos identificados en cada bebida (**1-3**), formuladas a diferentes tiempos: inicial o blanco, al término de la fermentación realizada por Kombucha y de la bebida final adicional de BAL, expresados en $\mu\text{g}/100\text{ mL}$, en las tres bebidas, estos resultados fueron tomados de los cromatogramas **1** al **27**. Así mismo, se puede observar el área bajo la curva (**Corr área**) de cada compuesto identificado (indica la concentración de compuesto formado) y el tiempo de retención, indica el compuesto formado en cada fermentación, tiempos de retención iguales indica compuestos iguales.

Tabla 12. Concentraciones en $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ de los compuestos identificados en las bebidas (1-3) cardamomo + árnica, cardamomo + cúrcuma y cardamomo + menta, analizadas por triplicado en el cromatógrafo de gases.

Muestra	Compuesto	Corr área	Concentración del compuesto identificado ($\mu\text{g}/100\text{ mL}$)	PROMEDIO Concentración del compuesto identificado ($\mu\text{g}/100\text{ mL}$)
Blanco de Árnica con Cardamomo (ACBL).	Eucaliptol	1375437	18.5338	9.3509
		48601	0.6843	
		71871	0.9684	
	α -terpineol	929716	12.5278	6.3087
		7685	0.1035	
467155		6.2948		
Fermentación Acética de Árnica con Cardamomo (ACFA).	Eucaliptol	232151	3.1282	1.3843
		46887	0.6317	
		29165	0.3929	
	α -terpineol	833405	11.2300	5.6829
		59086	0.7961	
372752		5.0227		
Fermentación Láctica de Árnica con Cardamomo (ACFL).	Eucaliptol	136723	1.8423	0.9225
		50787	0.6548	
		20069	0.2704	
	α -terpineol	696151	9.3805	4,7421
		217006	2.9241	
142627		1.9218		
Blanco de Cúrcuma con Cardamomo (CCBL)	Eucaliptol	953971	12.8546	12.8110
		410074	5.5257	
		534188	7.1981	
	α -terpineol	2626464	35.3913	25.6347
		1050876	14.1604	
2029871		27.3523		
Fermentación acética de Cúrcuma con Cardamomo (CCFA)	Eucaliptol	NP	NP	NP
		NP	NP	
		NP	NP	
	α -terpineol	1028948	13.8649	16.8361
		734041	19.8911	
1243235		16.7524		
Fermentación Láctica de Cúrcuma con Cardamomo (CCFL).	Eucaliptol	NP	NP	NP
		NP	NP	
		NP	NP	
	α -terpineol	1111012	14.9707	13.9698
		999794	13.4694	
999593		13.4694		
Blanco de Menta con Cardamomo (MCBL).	Eucaliptol	425160	5.7289	5.0846
		315094	4.2458	
		391780	5.2792	
	α -terpineol	1744104	23.5016	24.9250
		1713259	23.0860	
2091853		28.1875		
Fermentación Acética de Menta con Cardamomo (MCFA).	Eucaliptol	NP	NP	NP
		NP	NP	
		NP	NP	
	α -terpineol	1285052	17.3159	18.9579
		1360078	18.3269	
1575586		21.2308		

Fermentación Láctica de Menta con Cardamomo (MCFL).	Eucaliptol	NP	NP	NP
		NP	NP	
		NP	NP	
	α -terpineol	1093702	14.7375	11.1696
		733791	9.8877	
		659273	8.8836	

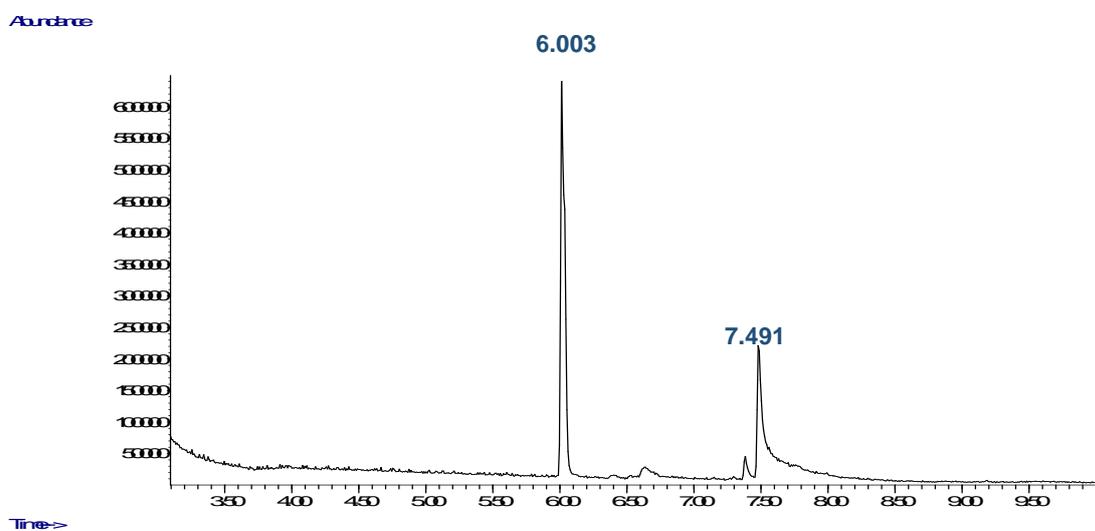
NP: No se presentó el compuesto.

Los compuestos identificados en los macerados de las bebidas **1, 2, y 3**, fueron los mismos eucaliptol y α -terpineol (Blanco). Nótese que para bebida No. **1** (árnica + cardamomo), la concentración de ambos compuestos disminuyó durante la primera y segunda fermentación hasta alcanzar un valor de: eucaliptol 0.9225 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ y α -terpineol 4.7421 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$. Estos resultados se pueden ver en los **Cromatogramas 1, 4 y 7** (Blanco), **Cromatogramas 2, 5, y 8** (Primera fermentación) y **Cromatogramas 3, 6, y 9** de la bebida final, con un tiempo de retención de 6.013-6.028 minutos; y para α -terpineol de 7.481-7.489 minutos.

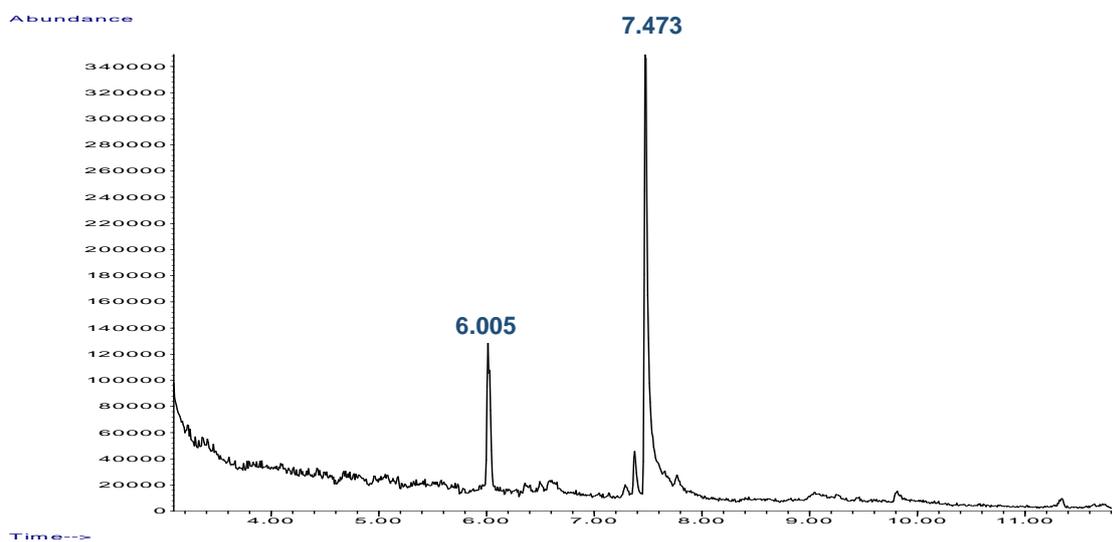
En las bebidas elaboradas a partir cúrcuma con cardamomo (bebida No. **2**) y menta con cardamomo (bebida No. **3**), se observa la presencia de eucaliptol y α -terpineol, en los macerados de las bebidas (**Cromatogramas 10, 13 y 16**, para la bebida No. **2** y **Cromatogramas 19, 22 y 25**, para la bebida No. **3**). El eucaliptol presente en la fermentación fué degradado de 12.8110 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ a NP en la bebida No. **2** y de 5.0846 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ a NP en la bebida No. **3**, razón por la cuál ya no aparece en la fermentación final, cuando se adicionaron las BAL (**Cromatogramas 11, 14 y 17**, para la bebida No. **2** y **Cromatogramas 19, 22 y 25**, para la bebida No. **3**).

En el caso de α -terpineol, como se puede observar éste se encuentra presente en los macerados, y en la fermentación la concentración disminuyó de 25.6345 a 16.8361 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ en la bebida **2** y 24.9250 a 18.9579 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ en la bebida No. **3** (**Cromatogramas 10, 11, 13, 14, 16 y 17** para la bebida No. **2** y **Cromatogramas 19, 20, 22, 23, 25 y 26**, para la bebida No. **3**). En la bebida final adicionada de BAL se puede ver que también hubo una disminución de 16.8361 a 13.9698 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ en la bebida No. **2** y de 18.9579 a 11.1696 para la bebida No. **3**, (**Cromatogramas 12, 15 y 18**, para la bebida No. **2** y **Cromatogramas 21, 24 y 27**, para la bebida No. **3**), esto demuestra la capacidad de los microorganismos,

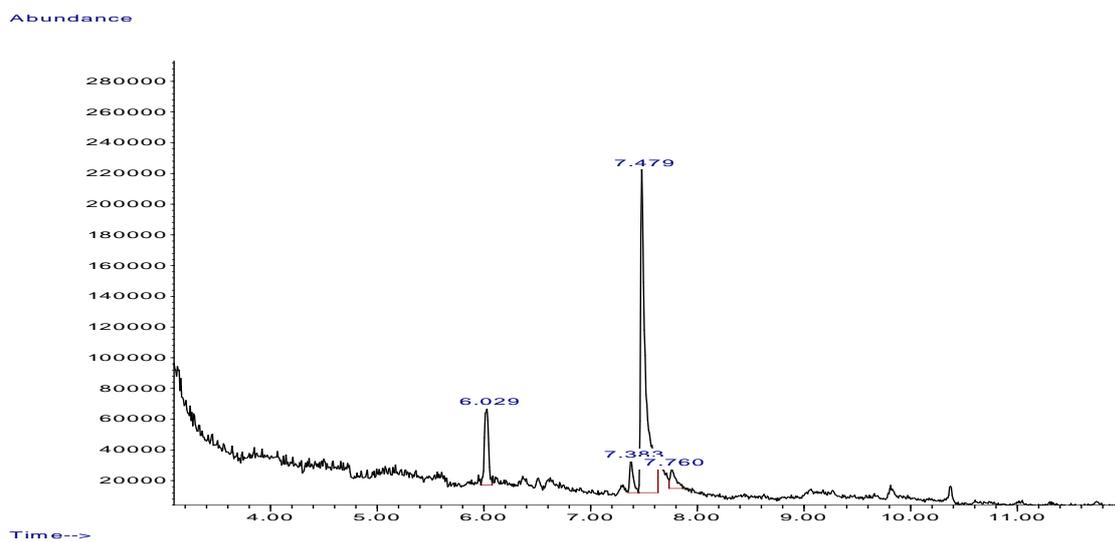
Kombucha y BAL para metabolizar monoterpenos como el eucaliptol y el α -terpineol.



