



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**DESARROLLO, ELABORACIÓN Y OPTIMIZACIÓN
BROMATOLÓGICA DE UNA BEBIDA DE TÉ NEGRO
FERMENTADA A BASE DE *Manchurian fungus* (KOMBUCHA) Y
EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD COMO POTENCIAL
ALIMENTO FUNCIONAL.**

TESIS DE GRADO
PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR
LORENA ELIZABETH MORALES CHICAIZA

RIOBAMBA – ECUADOR
2014

DEDICATORIA

A Dios por haberme brindado la salud y la fortaleza para lograr mis objetivos.

A mi familia y demás personas que me han apoyado incondicionalmente para lograr que este sueño tan anhelado sea una realidad.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar doy gracias a Dios por haberme regalado la vida y mantenerme de pie aquí presente; a mi familia por la confianza depositada en mí, a mis amigos por darme fuerza y ánimo para seguir adelante; consiguiendo hoy culminar una etapa más de mi vida. En especial doy mil gracias a mi madre por sus sabios consejos, por transmitirme esa pujanza y valor para superar todos los tropiezos que se han ido presentando a lo largo de todo mi transcurso estudiantil para hoy en día llegar a culminar una meta más en mi vida.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

*Agradezco a mi tutor BQF. Carlitos Pazminio Mcs y a mi colaborador BQF. Diego Vinuesa Mcs por impartirme sus conocimientos técnicos científicos para culminar con este trabajo y con mi carrera.
En verdad gracias a todos!!*

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que el trabajo de investigación: “**DESARROLLO, ELABORACIÓN Y OPTIMIZACIÓN BROMATOLÓGICA DE UNA BEBIDA DE TÉ NEGRO FERMENTADA A BASE DE *Manchurian fungus* (KOMBUCHA) Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD COMO POTENCIAL ALIMENTO FUNCIONAL**”, de responsabilidad de la señorita egresada LORENA ELIZABETH MORALES CHICAIZA, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Silvio Álvarez

DECANO FAC. CIENCIAS

Dr. Francisco Portero _____
**DIRECTOR DE LA
ESCUELA DE BIOQUÍMICA
Y FARMACIA**

BQF. Carlitos Pazminio Mcs. _____
DIRECTOR DE TESIS

BQF. Diego Vinueza Mcs. _____
MIEMBRO DE TRIBUNAL

Dra. Ana Albuja _____
MIEMBRO DE TRIBUNAL

Tlgo. Carlos Rodríguez _____
**DIRECTOR DEL CENTRO
DE DOCUMENTACIÓN**

NOTA DE TESIS ESCRITA _____

Yo, LORENA ELIZABETH MORALES CHICAIZA, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

LORENA ELIZABETH MORALES CHICAIZA

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A.C: Antes de Cristo

acetilCoA: Acetil Coenzima A

AD: Aparato digestivo

AGL: Ácidos grasos libres

ANOM: Análisis de medias

ANOVA: Análisis de varianzas

ATP: Adenin Trifosfato

BAAC: Bacterias ácido acéticas

B.K: Bebida de Kombucha

BSH: Hidrolasa de sales biliares

con.: Concentración

g: gramos

GST: Glutación-S-transferasa

GSH: Glutación

GR: Glutación reductasa

GPX: Glutación peroxidasa

HDL: Lipoproteína de alta densidad

HMGCo: 3-hidroximetil glutaril coenzima A.

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia

I_A: Índice de acidez

IgA: Inmuno globulina A

[Inó.]: Concentración de inóculo

Kcal: Kilocalorías

kJ: Kilojoules

L: Litro

LDL: Lipoproteína de baja densidad

mg: miligramo

mmol: milimol

m.o: Microorganismos

MS: Desviación de medias

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

[Inó.]: Concentración de inóculo
NTE: Norma Técnica Ecuatoriana
OMS o WHO: Organización Mundial de la Salud
PB: Plackett Burman
pH: potencial de Hidrógeno
Pi: Fósforo inorgánico
ppm: partes por millón
[Sa.]: Concentración de Sacarosa
SB: Sales Biliares
SD: Sólidos Disueltos
[SD]: Concentración de Sólidos Disueltos
DE: Diseño Experimental
SS: Desviación Estándar
SOD: superóxido desmutasa
T.F: Tiempo de fermentación
VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad
UFC: Unidades Formadoras de Colonia
URSS: Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

ÍNDICE DE ANEXOS

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I

1.	MARCO TEÓRICO.....	1
1.1	ALIMENTOS FUNCIONALES.....	1
1.1.1	Características de los alimentos funcionales.....	1
1.1.2	Bebidas funcionales.....	2
1.2	ALIMENTOS PROBIÓTICOS.....	3
1.2.1	Mecanismo de acción de los alimentos Probióticos.....	4
1.2.2	Efectos de los probióticos.....	6
1.2.2.1	Intolerancia a la lactosa.....	7
1.2.2.2	Efectos protectores.....	7
1.2.2.3	Reducción de los niveles de colesterol en la sangre.....	9
1.2.2.3.1	¿Cómo los probióticos reducen los niveles de colesterol?.....	10
1.2.3	LÍPIDOS.....	11
1.2.3.1	TRIGLICÉRIDOS.....	14
1.2.3.1.1	Valores de referencia.....	15
1.2.3.2	COLESTEROL.....	15
1.2.3.2.1	Valores de referencia.....	17
1.2.3.2.2	Biosíntesis del colesterol.....	17
1.2.3.2.2.1	Conversión de acetato en mevalonato.....	18
1.2.3.2.2.2	Conversión de mevalonato en escualeno.....	19
1.2.3.2.2.3	Conversión del escualeno en colesterol.....	21
1.2.3.3	Regulación de la síntesis de colesterol.....	22
1.2.3.4	Regulación de la colesterolemia.....	23
1.3	ALIMENTO FERMENTADO.....	24
1.3.1	Historia del <i>Manchurian fungus</i>	24
1.3.2	Descripción de Kombucha.....	26

1.3.3	Utensilios e ingredientes.....	27
1.3.3.1	Utensilios.....	27
1.3.3.2	Ingredientes.....	28
1.3.3.2.1	Azúcar.....	28
1.3.3.2.2	Té negro.....	30
1.3.3.2.2.1	Composición química del té.....	30
1.3.3.2.2.2	Beneficios del té negro.....	31
1.3.3.2.3	Agua.....	32
1.3.3.2.4	Oxígeno.....	32
1.3.3.2.5	Complejo microbiano:.....	33
1.3.3.2.5.1	Composición (Microbiota).....	33
1.3.4	¿Cómo es Kombucha?.....	34
1.3.5	¿Cómo se genera el hongo?.....	35
1.3.5.1	Consideraciones a tener en cuenta para la elaboración del té.....	35
1.3.6	Elaboración del té de Kombucha.....	35
1.3.6.1	FERMENTACIÓN Y SUS PRODUCTOS.....	41
1.3.6.1.1	FERMENTACIÓN.....	41
1.3.6.1.1.1	Fermentación Alcohólica.....	42
1.3.6.1.1.2	Fermentación láctica.....	43
1.3.6.1.1.3	Fermentación Acética:.....	43
1.3.6.1.2	Productos de fermentación del <i>Manchurian fungus</i>	44
1.3.7	Mecanismo de acción.....	45
1.3.8	Composición y propiedades del té de Kombucha.....	46
1.3.9	Cómo tomarlo.....	48
1.3.10	Precauciones y contraindicaciones.....	48
1.3.10.1	Precauciones.....	48
1.3.10.2	Contraindicaciones.....	48
1.3.11	Actividad probiótica del <i>Manchurian fungus</i> : Evaluación in vitro.....	49
1.3.11.1	Tolerancia a la acidez.....	49
1.3.11.2	Tolerancia a las sales biliares.....	50
2.	PARTE EXPERIMENTAL (METODOLOGÍA).....	53
2.1	LUGAR DE INVESTIGACIÓN.....	53
2.2	FACTORES DE ESTUDIO.....	53
2.3	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.....	53
2.3.1	Materiales.....	53

2.3.2	Equipos	54
2.3.3	Reactivos	55
2.3.4	Sustancias	55
2.4	MÉTODOS Y TÉCNICAS.....	56
2.4.1	ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO	56
2.4.2	ANÁLISIS FISCOQUÍMICO	56
2.4.3	ANÁLISIS COMPLEMENTARIO	56
2.4.3.1	Determinación del pH.....	57
2.4.3.2	Determinación de Acidez	57
2.4.3.2.1	Método Volumétrico: Titulación con fenolftaleína	57
2.4.3.3	Determinación de sólidos solubles	58
2.4.3.4	Determinación de alcohol.	58
2.4.3.5	Determinación de la gravedad específica	58
2.4.3.6	Determinación de azúcares: Método de Fehling	59
2.4.3.6.1	Azúcares reductores	59
2.4.3.6.2	Azúcares totales	60
2.4.3.6.3	Azúcares no reductores (Sacarosa).....	61
2.4.3.7	Determinación de vitamina C o Ácido Ascórbico (AA).....	61
2.4.3.7.1	Determinación de Vitamina C por HPLC.....	61
2.4.4	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.....	62
2.4.4.1	Recuento de aerobios mesófilos.	62
2.4.4.2	Recuento de coliformes totales	63
2.4.4.3	Recuento de mohos y levaduras.....	63
2.4.4.4	Identificación de microorganismos	64
2.4.4.4.1	Tinción Gram.....	64
2.4.4.4.1.1	PROCEDIMIENTO	64
2.4.5	TAMIZAJE FITOQUÍMICO.....	65
2.4.5.1	Identificación de azúcares reductores.....	66
2.4.5.2	Ensayo Espuma	66
2.4.5.3	Ensayo de Cloruro Férrico (FeCl ₃).....	66
2.4.5.4	Ensayo de Shidona	67
2.4.5.5	Ensayo de Ninhidrina	67
2.4.6	CAPACIDAD PROBIÓTICA DEL <i>Manchurian fungus</i> :	67
2.4.6.1	Tolerancia a pH.....	68
2.4.6.2	Resistencia a la simulación de los jugos gástrico y pancreático.	68

2.4.6.2.1	Procedimiento	70
2.4.6.3	Tolerancia a las sales biliares.....	70
2.4.6.3.1	Procedimiento	71
2.4.6.4	Reducción del colesterol en presencia de sales biliares.....	71
2.4.6.5	Evaluación funcional de la B.K frente a varios patógenos.	71
2.4.6.5.1	Procedimiento	72
2.4.7	DISEÑO EXPERIMENTAL DE PLACKETT BURMAN (PB).....	73
3.	ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	75
3.1.	PREFORMULACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LA B.K.....	75
3.3.1	Estudio de cribado o screening de la B.K.....	75
3.3.1.1.1	Análisis estadístico de Medias (ANOM) y ANOVA	79
3.3.1.1.1.1	ANOM: Efecto principal de varios factores sobre el pH.....	79
3.3.1.1.1.2	Medias marginales-Respuestas de los promedios del pH.....	83
3.3.1.1.1.3	Análisis estadístico de Varianzas (ANOVA).....	84
3.3.1.1.1.4	Optimización del pH (metodología superficies respuesta)	85
3.3.1.1.1.4.1	Generación de matrices	86
3.3.1.1.1.4.2	Evaluación de matrices	86
3.3.1.1.2	Grados Brix: Análisis ANOM y ANOVA	87
3.3.1.1.2.1	ANOM de los grados Brix	87
3.3.1.1.2.2	Medias marginales.....	91
3.3.1.1.2.3	Análisis estadístico de varianzas (ANOVA).....	92
3.3.1.1.2.4	Optimización de los grados Brix	93
3.3.1.1.2.4.1	Generación de matrices	93
3.3.1.1.2.4.2	Evaluación de matrices: Superficies respuesta	94
3.3.1.1.3	ANOM y ANOVA para la [m.o].....	94
3.3.1.1.3.1	ANOM: Efectos de varios factores sobre la [m.o]	94
3.3.1.1.3.2	Medias marginales para la [m.o].....	99
3.3.1.1.3.3	ANOVA.....	100
3.3.1.1.3.4	Optimización de la [m.o]	100
3.3.1.1.3.4.1	Generación de matrices	100
3.3.1.1.3.4.2	Evaluación de matrices: Superficies-respuesta	101
3.3.1.1.4	ANOM y ANOVA para la densidad	102
3.3.1.1.4.1	ANOM de la densidad frente a varios factores	102
3.3.1.1.4.2	Medias marginales.....	106
3.3.1.1.4.3	ANOVA.....	107

3.3.1.1.4.4	Optimización de la densidad.....	108
3.3.1.1.4.4.1	Generación de matrices	108
3.3.1.1.4.4.2	Evaluación de las matrices: Superficies respuesta	109
3.3.1.1.5	ANOM y ANOVA para evaluar el I _A	109
3.3.1.1.5.1	ANOM para el I _A	110
3.3.1.1.5.2	Medias marginales.....	113
3.3.1.1.5.3	Análisis estadístico ANOVA para el I _A	114
3.3.1.1.5.4	Optimización del Índice de acidez.	115
3.3.1.1.5.4.1	Generación de matrices para optimizar el I _A	115
3.3.1.1.5.4.2	Evaluación de matrices (superficies respuesta).....	116
3.3.1.1.6	Determinación de vitamina C	117
3.2	EVALUACIÓN DE LA BEBIDA OPTIMIZADA.	117
3.2.1	Tamizaje fitoquímico	117
3.2.2	Análisis organoléptico	119
3.2.3	Análisis fisicoquímico.....	119
3.2.4	Análisis Complementario	121
3.2.5	Análisis Microbiológico	121
3.2.6	Identificación de los microorganismos presentes en la BK	122
3.2.7	CAPACIDAD PROBIÓTICA: EVALUACIÓN “in vitro”	123
3.2.7.1	Tolerancia al pH.....	123
3.2.7.2	Resistencia a la simulación de los jugos gástrico y pancreático.	124
3.2.7.3	Resistencia a las sales biliares.....	124
3.2.7.4	Reducción del colesterol en presencia de sales biliares.....	127
3.2.7.5	Actividad de la BK frente a varios patógenos.....	128
3.2.8	Tiempo de vida útil de la BK.....	131
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	133
4.1	CONCLUSIONES	133
4.2	RECOMENDACIONES	135
5.1	RESUMEN	136
5.2	SUMARY	138
7.1	BIBLIOGRAFÍA.....	140
5.1	ANEXOS	154

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N° 1. PLANTEAMIENTO DEL DISEÑO	76
CUADRO N° 2. PREFORFULACIÓN DE LA BK.....	77
CUADRO N° 3. EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE VARIABLES	77
CUADRO N° 4. pH vs SACAROSA.....	79
CUADRO N° 5. pH vs T.F.....	81
CUADRO N° 6. pH vs [Inó.]	81
CUADRO N° 7. pH vs CONCENTRACIÓN DE TÉ NEGRO	82
CUADRO N° 8. pH vs CICLOS DE O ₂	83
CUADRO N° 9. EVALUACIÓN DE LAS MEDIAS MARGINALES	84
CUADRO N° 10. ANOVA	85
CUADRO N° 11. OPTIMIZACIÓN DEL pH	86
CUADRO N° 12. EVALUACIÓN DE LAS MATRICES.....	86
CUADRO N° 13. BRIX vs [Sa]	87
CUADRO N° 14. °BRIX vs T.F.....	88
CUADRO N° 15. °BRIX vs [Inó.]	89
CUADRO N° 16. BRIX vs CONCENTRACIÓN DE TÉ NEGRO	90
CUADRO N° 17. °BRIX vs CICLOS DE OXIGENACIÓN	90
CUADRO N° 18. [m.o] vs Té, Sa., t, O ₂ , [Inó.].....	91
CUADRO N° 19. ANOVA DE LOS °BRIX	92
CUADRO N° 20. GENERACIÓN DE MATRICES PARA °BRIX	93
CUADRO N° 21. GRADOS BRIX vs t y [té].....	94
CUADRO N° 22. [m.o] vs [Sacarosa]	95
CUADRO N° 23. [m.o] vs TF.....	96
CUADRO N° 24. [m.o] vs [Inó.].....	97
CUADRO N° 25. [m.o] vs [té]	98
CUADRO N° 26. [m.o] vs TIEMPO DE OXIGENACIÓN	98
CUADRO N° 27. MEDIAS MARGINALES DE LA [m.o]	99
CUADRO N° 28. ANOVA	100
CUADRO N° 29. EVALUACIÓN DE MATRICES.....	101
CUADRO N° 30. [m.o] vs T.F y [Té].....	101
CUADRO N° 31. DENSIDAD vs [Sa.].....	102
CUADRO N° 32. DENSIDAD vs TIEMPO DE FERMENTACIÓN	103
CUADRO N° 33. DENSIDAD vs CONCENTRACIÓN DE INÓCULO	104
CUADRO N° 34. DENSIDAD vs [Té].....	105

CUADRO N° 35. DENSIDAD vs CICLOS DE OXIGENACIÓN	105
CUADRO N° 36. MEDIAS MARGINALES PARA LA DENSIDAD.....	106
CUADRO N° 37. ANOVA	107
CUADRO N° 38. GENERACIÓN DE MATRICES.....	108
CUADRO N° 39. EVALUACIÓN DE MATRICES.....	109
CUADRO N° 40. ÍNDICE DE ACIDEZ vs [Sa.]	110
CUADRO N° 41. ÍNDICE DE ACIDEZ vs TIEMPO DE FERMENTACIÓN.....	111
CUADRO N° 42. I _A vs [Inó.].....	111
CUADRO N° 43. I _A vs [té]	112
CUADRO N° 44. I _A vs TIEMPO DE OXIGENACIÓN.....	113
CUADRO N° 45. MEDIAS MARGINALES PARA EL I _A	114
CUADRO N° 46. ANOVA	115
CUADRO N° 47. GENERACIÓN DE MATRICES.....	116
CUADRO N° 48. DENSIDAD vs TF Y [Sa].....	116
CUADRO N° 49. TAMIZAJE FITOQUÍMICO	117
CUADRO N° 50. ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO.....	119
CUADRO N° 51. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO.....	120
CUADRO N° 52. PRUEBAS CUANTITATIVAS	121
CUADRO N° 53. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	122
CUADRO N° 54. TINCIÓN GRAM.....	123
CUADRO N° 55. EFECTO PROBIÓTICO. PRUEBAS "in vitro"	125
CUADRO N° 56. REDUCCIÓN DEL COLESTEROL EN PRESENCIA DE SB.....	127
CUADRO N° 57. PATÓGENOS TRAS LAS 24 HORAS DE INCUBACIÓN.....	129
CUADRO N° 58. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA BK.....	130
CUADRO N° 59. TIEMPO DE VIDA ÚTIL.....	131
CUADRO N° 60. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LA B.K.....	132

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA I. MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS	4
TABLA II. EFECTO Y MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS	6
TABLA III. EFECTO DE LOS PROBIÓTICOS SOBRE EL AD.....	7
TABLA IV. VALORES REFERENCIALES DE LOS TRIGLICÉRIDOS	15
TABLA V. VALORES DE REFERENCIA DEL COLESTEROL.....	17
TABLA VI. DESCRIPCIÓN DE LAS FORMAS FARMACÉUTICAS	69