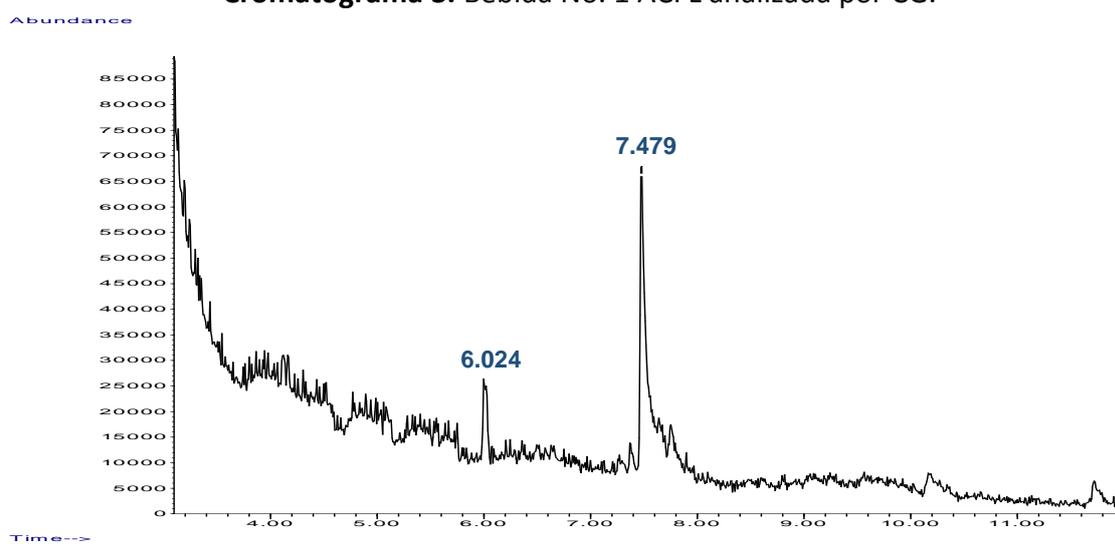
Cromatograma 1. Bebida No. 1 ACBL analizada por CG.



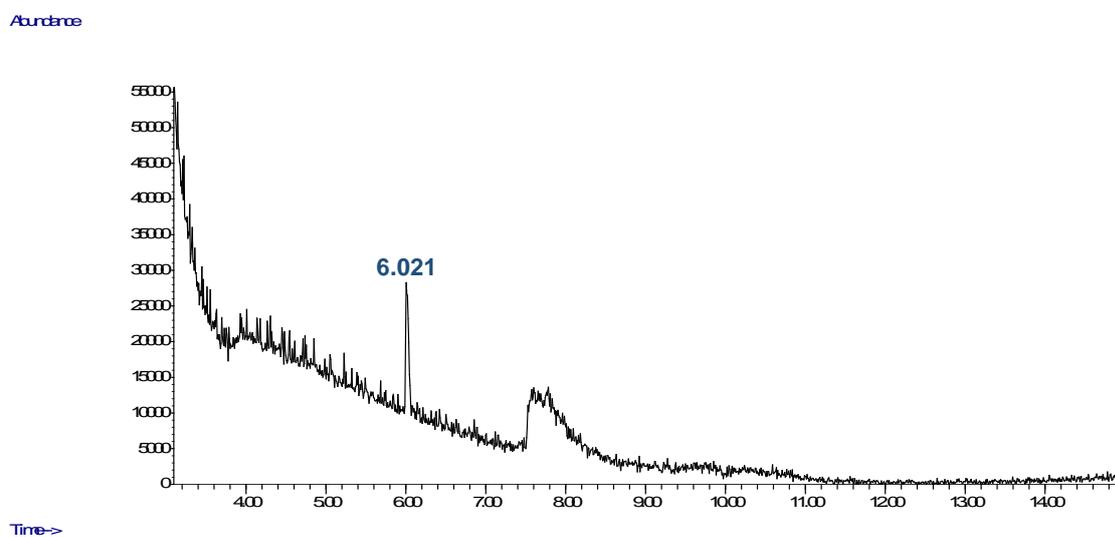
Cromatograma 2. Bebida No. 1 ACFA analizada por CG.



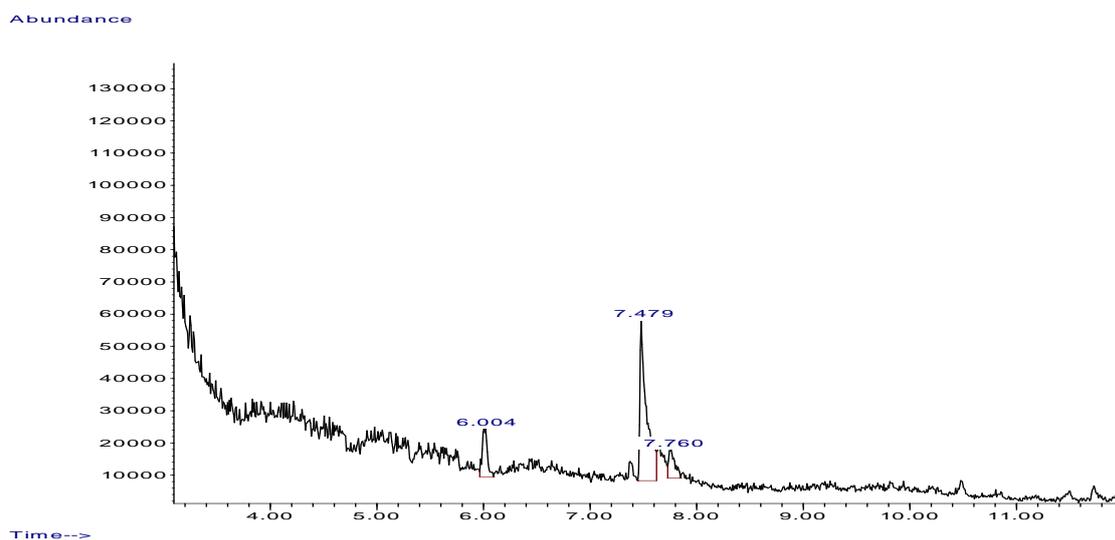
Cromatograma 3. Bebida No. 1 ACFL analizada por CG.



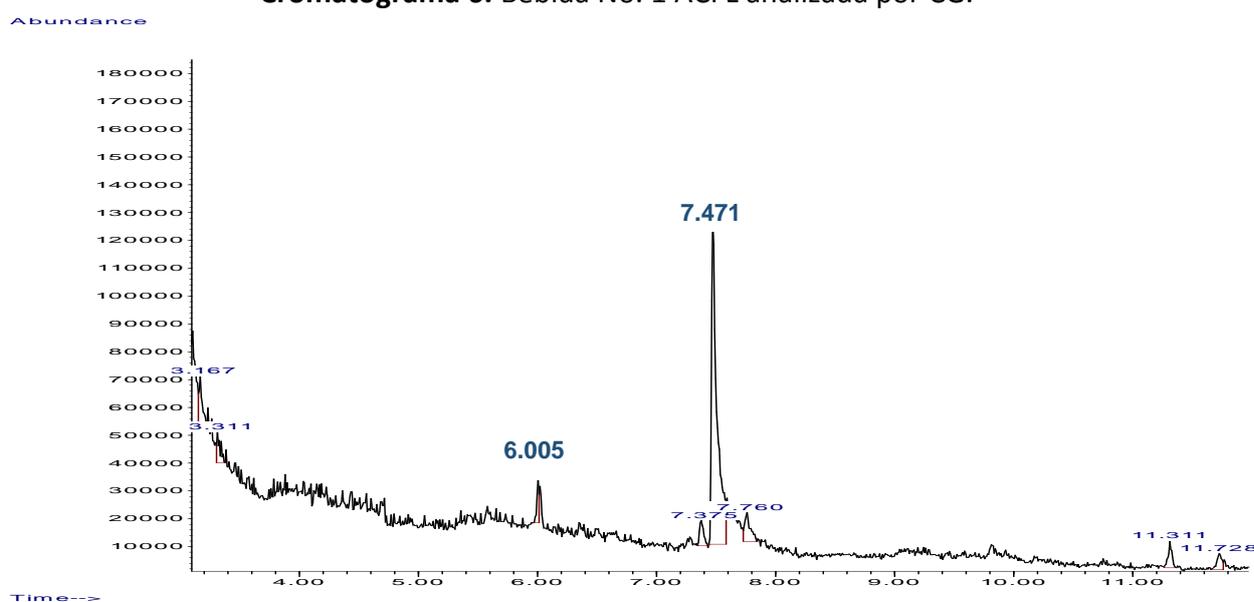
Cromatograma 4. Bebida No. 1 ACBL analizada por CG.



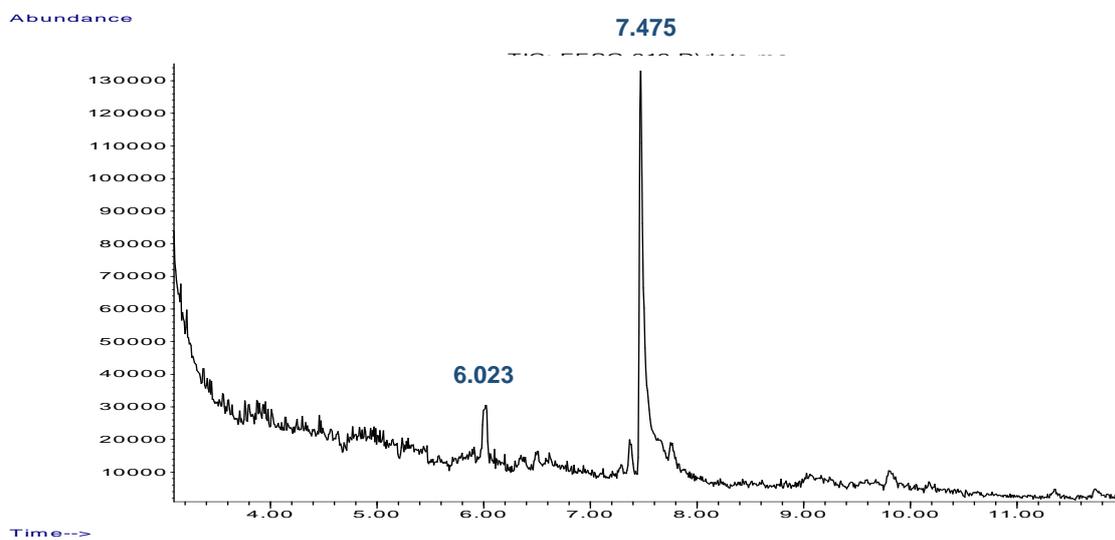
Cromatograma 5. Bebida No. 1 ACFA analizada por CG.



Cromatograma 6. Bebida No. 1 ACFL analizada por CG.

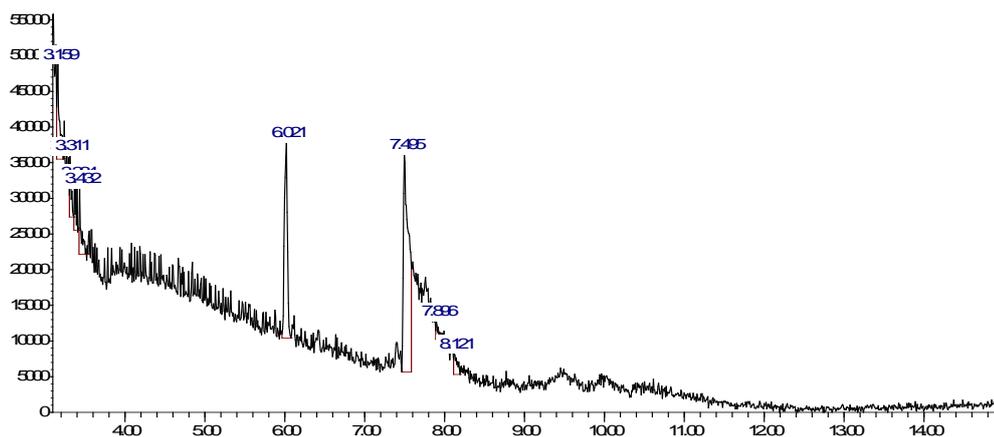


Cromatograma 7. Bebida No. 1 ACBL analizada por CG.



Cromatograma 8. Bebida No. 1 ACFA analizada por CG.

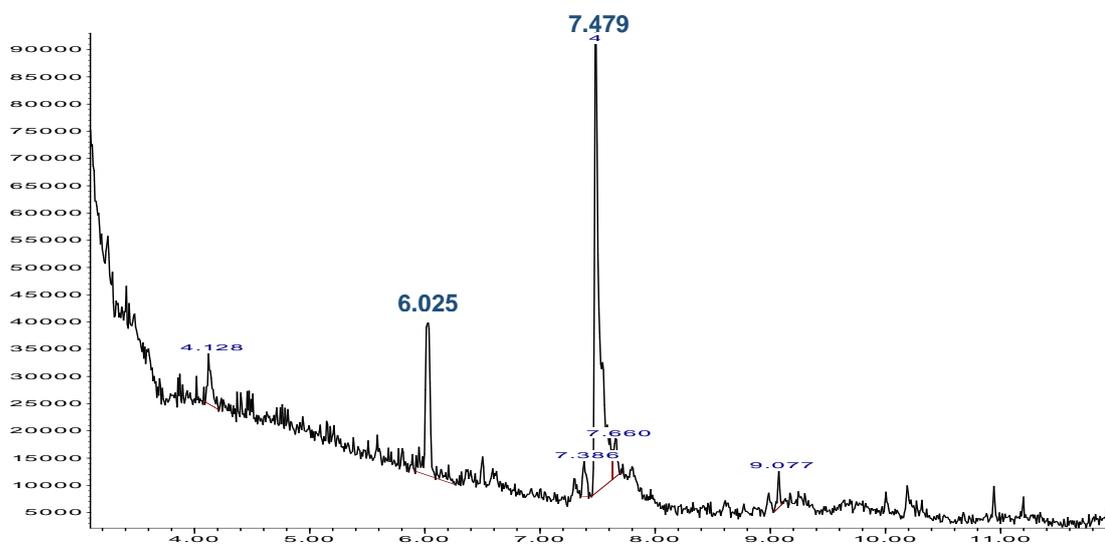
Abundance



Time->

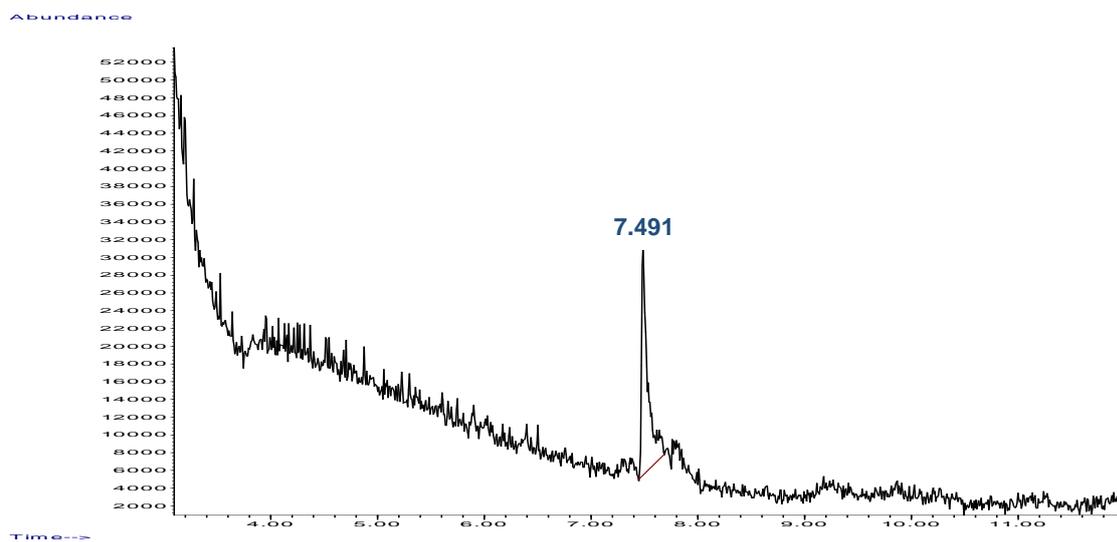
Cromatograma 9. Bebida No. 1 ACFL analizada por CG.

Abundance

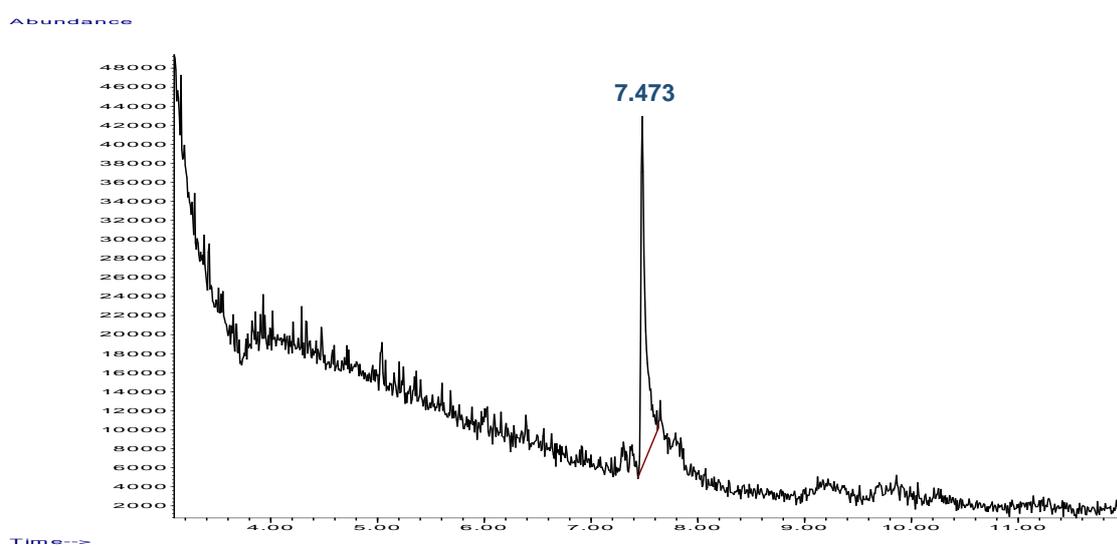


Time-->

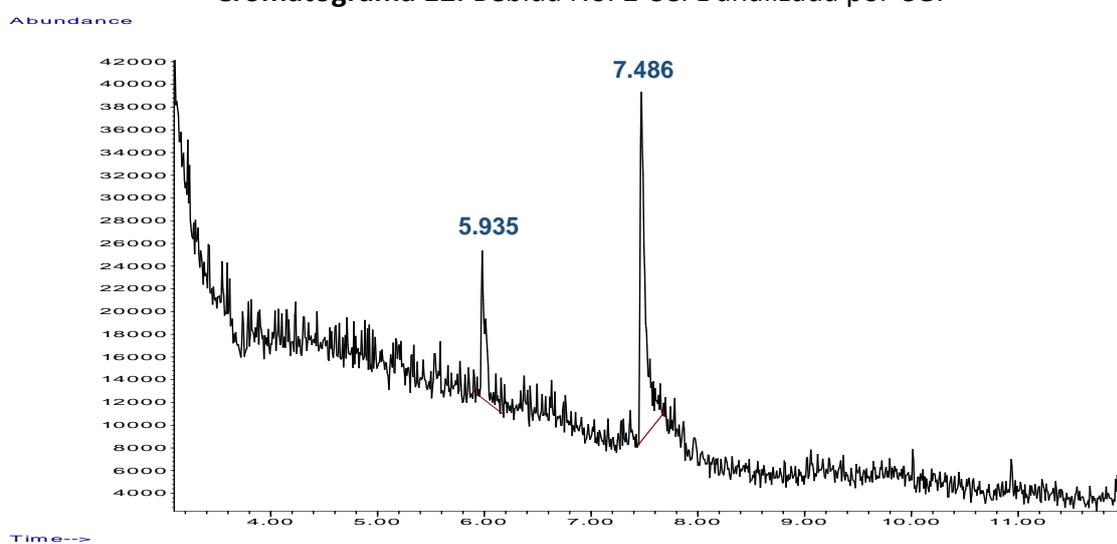
Cromatograma 10. Bebida No. 2 CCBL analizada por CG.



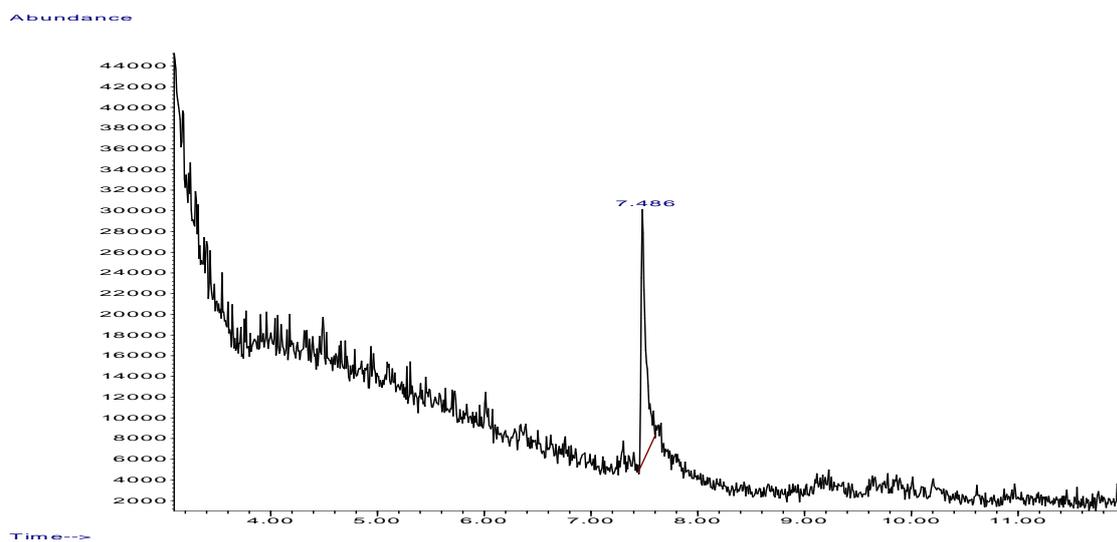
Cromatograma 11. Bebida No. 2 CCFA analizada por CG.



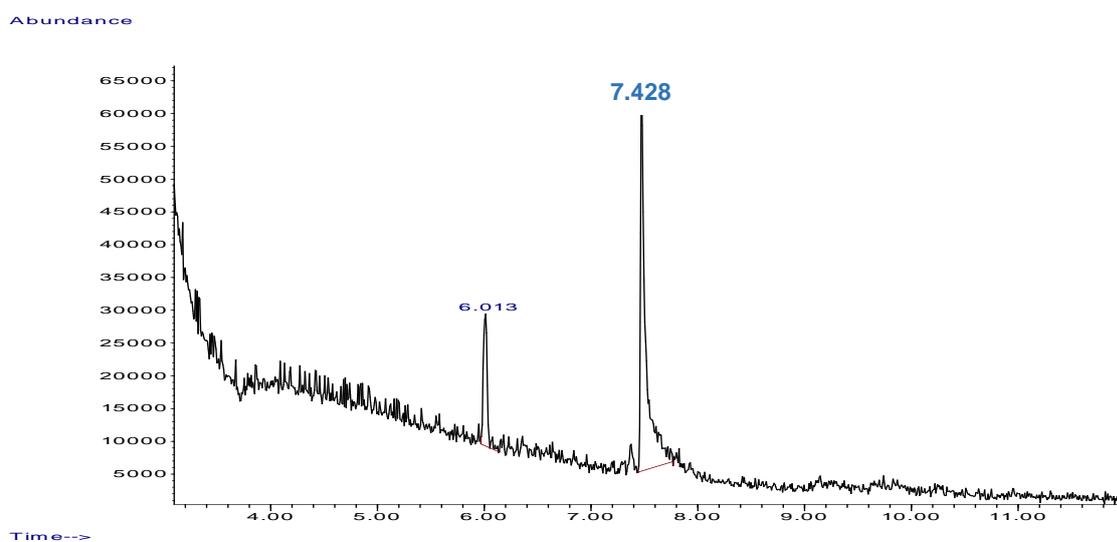
Cromatograma 12. Bebida No. 2 CCFL analizada por CG.