ÍNDICE DE GRÁFICOS

FIGURA N° 1. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS.....	4
FIGURA N° 2. ESTRUCTURA DE LAS SALES BILIARES	14
FIGURA N° 3. ESTRUCTURA DE LOS TRIGLICÉRIDOS	15
FIGURA N° 4. ESTRUCTURA DEL COLESTEROL	16
FIGURA N° 5. BIOSÍNTESIS DEL COLESTEROL	17
FIGURA N° 6. CONVERSIÓN DEL ACETATO EN MELAVONATO	19
FIGURA N° 7. CONVERSIÓN DEL MELAVONATO EN ESCUALENO	20
FIGURA N° 8. CONVERSIÓN DEL ESCUALENO A COLESTEROL.	21
FIGURA N° 9. SACAROSA	29
FIGURA N° 10. ESTRUCTURAS DE ALGUNOS CONSTITUYENTES DEL TÉ.....	31
FIGURA N° 11. PASOS PARA ELABORAR LA KOMBUCHA	39
FIGURA N° 12. FERMENTACIÓN.....	41
FIGURA N° 13. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA	42
FIGURA N° 14. FERMENTACIÓN LÁCTICA	43
FIGURA N° 15. PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN DE LA KOMBUCHA	44
FIGURA N° 16. HIDRÓLISIS DE LA SACAROSA	45
FIGURA N° 18. OXIDACIÓN DEL ETANOL.....	78
FIGURA N° 19. ÁCIDOS PRODUCIDOS EN LA FERMENTACIÓN DE LA BK	80

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. ANÁLISIS QUÍMICO DEL AGUA DE FUENTE.....	154
ANEXO 2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL AGUA DE FUENTE	155
ANEXO 3. ELABORACIÓN DEL KOMBUCHA.....	156
ANEXO 4. CONTROL DE CALIDAD DEL PRODUCTO ELABORADO	157
ANEXO 5. REACTIVACIÓN DE CEPAS ATCC	158
ANEXO 6. CUANTIFICACIÓN AZÚCARES	159
ANEXO 7. NORMA NTE INEN. 2325: 2002	160
ANEXO 8. NORMA NTE INEN 2323: 2002-12.....	161
ANEXO 9. NORMA NTE INEN 2322:2010	162
ANEXO 10. NORMA NTE. INEN 1529-5:2006.....	163
ANEXO 11. NORMA NTE. INEN 1529-7:1990.....	164
ANEXO 12. NORMA NTE. INEN 1529 - 10:1998.....	165
ANEXO 14. ETIQUETA DEL PRODUCTO	171

INTRODUCCIÓN

Manchurian fungus (Kombucha) es una simbiosis de bacterias y levaduras que viven en perfecta armonía. Posee varios efectos beneficiosos que van desde la pérdida de peso a curar el cáncer, inclusive a curar el SIDA. **(AMMAR, E y otros. 2012)**

Se prepara tradicionalmente fermentando el té negro endulzado a una temperatura ambiente por 14 días. Popularmente es conocido como el “hongo de té negro” y su consumo se descubrió por primera vez en Manchuria-China, 220 años a.C., después se extendió a Rusia, Alemania (durante la 2^{da} guerra mundial) y luego a Francia, donde su consumo se volvió muy popular como posteriormente lo hacía en Estados Unidos. Esta popularidad se debe en gran parte a los efectos curativos que se le atribuyen. **(DUFRESNE, C Y FARNWORTH, E. 2004)**

En la década de los 60 se realizaron en Suiza numerosas investigaciones científicas sobre la Kombucha llegándose a la conclusión de que sus efectos son tan saludables como el yogur. Varios autores hablan de su efecto terapéutico en base a los ácidos glucónico, glucurónico, L-láctico y acético, vitaminas C y las del complejo B. **(STEVENS, N. 2008)**

En la actualidad existen numerosas investigaciones científicas del Kombucha publicadas por ELSEVIER, donde se habla tanto de su ecología como de los efectos benéficos que presenta en la salud del consumidor.

Por cuestiones de tiempo y mal hábito alimenticio, actualmente la mayoría de la población consume comidas rápidas; las cuales afectan notablemente al organismo produciendo enfermedades como la obesidad, que se caracteriza por una hiperlipidemia (niveles de colesterol y triglicéridos elevados) que conllevan a otras enfermedades graves como diabetes, enfermedades cardiovasculares e incluso la muerte.

Según la OMS la obesidad es la quinta causa de muerte a nivel mundial, además en el ámbito nacional constituye un problema de salud pública, razón por la cual se ha visto

en la necesidad de elaborar un alimento funcional para contrarrestar dicha patología y a la vez mejorar la calidad de vida de la población, siendo este último uno de los objetivos planteados en el “Plan Nacional del buen Vivir”.

En esta investigación los objetivos planteados fueron: Desarrollar, elaborar y optimizar bromatológicamente una bebida de té negro fermentada a base de la *Manchurian fungus* (Kombucha) y evaluar su actividad como potencial alimento funciona. Primeramente se estableció la formulación para la elaboración de una bebida de té negro fermentada a base de *Manchurian fungus* (Kombucha), buscando el rango adecuado de atributos de calidad y parámetros de proceso, que nos permitan obtener un producto optimizado bromatológicamente. Además se va a evaluó la actividad probiótica e hipolipemiente de la bebida optimizada como también se realizó el estudio de estabilidad físico, químico y microbiológico para determinar el tiempo de vida útil del producto optimizado.

Haciendo uso del diseño experimental de Plackett-Burman se logró optimizar la bebida de Kombucha, cuya formulación consistió en utilizar una concentración 0,5M de sacarosa, 2500 ppm de té negro, 15 días de fermentación, 12500 ppm de inóculo y 3 ciclos de oxigenación de 30minutos cada uno. Además se evaluó la capacidad probiótica de la bebida de Kombucha frente a *E. coli*, *Salmonella gallinarum*, *Staphylococcus aureus* y *Candida*. La bebida inhibe el crecimiento de *S. aureus* y *E. coli*, más aún no inhibe el crecimiento de *Salmonella gallinarum* y *Candida*.

Se concluye que el tiempo de fermentación y la cantidad de sustrato (azúcar y té) son los factores más relevantes para optimizar la bebida de Kombucha. También se concluye que el la bebida de Kombucha es un alimento funcional ya que reduce el colesterol en un 25%.

Este trabajo de Investigación se lo realizó en la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO, en los laboratorios de la FACULTAD DE CIENCIAS.

La hipótesis del trabajo fue:

La bebida de té negro fermentado a base de *Manchurian fungus* (Kombucha) es un alimento funcional con actividad hiperlipemiente, que permitirá mejorar la salud del consumidor.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 ALIMENTOS FUNCIONALES

Según la NTE INEN 2587:2011 se define: **Alimento funcional**, es un alimento natural o procesado que siendo parte de una dieta variada y consumido en cantidades adecuadas y de forma regular, además de nutrir tiene componentes bioactivos que ayudan a las funciones fisiológicas normales y/o que contribuyen a reducir o prevenir el riesgo de enfermedades.(NTE INEN 2587. 2011)

1.1.1 Características de los alimentos funcionales

Los alimentos funcionales se caracterizan principalmente por su alto contenido nutricional y sus componentes biológicos como antioxidantes, fibra, vitaminas y minerales ayudando a mejorar la salud y a prevenir enfermedades. Dentro de sus características tenemos:

- Alimentos naturales a los que se les ha añadido o se les ha quitado un componente mediante medios tecnológicos o biológicos. También puede tratarse

de un alimento, al cual se le ha modificado la naturaleza de uno o más de sus componentes, o en el que se ha modificado la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes, o cualquier combinación de estas posibilidades.

- Alimentos con componentes añadidos para proveer beneficios específicos.
- Alimentos a los que se les han quitado algún componente considerado adverso para la salud.
- La presentación de un alimento funcional tiene que ser como la de un alimento, sin modificar sus características. Nunca deben presentarse en forma de cápsulas o comprimidos.
- Los alimentos funcionales tienen como objetivo modificar o potenciar las propiedades saludables de alguno de sus componentes. Según el concepto tradicional de nutrición, la principal función de la dieta es aportar los nutrientes necesarios para el buen funcionamiento del organismo.(**ARANCETA, J y otros. 2010**)

1.1.2 Bebidas funcionales

Una bebida funcional es un producto no alcohólico que incluye en su formulación ingredientes como: hierbas, vitaminas, minerales, aminoácidos, con fruta cruda o verduras. Los ingredientes funcionales están orientados a proporcionar un valor agregado a la salud del consumidor, por lo que hoy en día se han desarrollado una amplia gama de productos aplicados en las bebidas saludables, ya sea agua embotellada, jugos, entre otras, con ingredientes como el té verde, soya, fibras solubles, colágeno, vitaminas, minerales, etc.(**ARANCETA, J y otros. 2010**)

Las bebidas funcionales actualmente son muy populares y suele separarse en cuatro grupos que son: bebidas enriquecidas (jugos fortificados con vitaminas y minerales); bebidas para deportistas, bebidas energizantes y las nutracéuticas (cuyos ingredientes dan un beneficio específico al consumidor). Los ingredientes nutracéuticos cubren diversas necesidades que van desde los beneficios digestivos y la desintoxicación, hasta los afrodisiacos, relajantes, reductores de colesterol o grasa, retardadores del

envejecimiento, entre otros. Se promueve el consumo de las bebidas funcionales debido a los beneficios que estas presentan como son: mejorar la inmunidad, la digestión, la salud colectiva, proporcionan saciedad y energía. **(ARANCETA, J y otros. 2010)**

1.2 ALIMENTOS PROBIÓTICOS

La palabra probiótico se deriva de dos vocablos, del latín “pro” que significa “por” o “en favor de”, y del griego “BIOS” que quiere decir “vida”, es decir probiótico significa en pro de la vida o a favor de la vida, sin embargo el término ha sufrido algunas modificaciones, por lo que probiótico también se ha definido como microorganismos vivos y compuestos que participan en el balance y desarrollo microbiano intestinal, mediante diferentes mecanismos. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS o WHO), la definición de probiótico es: "Microorganismos vivos que, cuando son suministrados en cantidades adecuadas, promueven beneficios en la salud del organismo huésped."