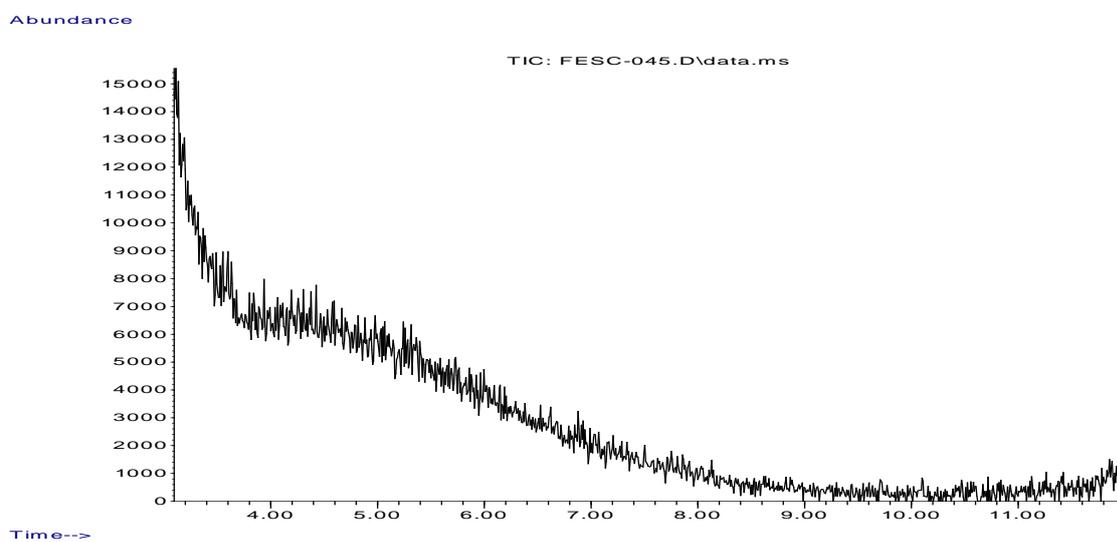
Cromatograma 13. Bebida No. 2 CCBL analizada por CG.



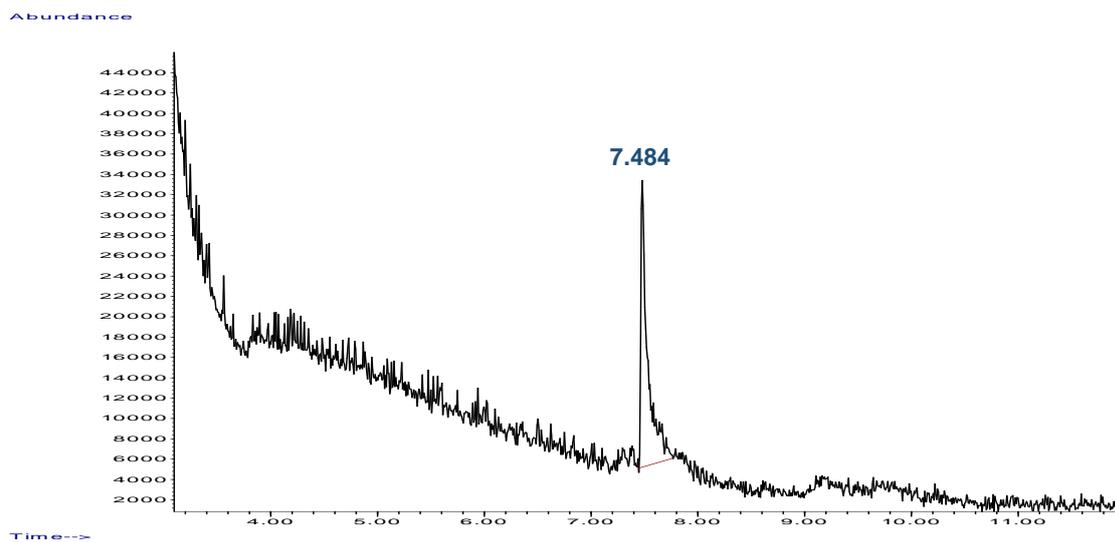
Cromatograma 14. Bebida No. 2 CCFA analizada por CG.



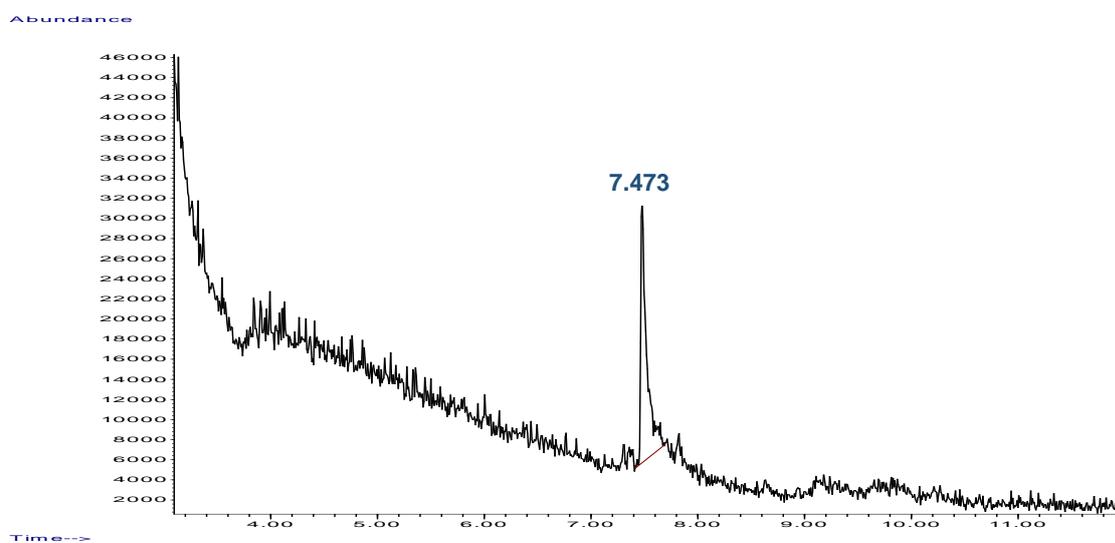
Cromatograma 15. Bebida No. 2 CCFL analizada por CG.



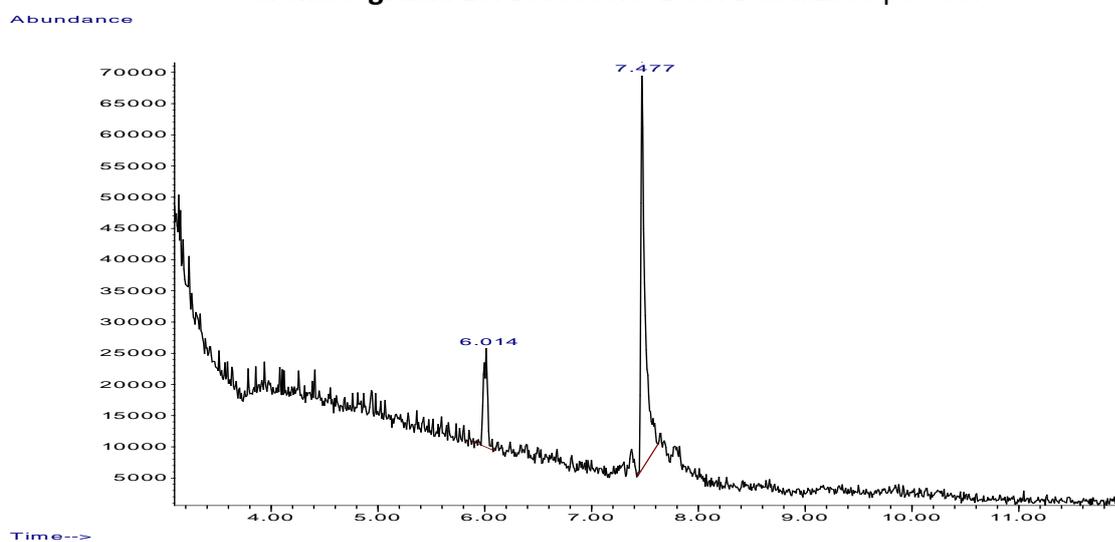
Cromatograma 16. Bebida No. 2 CCBL analizada por CG.



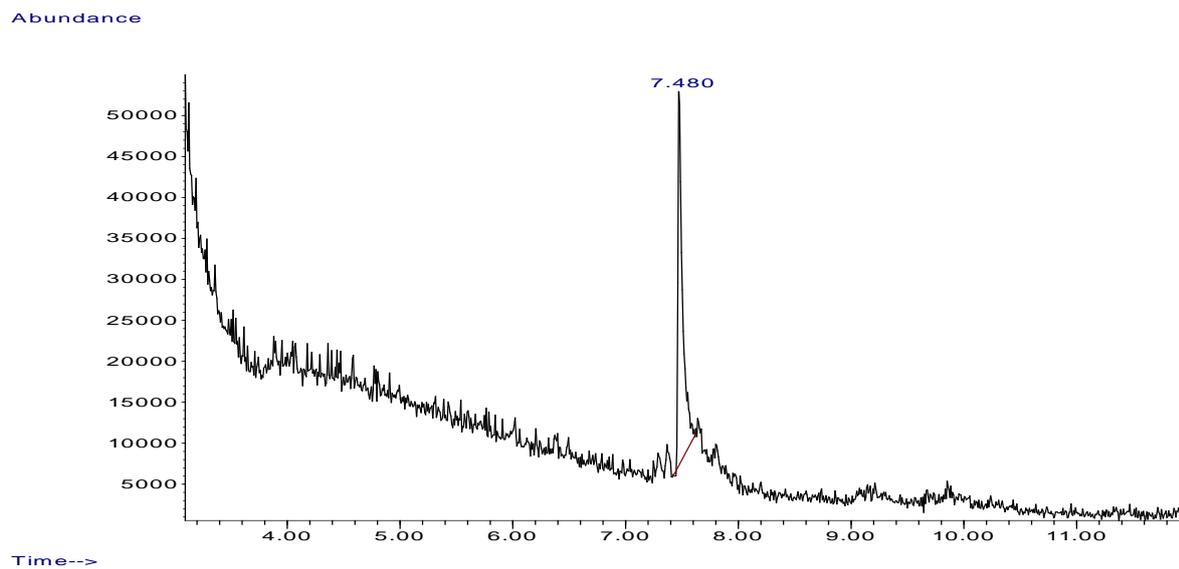
Cromatograma 17. Bebida No. 2 CCFA analizada por CG.



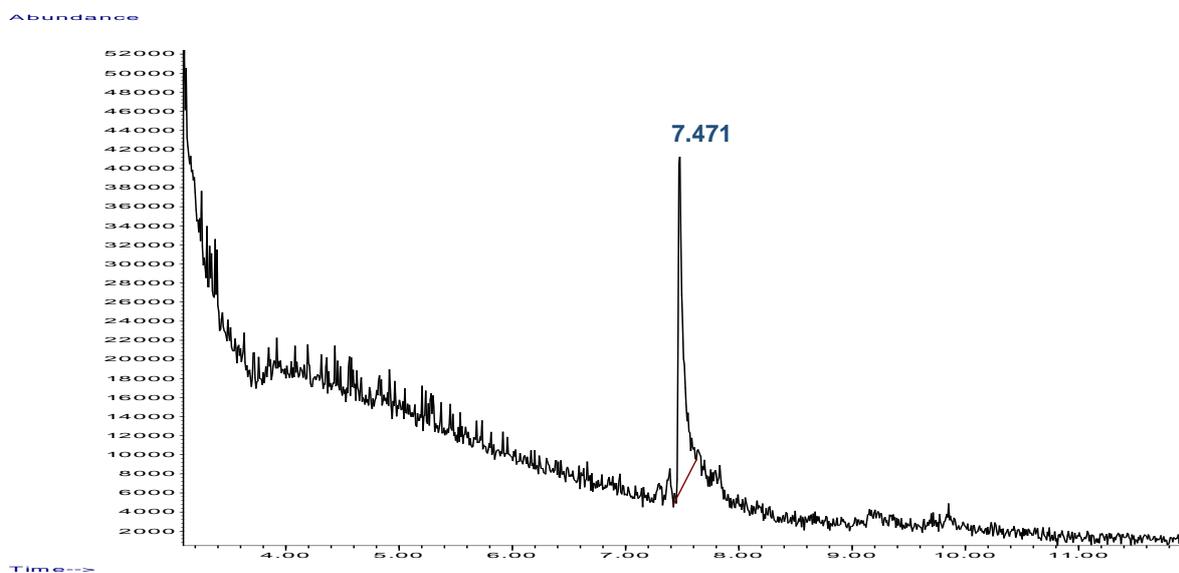
Cromatograma 18. Bebida No. 2 CCFL analizada por CG.



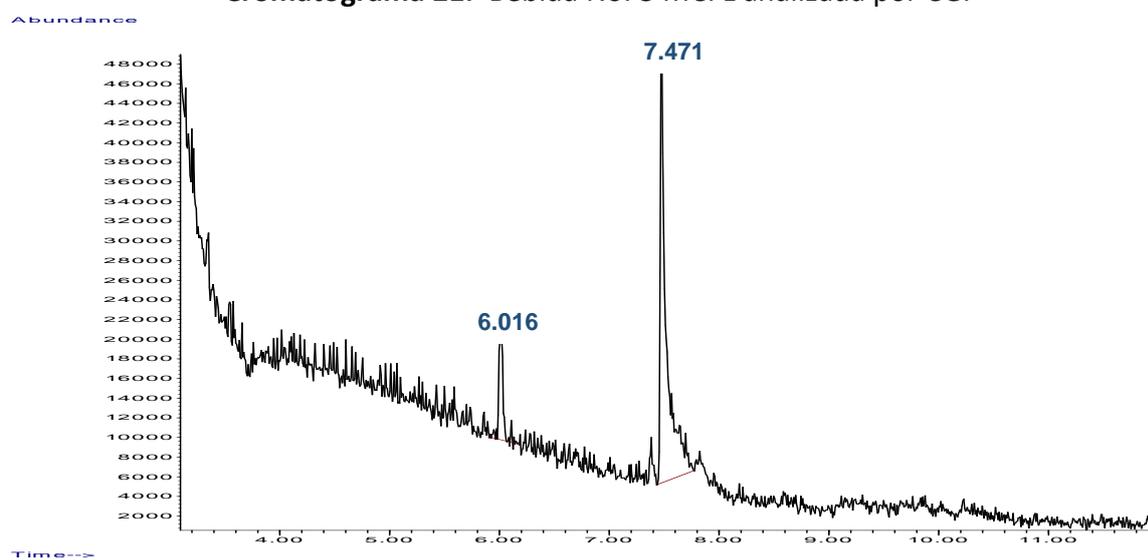
Cromatograma 19. Bebida No. 3 MCBL analizada por CG.



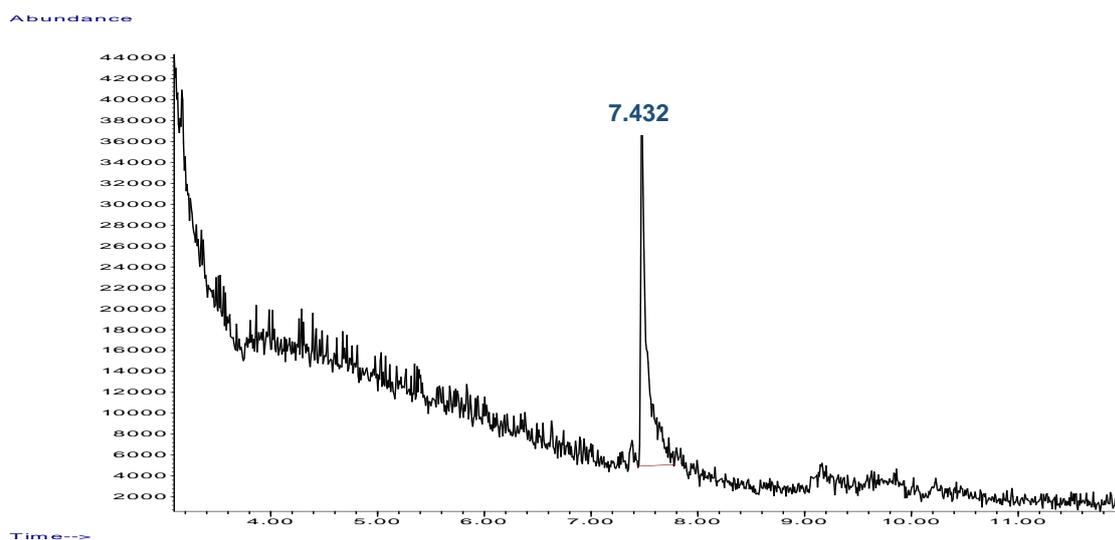
Cromatograma 20. Bebida No. 3 MCFA analizada por CG.



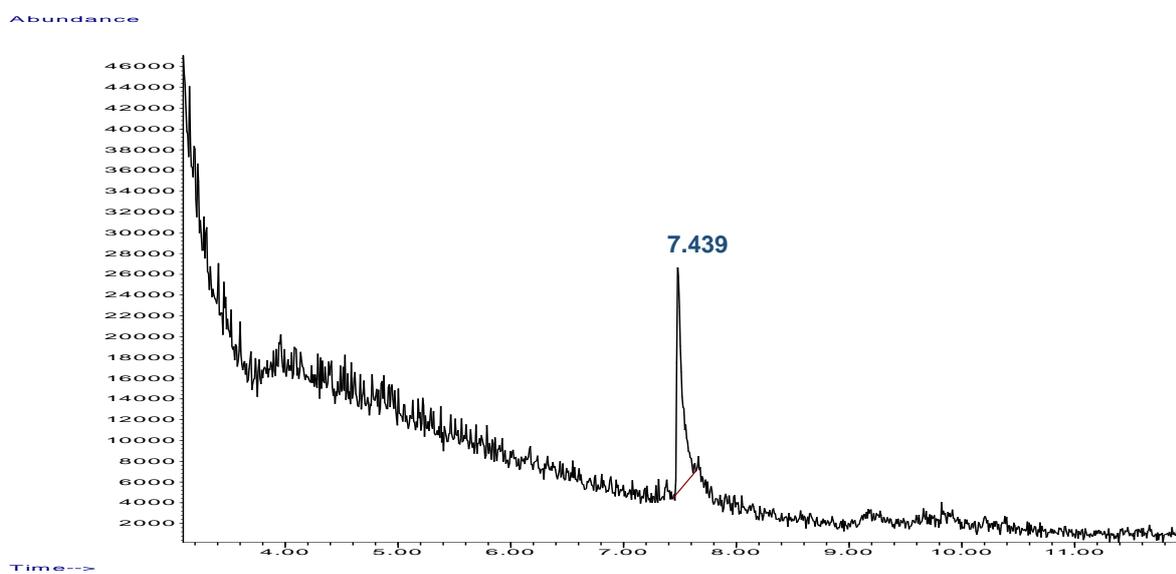
Cromatograma 21. Bebida No. 3 MCFL analizada por CG.



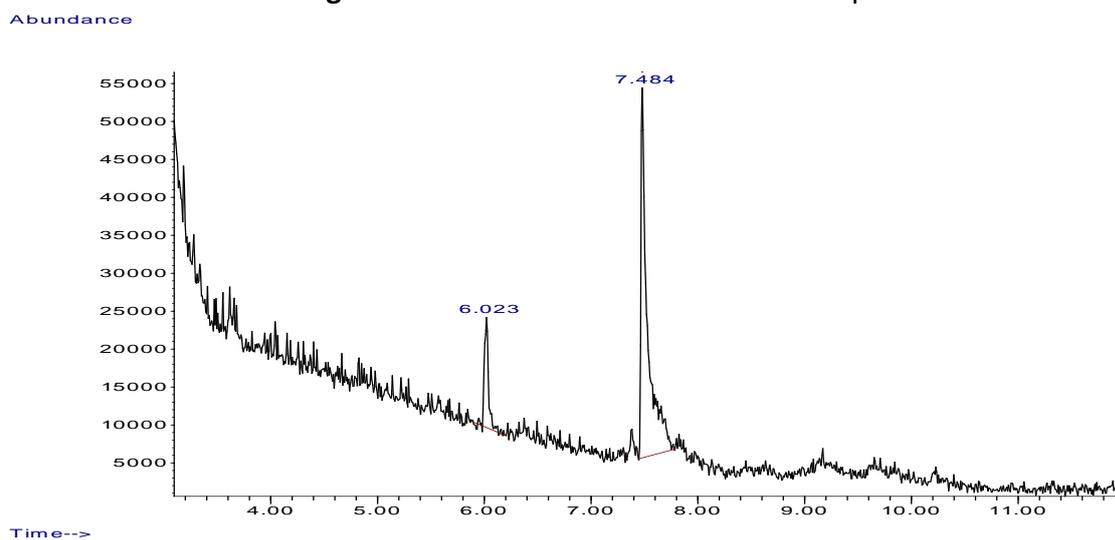
Cromatograma 22. Bebida No. 3 MCBL analizada por CG.



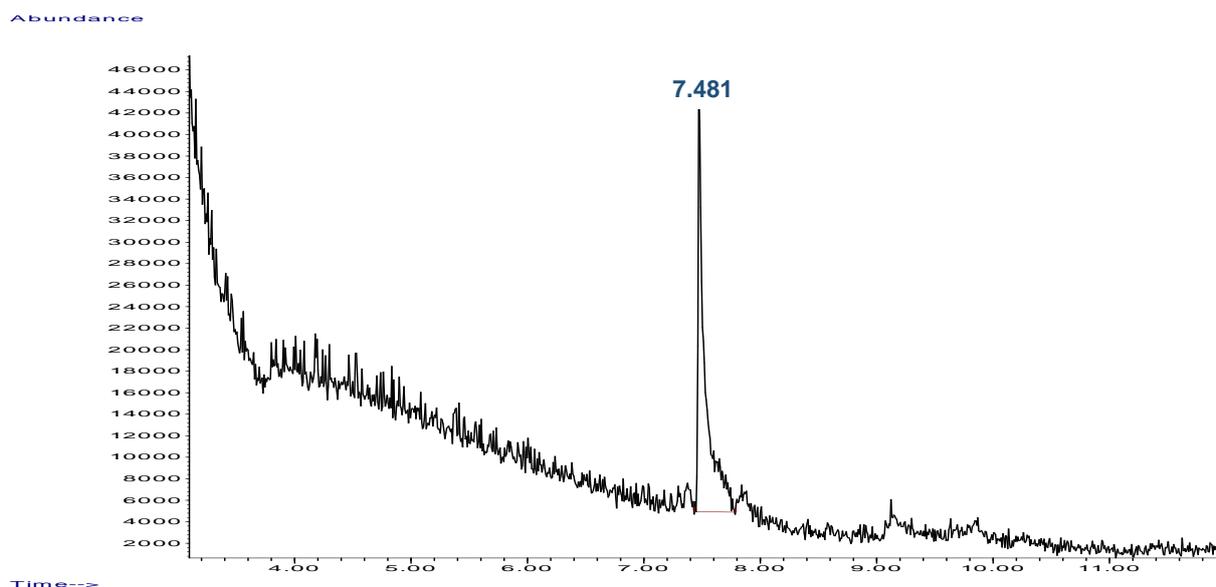
Cromatograma 23. Bebida No. 3 MCFA analizada por CG.