Concepto de microorganismo probiótico según la NTE INEN 2395:2011:
Microorganismo vivo, que suministrado en la dieta e ingerido en cantidad suficiente ejerce un efecto benéfico sobre la salud, más allá de los efectos nutricionales. **(NTE INEN 2395:2011)**

Para que un microorganismo sea incluido dentro de los Alimentos Probióticos debe cumplir con los siguientes requisitos:

1. Microorganismos presentes en humanos.
2. Tolerantes a los ácidos gastrointestinales y sales biliares.
3. Seguridad para consumo humano; es decir, no deben ser patógenos.
4. Eficacia probada científicamente. **(ASTIASARÁN, I y otros.2003)**

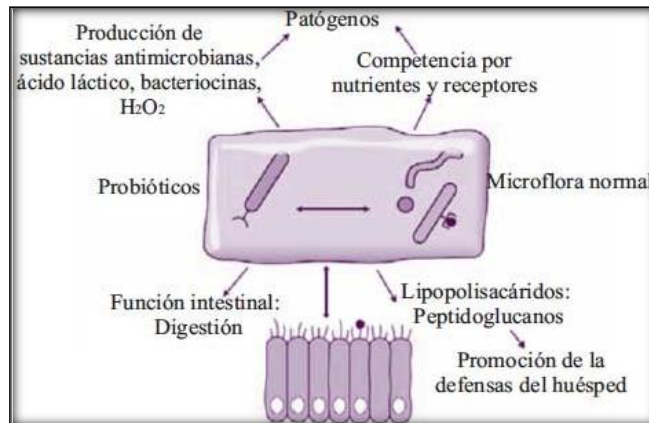
Dentro de los microorganismos con efecto probiótico se encuentran tanto hongos como bacterias, como se muestran en la Tabla N°1.

TABLA I. MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

LACTOBACILOS	BIFIDOBACTERIAS	OTRAS BACTERIAS	LEVADURAS
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Streptococcus salvarius thermophilus</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. acidophilus</i> LCI	<i>B. longum</i>	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	
<i>L. acidophilus</i> NCFB 174B	<i>B. infantis</i>	<i>L. lactis cremoris</i>	
<i>L. plantarum</i>	<i>B. breve</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	
<i>L. casei</i>		<i>Leuconostoc mesenteroides dextranicum</i>	
<i>L. brevis</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	
<i>L. fermentum</i>		<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	
<i>L. casei</i> Shirota			
<i>L. rhamnusus</i> (estirpe GG)			
<i>L. delbrueckii bulgaricus</i>			
<i>L. helveticus</i>			

FUENTE: Alimentos y Nutrición en la Práctica Sanitaria. Astiasarán I, *et al* (2003).

1.2.1 Mecanismo de acción de los alimentos Probióticos



FUENTE: Probióticos, prebióticos y simbióticos en el síndrome de intestino irritable. Guzmán E, *et al*. (2010).

FIGURA N° 1. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS

Los probióticos pueden actuar:

- 1. En el lumen intestinal.** Actúan modificando el pH debido a la presencia de ácidos orgánicos de cadena corta como el ácido acético, propiónico y butírico que son productos de fermentación de la fibra dietética. Al disminuir el pH intestinal favorecen el crecimiento de organismos beneficiosos, además en el

intestino delgado se secretan sustancias (bacteriocinas) que inhiben el crecimiento de microorganismos nocivos, consumiendo nutrientes específicos o uniéndose competitivamente a los receptores intestinales de manera que mantienen la flora intestinal y evitan la acción de dichos gérmenes.

2. **Mejorando la función de la barrera intestinal**, esto se lleva a cabo mediante la acción del moco que junto con los enterocitos previene la entrada de microorganismos patógenos.
3. **Mediante sus propiedades inmunomoduladoras**: modifican la respuesta a antígenos, aumentan la secreción de IgA específica frente a rotavirus, facilitan la captación de antígenos en la placa de Peyer, producen enzimas hidrolíticas y disminuyen la inflamación intestinal. **(FERRER, L y otros. 2001)**

Incrementan la actividad fagocítica de leucocitos intestinales promoviendo una mayor proliferación de linfocitos B, que junto con un aumento en la secreción de inmunoglobulinas (A y G) estimulan la producción de citoquinas (como la interleuquina o factor de necrosis tumoral).**(FERRER, L y otros. 2001)**

Los probióticos aumentan la actividad de las hidrolasas de las sales biliares que se unen al colesterol y ayudan a su eliminación, por lo que tienen un efecto hipocolesterolémico. Mediante la producción de triglicéridos de cadena corta inhiben la síntesis de colesterol, lo redistribuyen desde el plasma al hígado y, por desconjugación de las sales biliares, el colesterol no se reabsorbe y es utilizado para la síntesis de novo de ácidos biliares. Los mecanismos de acción citados están siendo estudiados y reevaluados, ya que en algunos casos no se disponen de datos científicamente probados in vivo. **(FERRER, L y otros. 2001)**

TABLA II. EFECTO Y MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS

EFECTOS	MECANISMOS
Acción hipocolesterolémica	Producción de ácidos orgánicos de cadena corta que inhiben la enzima HMG-CoA-reductasa. Inhibición de las micelas de colesterol. Aumentan las sales biliares desconjugadas.
Antimicrobiano	Producción de sustancias antimicrobianas: ácidos orgánicos, H ₂ O ₂ , bacteriocinas. Competencia por nutrientes. Competencia por los sitios de adhesión.
Alteración del metabolismo microbiano y del hospedador	Estimulación o producción de enzimas que intervienen en la digestión. Reducen la producción de sustancias tóxicas. Sintetizan vitaminas y otros nutrientes deficientes en las dietas.
Protección de la barrera mucopitelial.	Modifican las uniones estrechas. Disminuye la permeabilidad. Alteran el potencial eléctrico Modifican las proteínas del citoesqueleto Producen nutrientes y factores de crecimiento. Aumentan la producción de moco y defensinas.
Desintoxicación	Disminuyen las bacterias pro-carcinogénicas. Disminuyen la actividad enzimática procarcinogénica.
Producción de agentes antioxidantes	Aumenta la producción de GST, GSH, GR, SOD, GPX. Producen moléculas antioxidantes.
Producción de moléculas protectoras Immunomoduladores	Producen butirato, propionato y acetato Activación de macrófagos Modulan la función de macrófagos y monocitos. Estimulación de las células inmunes o competentes Generan niveles elevados de inmunoglobulinas. Modulan la función de las células epiteliales y dendríticas. Modulación de la actividad antitumoral.
Estimulación de motilidad intestinal	Aumentan el peristaltismo

FUENTE: Probióticos. Jorge Reyes, et al. (2012).Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.

1.2.2 Efectos de los probióticos

Los probióticos poseen varios efectos como los podemos observar en la tabla 2 y 3. Además de reducir la incidencia y la duración de diarreas, ayudan al mantenimiento de la integridad de las mucosas; modulan la inmunidad al evitar la translocación bacteriana, producen vitaminas como la B2, B6 y biotina y la asimilación de oligoelementos.

Por ejemplo la ingestión de *Lactobacillus GG* disminuye la gravedad y duración de la diarrea de origen vírico y es eficaz en el tratamiento de las recaídas por *Clostridium difficile*. (FERRER, L y otros. 2001)

TABLA III. EFECTO DE LOS PROBIÓTICOS SOBRE EL AD

GÉNEROS-ESPECIES	EFFECTOS
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	B6, B12, ácido fólico
<i>Bifidobacterium longum</i>	
<i>Bifidobacteria bifidum</i>	
<i>Bifidobacteria infantis</i>	
<i>Lactobacillus casei</i>	Regulación: niveles de triglicéridos y colesterol sanguíneos
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Absorción lactosa y estimulan la actividad biológica de péptidos, aminoácidos libres, minerales, vitaminas y enzimas.
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Potencian la acción de m.o. Intestinales beneficiosos
<i>Bifidobacteria animalis</i>	

FUENTE: PROBIÓTICOS: Potencial para prevenir y curar. Martínez Martha, et al (2007).

1.2.2.1 Intolerancia a la lactosa.

Alrededor del 70% de la población mundial presenta intolerancia a la lactosa, que es la incapacidad del organismo para desdoblar la lactosa en sus respectivos azúcares (glucosa y galactosa) como resultado de la deficiencia o ausencia de β -galactosidasa o lactasa, enzima ubicada en el borde superior de las microvellosidades del intestino delgado. La lactosa no digerida es fermentada por la flora intestinal, con producción de agua, ácidos grasos y gas, los mismos que provocan dolor abdominal, flatulencia y diarrea. **(FERRER, L y otros. 2001)**

Los probióticos contribuyen a mejorar la digestión de la lactosa reduciendo su sintomatología debido a la mala absorción; gracias a que los *Lactobacillus* poseen una actividad enzimática (lactasa) que sigue funcionando en el intestino y permite la digestión del azúcar. **(FERRER, L y otros. 2001)**

1.2.2.2 Efectos protectores

Los probióticos son microorganismos que estimulan las funciones protectoras del tracto digestivo, también son conocidos como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprofilácticos, se utilizan para prevenir las infecciones entéricas y gastrointestinales.