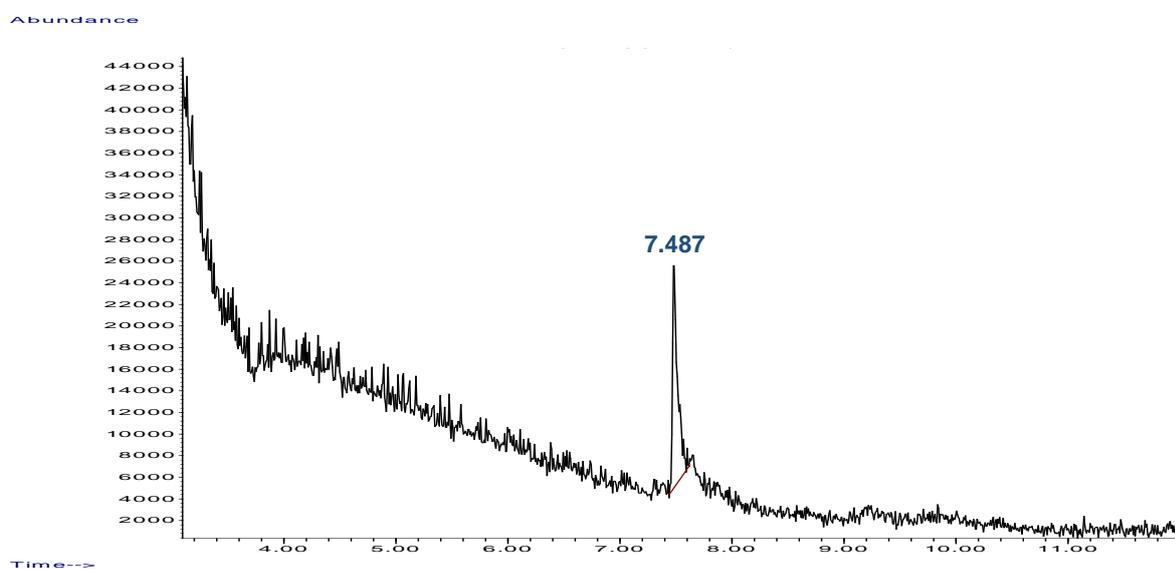
Cromatograma 24. Bebida No. 3 MCFL analizada por CG.



Cromatograma 25. Bebida No. 3 MCBL analizada por CG.



Cromatograma 26. Bebida No. 3 MCFA analizada por CG.



Cromatograma 27. Bebida No. 3 MCFL analizada por CG.

Cabe comentar que existen reportes que indican que eucaliptol a bajas concentraciones posee diversas propiedades, como expectorante, antimicrobiano, antiinflamatorio y como hipoglucemiente (por lo ha sido utilizado como coadyuvante en el tratamiento de DM2), mientras que α -terpineol tiene propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitumorales, antivirales, y que adicionados a la dieta diaria ayuda a un mejor control de enfermedades como obesidad y Diabetes Mellitus Tipo 2, ya

que ayudan a la asimilación de la glucosa y estimulan el proceso de lipólisis (Tan et. al., 2016).

Finalmente, Jaspinder Kaur en 2014, en estudios de toxicidad aguda realizados en ratas indican que la DL_{50} para eucaliptol es de 2480 mg/kg, lo cual no representa problema alguno ya que nuestras bebidas durante los procesos de fermentación, la concentración de eucaliptol y de α -terpineol disminuyó por debajo de éstos valores (eucaliptol 0.9225 μ g/100 mL y α -terpineol 13.46 - 5.6829 μ g/100 mL) en las bebidas elaboradas.

6.7. Evaluación sensorial por medio de una escala Hedónica

Tabla 13. Resultados del análisis sensorial realizado a 50 panelistas.

Parámetro de calidad	Bebida No. 1 Árnica + Cardamomo	Bebida No. 2 Cúrcuma + Cardamomo	Bebida No. 3 Menta + Cardamomo
Color y apariencia	7	7	7
Aroma	7	7	7
Gusto	7	6	7
Sensación en la boca	7	7	7
Aceptabilidad general	7	7	7

Los resultados del análisis sensorial con escala hedónica a 50 panelistas no entrenados se ilustran en la **Tabla 13**. Cabe mencionar que tuvo otros comentarios positivos por parte de los panelistas, como el hecho de que preferirían consumir esta bebida en lugar de alguna otra bebida azucarada como jugos o refrescos, considerando los efectos benéficos que trae consigo su consumo y que el contenido calórico que contienen traerían mejores bienes a su salud a corto y largo plazo.

6.8. Aislamiento e identificación de bacterias y levaduras en hongo Kombucha

Se lograron aislar 6 cepas diferentes a partir del Hongo Kombucha empleado para esta investigación. Posteriormente, se identificó cada cepa aislada por su morfología macroscópica, microscópica y mediante pruebas bioquímicas primarias y secundarias (**Tabla 16**).

Las cepas identificadas fueron 3 bacterias y 3 levaduras *Acetobacter xylium*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Schizosacaromices pombe* y *Saccharomycodes ludwigii* (**Tabla 17**).

**Tabla 14.** Morfología colonial, morfología bacteriana y pruebas bioquímicas primarias y secundarias se las colonias aisladas del hongo Kombucha.

Cepa. Medio de cultivo. Nombre	Morfología colonial	Morfología bacteriana	Gram	Catalasa	Oxidasa	O/F	Gelatina	Nitratos	MR/VP	Sulfhídrico	Indol	Motilidad
C1. SM. <i>Acetobacter xylium</i>	Circular, pulvinada, entera, lisa, cremosa y blanca	Bacilos largos con bordes rectos en cadena	+	++	-	-/-	+	-	+/-	-	-	-
C2. SDA. <i>Acetobacter aceti</i>	Irregular, plana, entera, cremosa, blanca, lisa, opaca	Bacilos cortos en cadena y diplobacilos	+	++	-	-/-	-	+	+/-	-	-	+
C3. AST. <i>Acetobacter pasteurianus</i>	Irregular, cerebroide, ondulado, plegado, membranosa y brillante	Bacilos largos, esporulados empaliados y en racimo	-	+	+	-/-	-	+	+/-	-	-	+
C4. AST. <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Puntiforme, plana, entera, cremosa, blanca, lisa, traslucida	Bacilos pequeños con bordes redondeados en racimo	+	+	+	-/-	+	+	-/+	-	-	-
C5. SDA. <i>Schizosacaromices pombe</i>	Circulares, pulvinada, borde entero, lisa, cremosa, amarilla traslucida	Bacilos cortos empalizados y en cadena.	+	++	-	-/-	+	-	-/+	-	-	-
C6. AST. <i>Saccharomycodes ludwigii</i>	Umbonada con bordes irregulares y superficie membranosa y blanca	Bacilos cortos con bordes redondeados empalizados.	+	+	+	-/-	+	-	-/+	-	-	-

Tabla 15. Microorganismos de hongo Kombucha reportados en diferentes países, incluyendo los identificados en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

Suiza	Túnez	Estados Unidos	Australia	Serbia	México FES Cuautitlán UNAM
<p><i>Zygosaccharomyces bailli</i></p> <p><i>Acetobacter xylium</i></p> <p><i>Acetobacter acetii</i></p> <p><i>Acetobacter pasteurianus</i> (Steiger and Steinegger 1957)</p>	<p><i>Acetobacter xylium</i> (Balentine, 1997)</p> <p><i>Acetobacter acetii</i></p> <p><i>Acetobacter pasteurianus</i> (Liu, Hsu, Lee, & Liao, 1996)</p> <p><i>Zygosaccharomyces bailli</i></p> <p><i>Schizosaccharomyces pombe</i></p> <p><i>Bacterium gluconicum</i></p> <p><i>Saccharomyces cerevisiae</i></p> <p><i>Saccharomycodes ludwigii</i></p> <p><i>Brettanomyces bruxellensis</i></p> <p><i>Brettanomyces lambicus</i></p> <p><i>Brettanomyces custersii</i> (Reiss, 1994)</p>	<p><i>Acetobacter xylium</i></p> <p><i>Schizosaccharomyces pombe</i></p> <p><i>Bacterium gluconicum</i></p> <p><i>Saccharomycodes ludwigii</i></p> <p><i>Pichia fermentans</i> (Stamets, 1995)</p>	<p><i>Zygosaccharomyces bailli</i></p> <p><i>Schizosaccharomyces pombe</i></p> <p><i>Candida stellata</i></p> <p><i>Brettanomyces bruxellensis</i></p> <p><i>Torulospora delbruecki</i></p> <p>(Jankovic and Stojanovic, 1994; Frank, 1995; Mayser et al., 1995; Liu et al., 1996).</p>	<p><i>Saccharomyces cerevisiae</i></p> <p><i>Saccharomycodes ludwigii</i></p> <p><i>Acetobacter</i></p> <p><i>Saccharomyces bisporus</i> (Markov et al. 2001)</p>	<p><i>Acetobacter xylium</i></p> <p><i>Acetobacter acetii</i></p> <p><i>Acetobacter pasteurianus</i></p> <p><i>Brettanomyces bruxellensis</i></p> <p><i>Schizosaccharomyces pombe</i></p> <p><i>Saccharomycodes ludwigii</i></p>

Acetobacter aceti se trata de una bacteria que presenta movimiento gracias a sus flagelos (motilidad: +), no tiene la capacidad de producir enzimas de tipo proteolíticas (gelatinasas) que hidrolizan la gelatina (gelatina: +). Su proceso metabólico es bien conocido por producir ácido acético en grandes cantidades. *Acetobacter xylium* es una bacteria con la capacidad de producir celulosa a partir de glucosa y a esta se le atribuye la formación de la matriz celulósica característica del hongo kombucha. Presenta gelatinaza (gelatina: +) y no tiene la capacidad para separar indol a partir de L-triptofano. Al igual que *Acetobacter aceti* es aerobio por lo que no tiene la capacidad de reducir los nitratos (nitratos: -). *Acetobacter pasteurianus* presenta una respiración anaerobio por lo que utiliza nitrato como aceptor final de electrones (Nitratos: +).

Las bacterias acéticas tienen un metabolismo estrictamente aerobio (**Figura 1**), es decir que para su desarrollo necesitan disponer de oxígeno molecular, que actúa como aceptor final de electrones. La fuente de carbono es también un factor importante para el crecimiento bacteriano y dependiendo de ésta utilizan diferentes rutas metabólicas, con intermediarios y productos finales distintos.

El producto mayoritario de la fermentación es el ácido acético, utilizando glucosa como fuente de carbono. En ausencia de etanol este género de bacterias puede oxidar completamente el ácido acético a CO₂ y H₂O a través del ciclo de Krebs (**Figura 2**). Otros productos de la fermentación son los ácidos glucónico, glicérico, glicólico y succínico (Ribéreau Gayón et al. 2003). Los géneros *Acetobacter* pueden llevar a cabo la oxidación completa, aunque la presencia de glucosa/fructosa o etanol reprimen el funcionamiento de esta ruta metabólica y por tanto, ésta se dará sólo cuando se hayan consumido completamente las fuentes de carbono presentes en el medio (Saeki et al. 1997), lo que justifica que en la literatura se reporte la presencia de ácidos orgánicos presentes en el té de Kombucha.

Acetobacter xylinium es productor de celulosa bacteriana. La celulosa bacteriana tiene ventajas sobre la celulosa vegetal debido a que se caracteriza por ser químicamente pura, libre de lignina y hemicelulosa, como también por sus fibras ultra finas, alta fuerza mecánica, biodegradabilidad, capacidad para absorber agua y altamente cristalina (Chawla et al. 2009). La celulosa bacteriana tiene ventajas sobre

la celulosa vegetal debido a que se caracteriza por ser químicamente pura, libre de lignina y hemicelulosa, como también por sus fibras ultra finas, alta fuerza mecánica, biodegradabilidad, capacidad para absorber agua y altamente cristalina (Chawla et al. 2009).

Schizosaccharomyces pombe se trata de una levadura con la capacidad de producir alcohol (VP: +) y presenta una respiración aerobia (Nitratos: -).

También se identificó la levadura *Saccharomycodes ludwigii*. La morfología colonial coincide con la reportada en la literatura, que son colonias convexas con borde irregular, lisas, cremosas y semibrillantes. Posee la enzima gelatinasa y durante la fermentación produce alcoholes superiores (isobutanol, isoamil alcohol, etil acetato) por lo que los resultados de la prueba MR/VP fueron (-/+). Esta especie de levadura no-*Saccharomyces* convierte los azúcares en etanol, dióxido de carbono y en un sin número de compuestos volátiles y no volátiles que contribuyen a la composición química y sensorial de las bebidas que fermentan como isobutanol, isoamil alcohol, etil acetato y ácido acético (Jolly et al. 2006; Fleet et al. 1992; Lambrechts et al. 2000; Swiegers et al. 2005). Por lo tanto *Saccharomycodes ludwigii* confiere propiedades organolépticas al té Kombucha.

Otra cepa identificada fue *Brettanomyces bruxellensis*; su respiración es anaerobia (Nitratos: +) y produce etanol como producto de su metabolismo (VP: +) y su morfología microscópica es semi-esférica. Esta levadura estimula la producción de etanol y ácido acético en condiciones aeróbicas (Scheffers y Wiken, 1969), lo que es vital para el aumento de la biomasa celular en la fermentación con Hongo Kombucha.

El producto mayoritario obtenido de las rutas metabólicas de los microorganismos identificados fue el ácido acético, que tiene diferentes beneficios para la salud, entre los cuales se encuentran:

- **Propiedades Antimicrobianas:** cuando se añade a los alimentos, el ácido acético pasa a las membranas celulares para matar las bacterias. Un estudio encontró que el ácido acético es letal para la bacteria *E. Coli*.

- **Efectos Anti-Diabéticos:** Se cree que el ácido acético puede reducir el azúcar en la sangre al prevenir la completa digestión de carbohidratos complejos, que se lleva a cabo ya sea mediante la aceleración del vaciado gástrico o por el aumento de la captación de glucosa por los tejidos corporales. El vinagre puede inactivar algunas de las enzimas digestivas que descomponen los carbohidratos en el azúcar, lo cual ralentiza la conversión de carbohidratos complejos en azúcares de un alimento en su torrente sanguíneo. Esto le da a su cuerpo más tiempo para sacar el azúcar de su sangre, evitando que sus niveles de azúcar se eleven.
- **Pérdida de Peso:** El ácido acético puede ayudar a perder peso, ya que parece tener un efecto anti-obesidad al aumentar la saciedad y reducir la cantidad total de alimentos consumidos. También parece ayudar a bajar la presión arterial. Un estudio mostró que el ácido acético podría reducir el colesterol en ratas de laboratorio, mientras que otro estudio en ratas encontró que la presión arterial podría disminuirse.
- **Acidez y el Reflujo Ácido:** El reflujo ácido por lo general resulta por tener muy poco ácido en el estómago. Ingerir ácido acético paulatinamente podría mejorar fácilmente el contenido ácido en el estómago.
- **Lesiones:** El consumo de bacterias de ácido acético también puede ayudar a reducir el daño muscular causado por la inflamación después del ejercicio.
- **Salud Cerebral:** Se ha sugerido que el consumo de ácido acético podría mejorar la función cognitiva en los seres humanos, y las investigaciones muestran que las bacterias del ácido acético, de hecho, producen precursores importantes de bloques de construcción en tejidos cerebrales llamados esfingolípidos.
- **Aumenta la Absorción de Nutrientes:** Al igual que otros ácidos, el ácido acético puede aumentar la absorción de minerales importantes de los alimentos que consume. Por lo tanto, es posible que su consumo mejore la capacidad del cuerpo para absorber los minerales esenciales que se encuentran bloqueados en los alimentos.

Otro de los productos de fermentación es el glicerol, que una vez ingerido, es absorbido e incrementa la concentración (osmolaridad o tonicidad) del fluido en la sangre y en los tejidos. El glicerol ha sido utilizado para tratar la inflamación del cerebro (edema cerebral) o de los ojos (glaucoma) (Frank, Nahata y Hilty 1981). Debido a que el glicerol no penetra fácilmente en el cerebro y los ojos, el incremento en la concentración de glicerol en la sangre ayuda a remover el exceso de fluidos desde estos órganos por un proceso conocido como osmosis. Estas aplicaciones clínicas de la ingesta de glicerol explican dos de los principales efectos secundarios para los atletas: los dolores de cabeza y la visión borrosa, como resultado de la reducción de fluidos en el cerebro y los ojos (Freund y Cols 1995).

Cuando se consume de forma oral (glicerina) se metaboliza lentamente en el hígado y en los riñones, y combinado con fluidos, aumenta la presión osmótica mejorando así la retención de fluidos. El glicerol, como polialcohol que es, no produce una respuesta de insulina elevada (índice glucémico bajo), sin embargo si puede transformarse en glucógeno, proporcionando al organismo una fuente de energía muy valiosa. Se le atribuye una densidad calórica similar a la de cualquier carbohidrato (4 Kcal/g), sin embargo, los estudios con polialcoholes, han demostrado que esta densidad calórica podría ser mucho menor (2 – 3.5 Kcal./g) dependiendo de los distintos polialcoholes y situaciones.

Por otro lado, el ácido glucurónico es el ácido del azúcar que se encuentra en la orina. Este ácido reúne toxinas, como las drogas y las hormonas que se encuentran en el hígado y ayuda a eliminarlas del cuerpo; es usualmente utilizado como desintoxicante. El ácido glucurónico junta a las toxinas y las hace más hidrosolubles para que se eliminen más fácilmente por la orina. También se une a las hormonas y las libera en todo el cuerpo. Además, colabora en la producción de ácido ascórbico.

Finalmente en la **Tabla 15**, se presentan los resultados reportados de las cepas que han sido identificadas en México y se compararon con las reportadas en diferentes partes del mundo en donde se puede apreciar que *Acetobacter xylium* también se encuentran en el consorcio estudiado en Túnez, Suiza y Estados Unidos, mientras que en el caso de *Acetobacter aceti* y *Acetobacter pasteurianus* solo fueron reportados en los primeros dos países mencionados. Para el caso de levaduras,

Brettanomyces bruxellensis también ha sido identificada en Túnez y Australia, *Schizosaccharomyces pombe* solo se reporta en el estudio realizado en Australia y Estados Unidos. Por último, *Saccharomycodes ludwigii* fue identificada en tres países: Serbia, Estados Unidos y Túnez.

El hecho de que el Hongo Kombucha no posea los mismos microorganismos en todos los países es lógico ya que las condiciones ambientales (temperatura, humedad relativa, altitud, presión atmosférica, partículas contaminantes del aire, etc.), en cada uno son diferentes, lo que genera un medio ambiente microbiano diferente que favorecerá o no crecimiento de los microorganismos presentes en el Hongo Kombucha.

7. CONCLUSIONES

Se formularon y desarrollaron tres nuevas bebidas fermentadas a partir de hongo Kombucha, utilizando como materias primas hierbas (árnica y menta), raíces (cúrcuma) y semillas (cardamomo), que atribuyeron a la bebida propiedades funcionales para utilizarlas como alternativa para el tratamiento y control de enfermedades asociadas al SM, como la Obesidad y la DM2 que son de gran impacto económico y poblacional en nuestro país.

Se determinó el pH, ácidos titulables (ácido acético), concentración de azúcar residual y los cambios en la concentración de la biomasa celular a lo largo de la fermentación. De este modo, se logró estandarizar el método para la obtención de las nuevas bebidas fermentadas. Además, se confirmó la actividad probiótica de las bebidas nutracéuticas fermentadas.

Las bebidas fueron fortificadas con ácido fólico, fibra dietética y BAL, dando como resultado una bebida que si bien puede ser utilizada para tratar y controlar problemas digestivos, su ingesta también beneficiará a personas con obesidad e hipertensión, patologías asociadas al SM.

Se determinaron los compuestos principales en las bebidas, que fueron el eucaliptol y el α -terpineol que tienen diversas propiedades expectorantes, antimicrobianas, antioxidantes, antivirales, antiinflamatorias e hipoglucemiantes y por lo tanto, ayudan a la asimilación de la glucosa y estimulan el proceso de lipólisis.

Se evaluó la inocuidad de la bebida mediante la NOM-112-SSA1-1994, comprobando que los métodos de elaboración y las condiciones de trabajo fueron óptimas para obtener una bebida inocua.

Se realizó un análisis sensorial a 50 panelistas no entrenados. La bebida **1**, **2** y **3** obtuvieron una aceptabilidad general de 7, por lo que podemos concluir que nuestra innovación tiene un gran potencial entrar en el mercado ya que sus características sensoriales son más que optimas y si se ofrece como una alternativa potencial para el tratamiento de enfermedades asociadas al SM tendrá un beneficio económico a

largo plazo, disminuyendo así los gastos que implica el tratamiento de estas anomalías clínicas.

Se aislaron e identificaron seis géneros y especies de microorganismos que forman parte del consocio del hongo Kombucha.

Considerando que México es el primer consumidor de refrescos a nivel mundial, estas bebidas nutraceúticas ofrecen una alternativa para reducir el consumo de bebidas azucaradas, tomando en cuenta que los panelistas no entrenados le atribuyeron propiedades sensoriales similares a las de un té helado. Por lo cual, podemos considerar el desarrollo de este proyecto como una contribución a la sociedad mexicana para el control y tratamiento de dos enfermedades (obesidad y DM2), cuyo aprovechamiento tendría un impacto económico positivo a largo plazo en el sector salud.

PERSPECTIVAS

En investigaciones futuras se pretende evaluar el efecto de las tres bebidas sobre variables bioquímicas asociadas con síndrome metabólico, tales como: peso corporal, presión arterial, perfil glucémico, perfil de lípidos, insulina, leptina, incretinas y adiponectina plasmáticas y perfil renal (volumen/24 h, albuminuria, depuración de creatinina), usando como modelo experimental ratas wistar macho; así como los cambios epigenéticos en la microbióta del tracto gastrointestinal.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Achinewhu, S. C, Ogbonna, C. C. and Hart, A. D. (1995). Chemical composition of indigenous wild herbs, spices, fruits, nuts and leafy vegetables used as food. *Plants Foods Human Nutrition*; 48 (4): 341-348.

Alberti, K.G., Zimmet, P.Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus, provisional report of a WHO commission. *Diabetic Medicine*; 15:539–53.

Alegría E., Castellano J.M., Alegría A. (2008). Obesidad, síndrome metabólico y diabetes: implicaciones cardiovasculares y actuación terapéutica. *Revista Española de Cardiología*; 61(7):752-764.

Alvídrez, A., González, Z. (2002). Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales. *Revista Salud Pública y nutrición*; 3(3):22-28.

Aparicio, X., Loza, S., Torres, M. G., Velázquez, N.G. y Arreola, H.J. (2017) Características físico-químicas de frutos de variedades silvestres de *Opuntia* de dos regiones semiáridas de Jalisco, México. *Polibotánica*; 43:219-244.

Badimon, L., Vilahur G., Padro, T. (2010). Nutraceuticals and atherosclerosis: human trials. *Cardiovascular Therapeutics*; 28(4):202-215.

Balentine, D. A. (1997). Special issue: tea and health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; 8:691-692.

Balentine, D. A., Wiseman, S. A., & Bouwens, L. C. (1997). The chemistry of tea flavonoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; 37:693-704.

Barquera, S., Hernandez-Barrera, L., Tolentino, M.L., Espinosa, J., Ng, S.W., Rivera, J.A., Popkin, B.M. (2008). Energy intake from beverages is increasing among Mexican adolescents and adults. *Journal of Nutrition*; 138(12):2454–2461.

Bathla, M., Anjum S., Kulhara P., Illrd S. J. (2017). Metabolic syndrome in drug naive patients with substance use disorder. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 11:167–171.

Battikh H., Bakhrouf A., Ammarb E. (2012). Antimicrobial effect of Kombucha analogues. *Food Science and Technology*; 47:71-77.

Carranza, J., López, S.M. (2008) El síndrome metabólico en México. *Medicina Interna de México*; 24(4):251-61.

Chakravorty S., Bhattacharya S., Chatzinotas A., Chakraborty W., Bhattacharya D., Gachhui D. (2016). Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology*; 220:63–72.

Clair, C. (1961). Of herbs and spices. Editorial Abelard and Schuman New York, United States of America.

Córdoba, J.A., Barquera, S., Campos, I., Hernández M. (2007). Análisis de conglomerados de factores de riesgo para enfermedades crónicas en adultos mexicanos. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0036-36342013000800010&script=sci_arttext&lng=en (Acceso enero 28, 2018).