Para que un microorganismo pueda cumplir con esta función de protección tiene que cumplir con los postulados de Huchet que son:

- Debe ser habitante normal del intestino.
- Tener un tiempo de reproducción corto.
- Ser capaz de producir compuestos antimicrobianos y
- Ser estable durante el proceso de producción, comercialización y distribución para que pueda llegar vivo al intestino. **(FERRER, L y otros. 2001)**

Es importante que estos microorganismos puedan atravesar la barrera gástrica para poder multiplicarse y colonizar el intestino. Los probióticos modulan las actividades metabólicas de la microflora del tracto digestivo mediante los siguientes mecanismos:

- a) Por el **antagonismo** que ejercen sobre el desarrollo de microorganismos patógenos al competir con ellos por los nutrientes disponibles y factores de crecimiento produciendo bacteriocinas y citoquinas que controlan el crecimiento de otros microorganismos e incrementa la síntesis de ácido láctico, impidiendo de esta forma su acción patogénica.
- b) Mediante la **inmunomodulación** protegen al huésped de las infecciones induciendo a un aumento de la producción inmunoglobulinas, por lo cual hay un aumento de la activación de las células mononucleares y de los linfocitos. Las bacterias ácido lácticas pueden colonizar transitoriamente el intestino y sobrevivir durante el tránsito intestinal, además por su adhesión al epitelio, modifican la respuesta inmune local del hospedero. **(RUBIO, A. 2010).**

Los probióticos probablemente poseen actividad anticarcinogénica mediante la producción de aminas heterocíclicas y otros compuestos considerados potenciales carcinógenos, que actúan disminuyendo las sustancias procarcinogénicas por acción directa sobre las mismas; la activación metabólica de estos compuestos es llevada a cabo por la citocromo P450A2 en el hígado. Un claro ejemplo en los alimentos es el paso de nitritos a nitrosaminas, sustancias carcinogénicas. Las lactobacterias son capaces de actuar tanto química como enzimáticamente sobre los nitritos, y las bifidobacterias son capaces de desdoblar a las nitrosaminas. Por consiguiente, estos

microorganismos probióticos disminuyen las sustancias carcinogénicas. También las sales biliares secundarias procedentes de la degradación de la bilis se han relacionado como sustancias iniciadoras del cáncer de colon. Es por esta razón, se considera que un elevado número de lactobacilos en el intestino pueden reducir la biotransformación de las sales biliares y por tanto disminuir el riesgo de sufrir este tipo de cáncer. **(RUBIO, A. 2010).**

1.2.2.3 Reducción de los niveles de colesterol en la sangre.

El hígado se localiza en un sitio estratégico, lo cual le permite estar en contacto en gran parte tanto con sustancias endógenas como exógenas. Existen sustancias que pasan por este órgano depurándose, no saliendo a la circulación general, como por ejemplo la insulina o las sales biliares.

- El hígado utiliza colesterol para producir ácidos biliares, los mismos que son secretados en el intestino delgado, que posteriormente son reabsorbidos y enviados nuevamente al hígado. Mientras estos ácidos biliares están en el intestino, pueden ser escindidos por ciertas bacterias que habitan en el intestino, lo cual ha sido evidenciado en modelos animales, en los que, cuanto mayor es la cantidad de bacterias en el intestino, mayor es el porcentaje de eliminación de ácidos biliares. Si las bacterias intestinales están escindiendo e inhibiendo la reabsorción de sales biliares, éstas últimas no podrán ser recicladas; por tanto el colesterol almacenado en el hígado comenzará a disminuir ya que se comenzarán a sintetizar ácidos biliares a partir del colesterol debido a la falta de reciclaje de los ácidos biliares. La mayoría del colesterol encontrado en sangre proviene del hígado, por tanto este efecto ayudaría a disminuir los niveles del colesterol sérico. **(RAMOS, A y otros. 2012)**

En resumen algunos probióticos pueden ejercer efectos hipocolesteromiantes mediante:

- La utilización del colesterol en el intestino, reduciendo así su absorción.
- Aumentando la excreción de sales biliares.

- Produciendo ácidos grasos volátiles en el colon que pueden ser absorbidos e interferir con el metabolismo de los lípidos en el hígado. **(RAMOS, A y otros. 2012)**

1.2.2.3.1 ¿Cómo los probióticos reducen los niveles de colesterol?

El consumo regular de probióticos reduce los niveles de colesterol sérico en un 3%, valor significativo para prevenir la hipercolesterolemia, que es un factor de riesgo en las enfermedades cardiovasculares y la principal causa de mortalidad. Algunas especies de *Lactobacillus* usadas en la industria alimentaria como probiótico, reducen el colesterol sérico mediante dos mecanismos:

- 1. Mediante la adsorción del colesterol.** La adsorción de colesterol incrementa su demanda para la síntesis de nuevos ácidos biliares o por reducción de la solubilidad del colesterol. Algunos autores han reportado la capacidad de las bacterias de incorporar a la membrana o adherir colesterol a la superficie, reduciendo la disponibilidad para su absorción intestinal y posterior pase a la sangre.
- 2. Producción de la enzima hidrolasa de sales biliares (BSH).** Por acción de las hidrolasas se produce la desconjugación de las sales biliares originando los ácidos biliares, los mismos que son eliminadas en las heces fecales, por lo tanto aumenta la síntesis hepática a partir del colesterol reduciendo así la colesterolemia.
- 3. Produciendo ácidos grasos volátiles en el colon** que pueden ser absorbidos e interferir con el metabolismo de los lípidos en el hígado. **(RAMOS, A y otros. 2012)**

El consumo de probióticos disminuye en el hígado la enzima HMG- CoA reductasa que participa en la síntesis de colesterol, limitando la síntesis endógena de colesterol. Igualmente, los probióticos pueden unirse a la molécula de colesterol en el intestino delgado, habilidad que parece ser cepa específica, o tener la capacidad de convertir el colesterol a coprostanol en el intestino para ser excretado directamente en las heces, permitiendo por un proceso de homeostasis la reducción del colesterol sanguíneo. **(RAMOS, A y otros., 2012)**

1.2.3 LÍPIDOS

GENERALIDADES

Los lípidos químicamente son ésteres de glicerol con gran contenido energético, proporcionan alrededor de 9 kcal/g (38kJ) frente a las 4 kcal/g (17kJ) que originan los carbohidratos y las proteínas. Los lípidos son apolares y necesitan de las sales biliares para estabilizar la emulsión y para facilitar el contacto entre enzima y sustrato, lo que permite la metabolización de los lípidos y su absorción en la pared intestinal. (MURRAY, R y otros. 2001)

Los lípidos son transportados por las lipoproteínas, desde el intestino como quilomicrones y desde el hígado como proteínas de muy baja densidad (VLDL) hacia la mayor parte de los tejidos para su oxidación y hacia el tejido adiposo para su almacenamiento. Los lípidos se movilizan a partir del tejido adiposo como ácidos grasos libres (AGL) unidos a la albúmina sérica. Las anomalías en el metabolismo de las lipoproteínas se presentan en los sitios de producción o de utilización de las mismas, originando **hipo** o **hiperlipoproteinemias**. La más frecuente de estas es la **diabetes mellitus**, en la que la deficiencia de insulina produce movilización excesiva de AGL, y la subutilización de quilomicrones y de VLDL, originando una **hipertriacilglicerolemia**. La mayoría de las patologías que afectan al transporte lipídico se deben principalmente a defectos hereditarios en la síntesis de la porción apoproteínica de la lipoproteína, de enzimas esenciales o de los receptores de lipoproteínas. Algunos de estos defectos producen **hipercolesterolemia** y **arteroesclerosis** prematura. La grasa en exceso provoca **obesidad**; la abdominal en particular constituye un factor de riesgo para el aumento de mortalidad, hipertensión, diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID), hiperlipidemia, hiperglucemia, etc. (MURRAY, R y otros. 2001)

PROPIEDADES FÍSICAS

Son insolubles en disolventes polares (agua) y solubles en disolventes no polares u orgánicos, como el benceno, el éter, la acetona, el cloroformo, etc. Son sustancias

untosas al tacto, tienen brillo graso, son menos densas que el agua y malas conductoras del calor.

Debido a su insolubilidad en agua se presenta el problema de transporte en un medio acuoso, el plasma sanguíneo. Este problema se resuelve al asociar a los lípidos no polares (triacilglicerol y ésteres de colesterol) con lípidos anfipáticos (fosfolípidos y colesterol) y/proteínas, para formar lipoproteínas miscibles en el agua. **(MURRAY, R y otros. 2001)**

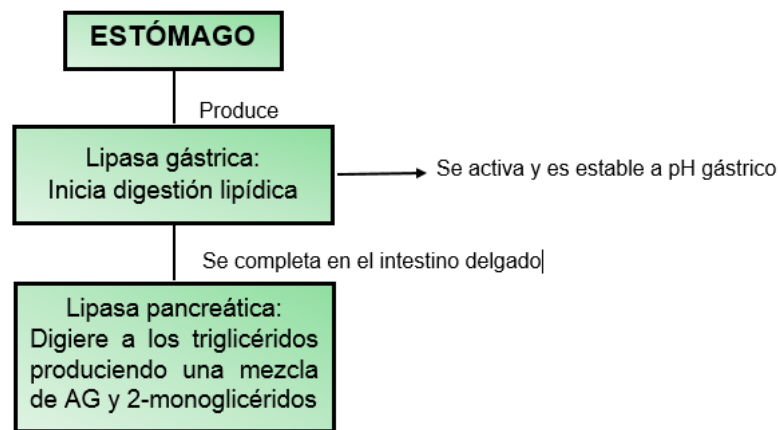
FUNCIONES.