Dalle Zotte, A. and Z. Szendrő. (2011). The role of rabbit meat as functional food. *Meat Sci*. 88(3):319-331.

Drewnowski, A. (1996). From asparagus to zucchini: mapping cognitive space for vegetable names. *The Journal of the American College of Nutrition*. 15(2):147-153.

Dufresne, C. & Farnworth, E. (2000). Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Research International*, 33:409-421

Duke, A. J. and Bogenschutz-Godwin, J. M. *Handbook of Medicinal Herbs*. 2nd Ed. CRC Press. Boca Raton: FL, USA. 2002. 896 p.

Ebersole, B., Liu, Y., Schmidt, R., Eckert, M., Brown, P.N. (2017). Determination of Ethanol in Kombucha Products: Single-Laboratory Validation, First Action. *Journal of AOAC International*, 100(3):12.

Farnsworth, N. R. (1985). Medicinal plants in therapy. *Bulletin World Health Organization*. 63 (6):965-981.

Figuera, Y., Malavé, A. y Méndez, J. R. (2012). Lípidos, alimentos y sus suplementos en la salud cardiovascular. II. Fuentes vegetales. *Revista Científica UDO Agrícola*. 12(1):1-16.

Folch, M. H. (2018). The Role of Prebiotics and Probiotics in Gastrointestinal Disease. *Journal of Gastroenterology clinics of North America*. 47;179-191.

Fontana, J.D., C.F. Valeria, S.J. De Souza, Lyra, N. & De Souza, A.M. (1991). Nature of plants stimulators in the production of *Acetobacter xylinum* ("tea fungus") biofilm used in skin therapy. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 28/29:341-351.

Font-Quer, P. (1962). Plantas Medicinales. El Dioscórides Renovado. Editorial Labor. Barcelona, España. 1033 p.

Frank, G.W. Kombucha: *Healthy Beverage and Natural Remedy from the Far East*. Wilhelm Ennsthaler: Austria. 1995.

Gibson, C.R., Roberfroid, M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microflora: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*;125:401.

Gutiérrez, J. P., Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy, T., Villalpando-Hernández, S., Franco, A., Cuevas-Nasu, L... Hernández-Ávila, M. (2012). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales*. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública.

Hartmann, A. M., Burleson, L. E., Holmes, A. K., & Geist, C. R. (2000). Effects of chronic kombucha ingestion on open-field behaviors, longevity, appetitive behaviors, and organs in C57-BL/6 mice: a pilot study. *Nutrition*; 16:75-761.

Hauser, S.P. (2003). Dr. Shlenar's: Kombucha mushroom infusion: A biological cancer therapy. *Schweitz Rundsch fur Medizin Praxis*;79:243-246.

Helander, I., Von Wright, A., & Mattila-Sandholm, T. M. (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science & Technology* 8 (5): 146-150.

Hollman, P. C. H., Hertog, M. G. L., Katan, M. B (2001). Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry*; 57:43-46.

Jankovic, I., Stojanovic, M. (1994). Microbial and chemical composition, growth, therapeutical and antimicrobial characteristics of tea fungus. *Mikrobiologija*; 33, 25-34.

Kang, J. Y., Yap, I., Guan, R., Lim, T. C. (1988). Chilli ingestion does not lead to macroscopic gastroduodenal damage in healthy subjects. *Journal of Gastroenterology Hepatology*; 3(3):573-576.

Kiple, K. F. & Ornelas, K.C. (2000). The Cambridge world history of food. *Cambridge University Press*. Vol. I. 1120 págs.

Kitts, D. D. (1994). Bioactive substances in food: identification and potential uses. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 72(4):423-434.

Kochhar, K. P. (2008). Dietary spices in health and diseases: II. *Indian Journal Physiology and Pharmacology*. 52(4):327-154.

Kuklinski, C. Farmacognosia. *Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Ediciones Omega. Barcelona, España. 2000.528 p.

- Lazo, M. & Bilal, U. (2016). Obesity: Epidemiology of. Disponible en: Elsevier.
- Liu, Q., Wang, Y., Crist, K. A., Wang, Z. Y., Lou, Y. R., Huang, M. T., Conney, A. H., & You, M. (1998). Molecular epidemiology and cancer prevention. Effect of green tea on p53 mutation distribution in ultraviolet B radiation-induced mouse skin tumors. *Carcinogenesis*; 19:1257-1262.
- Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of Nutrition*. 134(12):3479S-3485S.
- Mann, A. 2011. Biopotency role of culinary spices and herbs and their chemical constituents in health and commonly used spices in Nigerian dishes and snacks. *African Journal of Food Science*; 5(3):111-124.
- Mariutti, L. R. B., de Mattos Barret, G. P., Bragagnolo, N., Mercadante, A. Z. (2008). Free radical scavenging activity of ethanolic extracts from herbs and spices commercialized in Brazil. *Brazilian Archive of Biological Technology*; 51(6):1225-1232.
- Markov, S.L., Malbasa, R.V., Hauk, M.J., Cvetkovic, D.D. (2001). Investigation of tea fungus microbe associations. I. *Acta Periodica Tecnológica*; 32:133–138.
- Martínez, E., Malacara, J.M., Martinez, C. (2015). Taste perception in normal and overweight Mexican adults. *Appetite*; 89:192–195.
- Massaro, M., Scoditti, E., Annunziata, C., Carluccio, M. A., De Caterina, R. (2010). Nutraceuticals and prevention of atherosclerosis: focus on ω -3 polyunsaturated fatty acids and Mediterranean diet polyphenols. *Cardiovascular Therapy*; 28(4):13-19.
- Mayser, P., Fromme, S., Leitzmann, C. (1995). The yeast spectrum of the 'tea fungus Kombucha. *Mycoses*; 38:289-295.
- Menon, A. N. (2000). The aromatic compounds of pepper. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*. 22(2-3):185- 190.

Mizrahi, A., Knekt, P., Montonen, J., Laaksonen, M., Heliövaara, M. (2009). Plant foods and the risk of cerebrovascular diseases: a potential protection of fruit consumption. *British Journal of Nutrition*.102(7):1075-1083.

Modak, M., Dixit, P., Londhe, J., Ghaskadbiand, S., Devasagayam, T. (2007). Indian herbs and herbal drugs used for the treatment of diabetes. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 40(3):163-173.

Mohammadshirazi, A., Kalhor, E. B. (2016). Energy and cost analyses of kombucha beverage production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*; 55:668–673.

Newberne, P. M. (1988). The influence of food additives and related materials on lower bowel structure and function. *Toxicologic Pathology*. 16(2):184-197.

Panghala, A., Janghub, S., Virkara, K., Gata, Y., Kumara, V., Chhikaraa, N. (2018). Potential non-dairy probiotic products – A healthy approach. *Food Bioscience*; 21:80–89.

Parker, A., Roy, T., D’Adamo, C., Wieland, L.S. (2018). Probiotics and gastrointestinal conditions: An overview of evidence from the Cochrane Collaboration. *Nutrition*; 45:125–134.

Pruthi, J. S. *Spices and Condiments*. National Book Trust India, New Delhi, India: 1976.

Raghavenra, H., Diwakr, R. T., Lokesh, B. R., Baidu, K. A. (2006). Eugenol the active principle from cloves inhibits 5-lipoxygenase activity and leukotriene-C4 in human PMNL cells. *Prostaglandins, Leukotrienes Essential Acids*. 74(1): 23-27.

Reiss, J. (1994). Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*; 198:258-261.

Roche, J. The history and spread of kombucha. (1998). http://www.trib.com_kombu/roche.html (Acceso febrero 8, 2018).

Rodríguez, G. (1998). Ácido fólico y Vitamina B12 en la nutrición humana. *Revista Cubana de Alimentación y nutrición*; 12(2):107-119.

Rodríguez-Chávez, J. L., Egasa, V., Linares, E., Bye, R., Hernández, T., Espinosa-García, F.J., Delgado, G. (2017). Mexican Arnica (*Heterotheca inuloides* Cass. Asteraceae: Astereae): Ethnomedical uses, chemical constituents and biological properties. *Journal of Ethnopharmacology*; 195:39–63.

Rosa, E., Pintó, X. (2003). Homocisteína, ácido fólico y enfermedad cardiovascular. http://revista.nutricion.org/hemeroteca/revista_agosto_03/Funcionales/FLORA%20homocisteina.pdf (Acceso abril 8, 2018).

Sánchez, K., Menjívar, M. (2016). Genetic Component of Type 2 Diabetes in a Mexican Population. *Archives of Medical Research*; 47:496-505.

Sastre, A. (2003). Prebióticos y probióticos: mecanismos de acción y sus aplicaciones clínicas. *Gastroenterol Hepatology*; 26(Supl.1):6-12.

Saury, A. *Las Plantas Fumables Usos y Propiedades*. Mandala Ediciones. Madrid, España: 2004. 99 p.

Sievers, M., Lanini, C., Weber, A., Schuler-Schmid, U., Teuber, M. (1995). Microbiology and Fermentation Balance in a Kombucha Beverage Obtained from a Tea Fungus Fermentation. *Systematic Applied Microbiology*; 18:590-594.

Singh, A., Dubey, R. Y., Paliwal, R. T., Saraogi, G. K., Singhai, A. K. (2012). Nutraceuticals-an emerging era in the treatment and prevention of diseases. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*; 4(Sup. 4):39- 43.

Srinivasan, M. R., Satyanarayana, M. N. (1987). Influence of capsaicin, curcumin and ferulic acid in rats fed high fat diets. *The Journal of Biological Science*. 12(2):143-152.

Stamets, P. (1994-95) My adventures with the blob. *The Mushroom Journal*. Winter Issue: 5-9.

Steiger, K. E., Stein-egger, E. (1957) Ober den Teepilz. *Pharmaceutica Acta Helveticae*. 32:133-154.

Sutovská M., Capek P., Kocmalová M, Pawlaczyk I, Zaczynska E., Czarny A., Uhliaríková I., Gancarz R, Franová S. (2014). Characterization and pharmacodynamic properties of *Arnica montana* complex. *International Journal of Biological Macromolecules*; 69:214–221.

Taneja S.C., Chandra, S. (2012). Mint. *Handbook of herbs and spices*; 20: 366-387.

Tapsell, L. C., Hemphill, I., Cobiac, L., Patch, C., Sullivan, D., Fenech, M., Roodenrys, S., Keogh, J. B., Clifton, P. M., Williams, P. G., Fazio, V. A., Inge, K. (2006). Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future. *The Medical Journal of Australia*. 185(Suppl. 4):S4-S24.

Thakur, N., Gupta, B., Nagariya, A., Jain, N., Banweer, J., Jain, S. (2010). Nutraceutical: New Era's safe pharmaceuticals. *Journal of Pharmacy Research*. 3(6):1243-1247.

Udupihille, M. (1993). The effect of capsaicin on the small intestinal absorption of glucose and alanine in the rat. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*. 37(1):59-62.

Villalpando, S., de la Cruz, V., Rojas, R., Shamah-Levy, T., Avila, M.A., Gaona, B., Rebollar, R., Hernández, L. (2010). Prevalence and distribution of type 2 diabetes mellitus in Mexican adult population: a probabilistic survey. *Salud Pública México*; 52 (Suppl. 1), S19–S26.

Wildman, R. E. C. 2007. Handbook of nutraceuticals and functional foods. CRC Series in Modern Nutrition. CRC Press, p. 2.

World Health Organization. Draft Guideline: Sugars intake for adults and children. http://www.who.int/nutrition/sugars_public_consultation/en/ (Acceso Abril 5, 2018).

Yamada, K., Sato-Mito, N., Nagata, J. (2008). Health claim evidence requirements in Japan. *The Journal of Nutrition*; 138:1192S-8S.

Yapar, K., Cavusoglu, K., Oruc, E., Yalcin, E. (2010). Protective effect of kombucha mushroom (KM) tea on phenol-induced cytotoxicity in albino mice. *Journal of Environmental Biology*; 31(5):615-621.

Zachariah, T. J. 1995. Essential and its constituents in selected black pepper accessions. *Plant Physiology and Biochemistry*. 22(2):151-153.