Los lípidos desempeñan varias funciones dentro del organismo, entre ellas tenemos:

- **Estructural:** Forman parte de las membranas celulares.
- **Energética:** Al ser moléculas poco oxidadas sirven de reserva energética pues proporcionan una gran cantidad de energía; la oxidación de un gramo de grasa libera 9,4 Kcal, más del doble que la que se consigue con 1 gramo de glúcido o de proteína (4,1 Kcal).
- **Protectora:** La grasa protege contra los golpes.
- **Termorreguladora:** Los lípidos son excelentes aislantes térmicos, ya que la capa subcutánea de los animales ayuda a mantener la temperatura del cuerpo.
- **Transportadora:** Sirven de transportadores de sustancias en los medios orgánicos. Por ejemplo las sales biliares ayudan a transportar las grasas desde el intestino hacia la sangre.
- **Reguladora del metabolismo:** Contribuyen al normal funcionamiento del organismo. **(SÁNCHEZ, J.2013)**

DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE LÍPIDOS

Una persona adulta ingiere un promedio entre 60 y 150g de grasa al día. Para ayudar a la digestión y absorción de lípidos el hígado secreta bilis que contiene sales biliares y fosfatidilcolina, las cuales funcionan como detergentes para solubilizar la grasa en la dieta. La solubilización facilita la digestión y absorción de la grasa de la dieta. **(ROSKOSKI, R. 2001)**

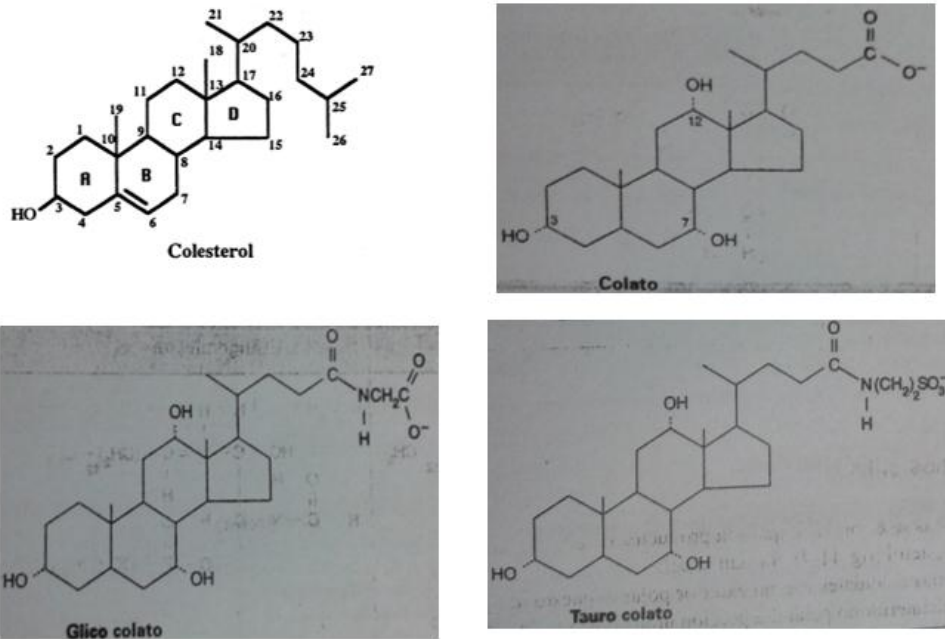


El páncreas a más de secreta la **fosfolipasa** que cataliza la eliminación hidrolítica del grupo 2-acilo de los fosfolípidos produce la **colipasa**, proteína de bajo PM (12 kDa) requerida para la actividad de la de la lipasa pancreática; El jugo pancreático también contiene una **esterasa** que actúa en los monoglicéridos, en los ésteres de colesterol y en los ésteres de la vitamina A. (ROSKOSKI, R. 2001)

Las **sales biliares** son producto de oxidación del colesterol, forman micelas consistentes de partículas coloidales con un exterior polar expuesto al agua y un interior no polar. La porción hidrofóbica de las sales biliares apunta hacia el interior, mientras que los grupos carboxilato y alcohol apuntan hacia el exterior. Además de proveer el vehículo para el transporte de lípidos de la luz intestinal a las células epiteliales, donde ocurre la absorción de AGL, colesterol y vitaminas liposolubles. (ROSKOSKI, R. 2001)

ABSORCIÓN: Luego que los AG y los 2- monoglicéridos son tomados por el epitelio intestinal y convertidos a triglicéridos por las células de la mucosa, los lípidos de la dieta son liberados del intestino a la linfa como **quilomicrones** (constituidos de lípidos y proteínas y representan una forma de lipoproteína circulante). El contenido de los quilomicrones es liberado en los tejidos. (ROSKOSKI, R. 2001)

Los AG de cadena corta y mediana presentes en los alimentos solo en pequeñas cantidades son absorbidos a la sangre portal y entregados al hígado como AGL. Los AG de cadena corta y mediana se desvían de la vía de las lipoproteínas para la absorción intestinal cuya propiedad es ventajosa en uso terapéutico. (ROSKOSKI, R. 2001)



FUENTE: Bioquímica. Roskoski, R. 2001
FIGURA N° 2. ESTRUCTURA DE LAS SALES BILIARES

1.2.3.1 TRIGLICÉRIDOS

Llamados también triacilgliceroles, son compuestos que contienen glicerol al cual están unidos tres ácidos grasos o tres grupos acilo. (ROSKOSKI, R. 2001)

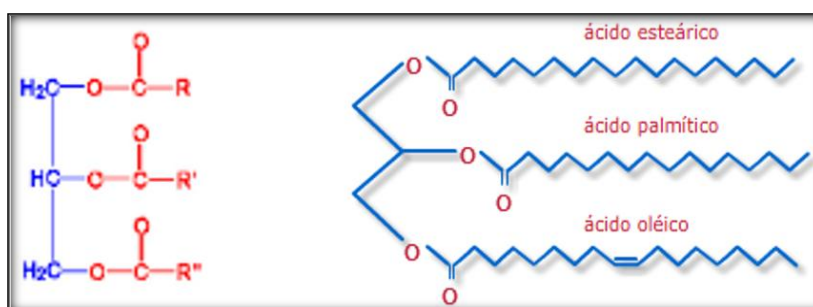
Son los más abundantes en la naturaleza y los principales constituyentes de todas las grasas y aceites; incluyendo el tejido adiposo de los mamíferos, ya que representa más del 95% de su composición. (BADUI, S. 2006)

Características

- Son insolubles en agua y solubles en compuestos orgánicos.
- Se pueden almacenar en las células en forma anhidra, es decir las moléculas no están solvatadas por agua, lo cual ocuparía masa y añadirá masa, reduciendo la eficacia del almacenamiento de energía. (BADUI, S. 2006)

La mayor parte de los lípidos en la dieta humana promedio son triglicéridos. Estos lípidos se descomponen en el intestino delgado por acción de las lipasas. Esas enzimas se sintetizan como zimógenos en el páncreas y son secretadas en el intestino delgado, donde se activan. La lipasa pancreática cataliza la hidrólisis de los ésteres primarios

(en el C-1 y en el C-3) de los triacilgliceroles, liberando los ácidos grasos y generando monoacilgliceroles. La digestión de los lípidos se lleva a cabo en presencia de detergentes energéticos, llamados sales biliares, que son derivados anfipáticos del colesterol. Las micelas de las SB se solubilizan en ácidos grasos y los monoglicéridos, de tal modo que se pueden difundir y ser absorbidos por las células de la pared intestinal. Los lípidos se transportan por el organismo en forma de complejos, llamados lipoproteínas. (SÁNCHEZ, J. 2013)



FUENTE: Bioquímica. Roskoski, R. 2001
FIGURA N° 3. ESTRUCTURA DE LOS TRIGLICÉRIDOS

1.2.3.1.1 Valores de referencia

Los siguientes valores discriminantes universales han sido establecidos por el US National Institutes of Health y también aceptados en otros países para la evaluación del riesgo. (BioSystems)

TABLA IV. VALORES REFERENCIALES DE LOS TRIGLICÉRIDOS

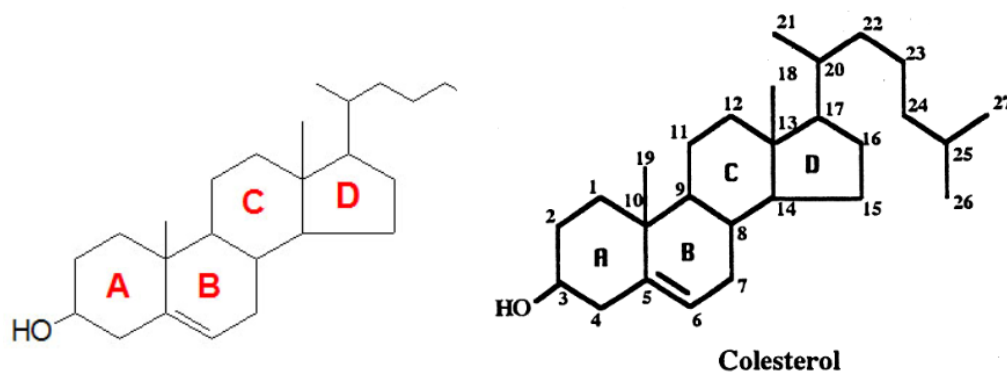
mg/dL	mmol/L	Descripción
Hasta 150 mg/dL	1,7 mmol/L	Bajo
150-199 mg/dL	1,70-2,25 mmol/L	Dudoso
200-499 mg/dL	2,26-5,64 mmol/L	Alto
> 500 mg/dL	5,65 mmol/L	Muy alto

Fuente: BioSystems

1.2.3.2 COLESTEROL

Colesterol viene del francés chole: bilis y del griego stereos: sólido o, literalmente, bilis sólida. Es un esteroide de 27 átomos de carbono, precursor de las sales biliares y de las hormonas esteroideas, tales como progesterona, testosterona, estradiol y cortisol. El colesterol forma parte de todas las células del organismo humano y es necesario, en la

proporción adecuada, para su buen funcionamiento, estando presente en la bilis y en la sangre.



FUENTE: Colesterol. Wikipedia 2012

FIGURA N° 4. ESTRUCTURA DEL COLESTEROL

El colesterol del organismo tiene dos orígenes:

- a. Endógeno, procedente de la síntesis de novo y
- b. Exógeno, procedente de la dieta.

El colesterol se absorbe en el intestino gracias a los ácidos biliares y a los fosfolípidos que son vertidos desde el hígado. En cuanto a la síntesis endógena, el hígado contribuye aproximadamente en un 20% a la síntesis en todo el organismo. Esta síntesis se produce a partir de acetil-CoA, en una ruta metabólica en la que la enzima limitante es la HMG-CoA reductasa. (MURRAY, R y MAYES, P. 2001)

El equilibrio entre los compartimentos hepáticos de colesterol (libre y esterificado) es clave para la regulación de los niveles de colesterol en sangre. Dicho equilibrio se mantiene gracias a dos enzimas: la acilcoenzima A, colesterol aciltransferasa y la colesterol éster hidrolasa. Cuando los niveles de colesterol en el hepatocito se elevan, la célula debe activar los procesos fisiológicos pertinentes para evitar la toxicidad que el colesterol libre provoca. Otro aspecto importante del metabolismo del colesterol es la síntesis de ácidos biliares. Éstos son sintetizados en el hígado y reciclados gracias a circulación enterohepática. Se trata de un proceso complejo cuya función es transportar los ácidos biliares desde el intestino delgado a la circulación portal, de ésta al hepatocito, de ahí a bilis y finalmente desde la vesícula biliar al intestino. (MURRAY, R y MAYES, P. 2001)

El colesterol es eliminado por dos vías principales: la conversión en ácidos biliares y la excreción como esteroides neutros en las heces fecales. (MURRAY, R y MAYES, P. 2001)

1.2.3.2.1 Valores de referencia

TABLA V. VALORES DE REFERENCIA DEL COLESTEROL

VALORES	DESCRIPCIÓN
Menos de 200 mg/dL	Deseable (menor riesgo)
200 a 239 mg/dL	Límite elevado (mayor riesgo)
240 mg/dL y superior	Colesterol en la sangre elevado

FUENTE: American Heart Association. Colesterol

1.2.3.2.2 Biosíntesis del colesterol

La síntesis de Novo de colesterol ocurre virtualmente en todas las células humanas, siendo mayor en el hígado (en el citoplasma de los hepatocitos), el intestino, en la corteza suprarrenal y en los tejidos reproductores (ovarios, testículos y placenta). La biosíntesis del colesterol ocurre en el citoplasma de las células y es impulsado en gran parte, por la energía que proviene de la hidrólisis de los enlaces tioéster de alta energía del acetilCoA y los enlaces de alta energía del ATP. (MURRAY, R y MAYES, P. 2001)

En la biosíntesis del colesterol se consideran 3 etapas:

1. Conversión de acetatos en Mevalonato.
2. Transformación del ácido mevalónico en escualeno.
3. Conversión de escualeno en colesterol.

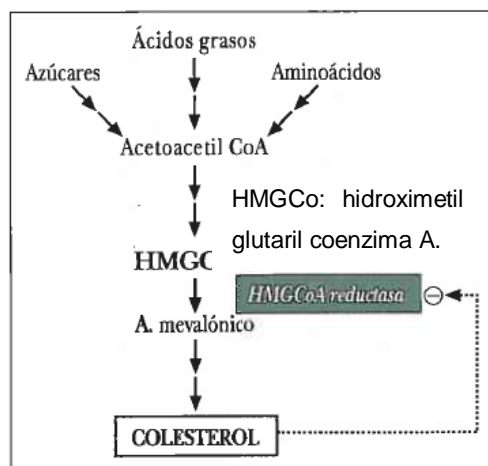


FIGURA N° 5. BIOSÍNTESIS DEL COLESTEROL

1.2.3.2.1.1 Conversión de acetato en mevalonato

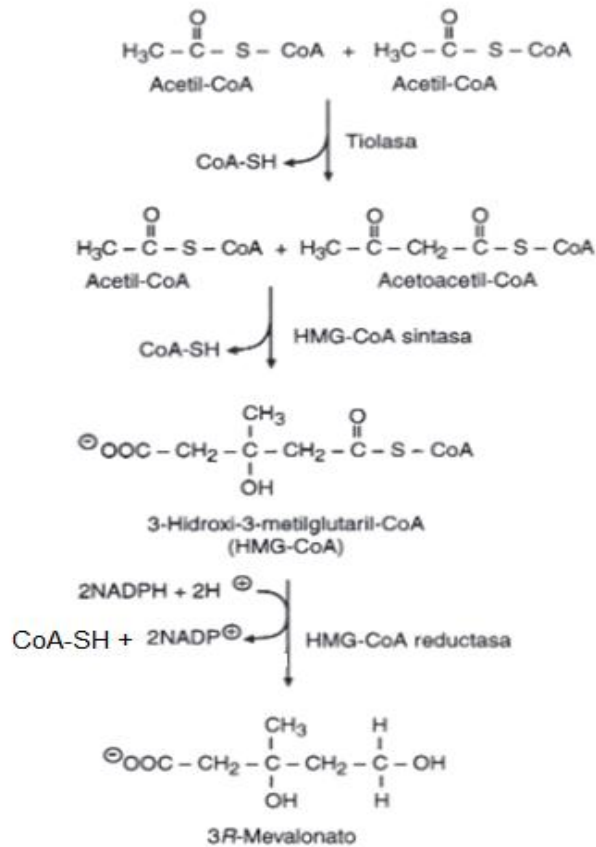
Se condensan dos moléculas de acetilCoA para formar acetoacetilCoA en una reacción catalizada por la enzima citosólica acetoacetil CoA tiolasa, en la que se produce la ruptura de un enlace tioéster y la generación de coenzima A libre (CoASH). Como alternativa en el hígado el cetoacetato formado en el interior de la mitocondria por vía de la cetogénesis propaga al citosol pudiendo activarse a acetoacetil-CoA mediante la acetoacetil-CoA sintetasa, la cual requiere de ATP y CoA. La acetoacetil-CoA se condensa con una molécula de acetilCoA, reacción catalizada por la HMG-CoA sintasa para formar HMG-CoA. (MURRAY, R y MAYES, P. 2001)

La HMG-CoA se convierte en mevalonato, cuya reacción es catalizada por la enzima microsomal, HMG-CoA reductasa que requiere NADPH como reductor. En esta reacción se consumen 2 moles de NADPH por cada mol de HMG-CoA, se produce la hidrólisis del enlace tioéster del HMG-CoA y se genera un alcohol primario del mevalonato. Esta reacción de reducción es irreversible y da un producto de seis átomos de carbono.

La HMG-CoA reductasa cataliza el paso limitante de la velocidad en la vía de la síntesis de colesterol y constituye un sitio de acción eficaz de los fármacos hipocolesterolemiantes, los inhibidores de la HMG-CoA reductasa (estatinas). (MURRAY, R y MAYES, P. 2001)

El mevalonato es el primer compuesto perteneciente a la síntesis de colesterol y la acetilCoA se puede obtener a partir de:

1. β -oxidación de AG de cadena larga
2. Oxidación de aminoácidos cetogénicos, como leucina e isoleucina
3. Reacción de la piruvato deshidrogenasa
4. Activación del acetato libre con ATP en una reacción catalizada por la enzima acetoquinasa (o acetato tioquinasa). (HORTON, R y otros. 2008)



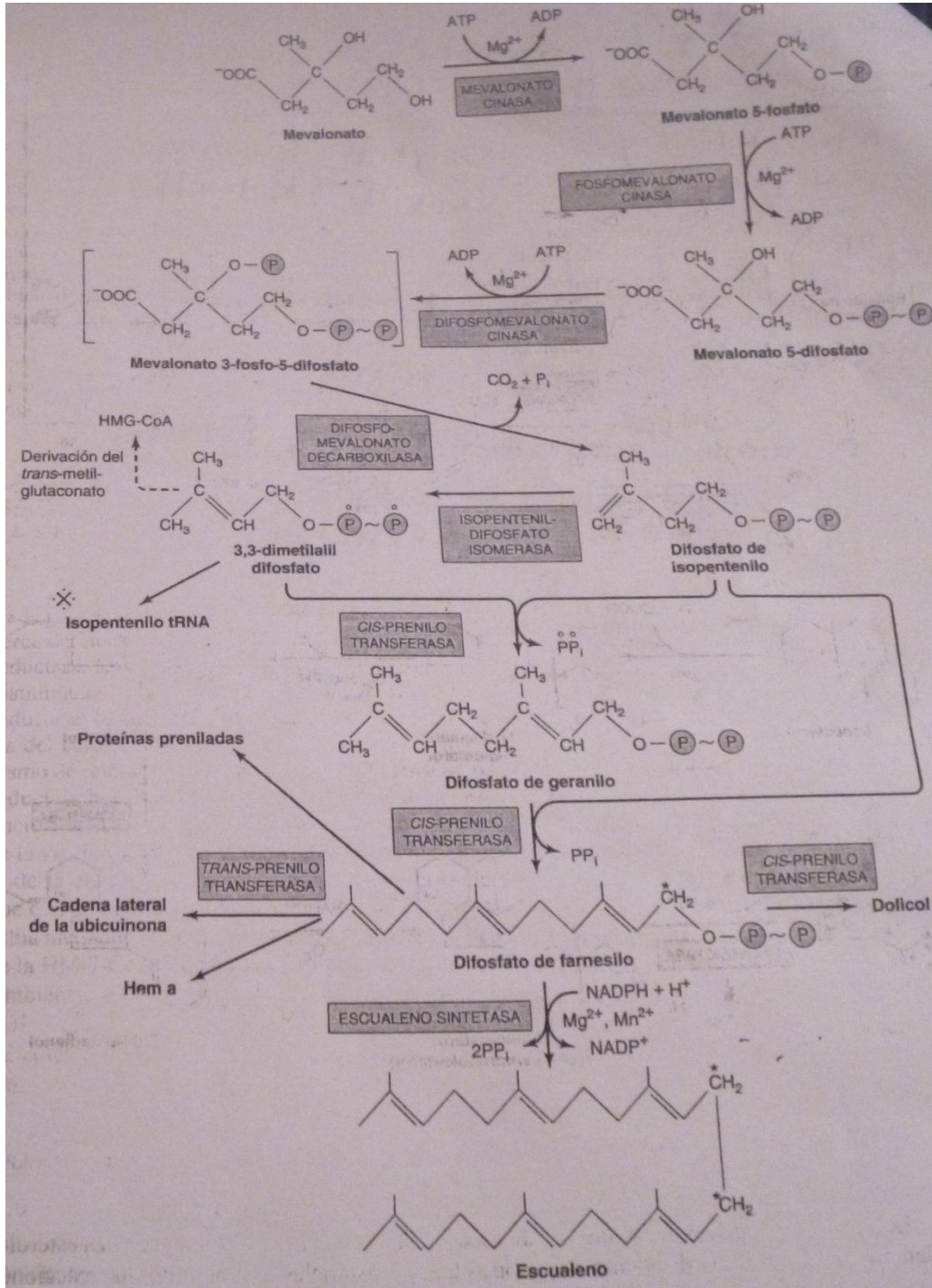
FUENTE: Bioquímica: Roskoski. 2001

FIGURA N° 6. CONVERSIÓN DEL ACETATO EN MELAVONATO

1.2.3.2.1.2 Conversión de mevalonato en escualeno

El mevalonato se fosforila mediante el ATP para formar varios intermediarios fosforilados activos, la unidad isoprenoide activa, el **difosfato de isopentilo**, se forma mediante descarboxilación. A continuación se condensan 3 moléculas de difosfato de isopenteno para formar difosfato de farnesilo. Esto acontece mediante una isomeración del difosfato de isopenteno que implica un desplazamiento del doble enlace para formar difosfato de dimetilalilo, seguido de la condensación con otra molécula de difosfato de isopenteno para formar el intermediario de 10 carbonos, el difosfato de geranilo. La condensación subsecuente con el difosfato de isopenteno forma difosfato de farnesilo. A continuación, se produce la fusión de dos moléculas de farnesil pirofosfato (condensación cabeza-cabeza) para generar una molécula de 30 átomos de carbono denominada escualeno, con liberación de dos grupos pirofosfato. Esta reacción

es catalizada por la enzima microsomal escualeno sintetasa que requiere NADPH. La estructura del escualeno es bastante similar a la del colesterol aunque carece de grupos hidroxilo. (MURRAY, R y MAYES, P. 2001)

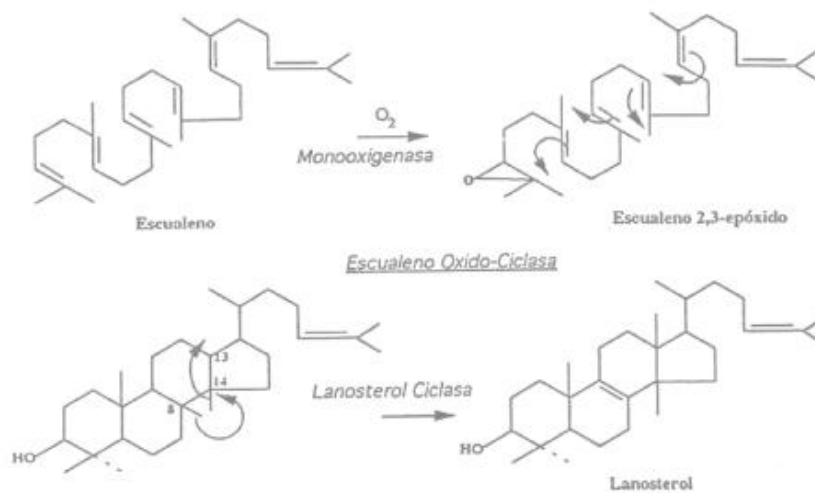


FUENTE: Síntesis, transporte y excreción del colesterol., MURRAY R y MAYES P. 2001

FIGURA N° 7. CONVERSIÓN DEL MELAVONATO EN ESCUALENO

1.2.3.2.1.3 Conversión del escualeno en colesterol

Esta última etapa tiene lugar en las membrana del retículo endoplásmico e involucran cambios en el núcleo esteroideo este proceso biosintético comienza con la ciclación y en la cadena lateral. El grupo metilo en C₁₄ se oxida a CO₂ para formar 14-desmetilo lanosterol. De igual manera se eliminan dos grupos metilos adicionales en C₄ para producir cimosterol, el mismo que origina al $\Delta^{7,24}$ -colestadienol por desplazamiento del doble enlace entre C₈ y C₉ a las posiciones C₈ y C₇. En este punto se origina el demosterol, por desplazamiento subsecuente del doble enlace en el anillo B, para adquirir una posición entre C₅ y C₆, igual que el colesterol. Por último se reduce el doble enlace de la cadena lateral originando el colesterol. (MURRAY, R y MAYES, P. 2001)



FUENTE: MURRAY R y MAYES P. 2001

FIGURA N° 8. CONVERSIÓN DEL ESCUALENO A COLESTEROL.

Recuerda que por cada mol de acetilCoA requerido en el citoplasma se utiliza una mol de ATP, de manera que el gasto energético total se incrementa en 18 moles más de ATP, es decir que el requerimiento energético total para la síntesis de una mol de colesterol es de 36 moles de ATP, cuando se considera el proceso a partir del acetilCoA mitocondrial.(MURRAY, R y MAYES, P. 2001)

1.2.3.3 Regulación de la síntesis de colesterol

La reserva corporal de colesterol proviene de:

- 1) La absorción de colesterol de la dieta y
- 2) de su biosíntesis, principalmente en el hígado e intestino. Cuando se reduce la cantidad de colesterol de la dieta, se estimula su síntesis para satisfacer los requerimientos celulares. El colesterol obtenido mediante síntesis de novo es transportado desde el hígado y al intestino a los demás tejidos en forma de lipoproteínas. Estos dos tejidos son los únicos capaces de producir apolipoproteína B, el componente proteico de las principales lipoproteínas transportadoras de colesterol: LDL y VLDL. La mayor parte de apolipoproteína B se secreta a la circulación en forma de VLDL, que se convierte en LDL en el plasma y en el hígado, al eliminarse los triacilglicéridos y la apoproteína C. Por el contrario, cuando la ingesta de colesterol aumenta, la síntesis de novo se suprime casi totalmente. Por lo tanto, la velocidad de síntesis de colesterol está en relación inversa con la cantidad de colesterol que se ingiere con la dieta, dado que el principal regulador de la síntesis de novo de colesterol es el propio colesterol. (SÁNCHEZ, J. 2013)

Al parecer la reacción de la HMG-CoA reductasa es el sitio principal para regular la síntesis del colesterol. La HMG-CoA reductasa tiene tres mecanismos de regulación: modificación covalente, represión de la transcripción y control de la degradación, que la hacen una de las enzimas más reguladas que se conocen. El control a corto plazo es influido por la modificación covalente: la HMG-CoA reductasa es una enzima interconvertible que se desactiva por fosforilación. Esa fosforilación es catalizada por una proteína cinasa, activada por el AMP, que también puede catalizar la fosforilación e inactivación concomitante de la HMG-CoA carboxilasa. La acción de la cinasa parece disminuir la síntesis del colesterol y de los ácidos grasos, ambas consumidoras de ATP, cuando suben las concentraciones de AMP. La cantidad de la HMG-CoA reductasa en las células también está controlada. El colesterol (colesterol endógeno liberado por las lipoproteínas en el plasma, o el de la dieta liberado por los quilomicrones) puede suprimir la transcripción del gen que codifica la HMG-CoA reductasa. Además, las altas concentraciones del colesterol, y sus derivados aumentan la velocidad de

degradación de la HMG-CoA reductasa, quizá al aumentar la velocidad de transporte de la enzima unida a la membrana hacia el sitio de su degradación. **(SÁNCHEZ, J. 2013)**

Al disminuir las concentraciones del colesterol en el suero disminuye el riesgo de la cardiopatía coronaria. Varios medicamentos llamados estatinas son inhibidores potentes de la HMG-CoA reductasa. Con frecuencia se usan las estatinas como parte del tratamiento de la hipercolesterolemia. Pueden hacer bajar con eficacia las concentraciones de colesterol en la sangre. Otro método es unir las sales biliares en el intestino a las partículas de resina, para evitar su reabsorción. Entonces se debe convertir más colesterol a sales biliares. Quizá la inhibición de la HMG-CoA reductasa no sea el método más adecuado para controlar la concentración del colesterol, porque se necesita melavonato para la síntesis de moléculas importantes, como la ubiquinona. **(SÁNCHEZ, J. 2013)**

1.2.3.4 Regulación de la colesterolemia

Desde el punto de vista clínico, la determinación de los niveles de colesterol en plasma es la información más relevante. La concentración plasmática de colesterol considerada normal en un individuo sano se encuentra en un rango de 120 a 220 mg/dl, de manera tal que el valor medio en individuos adultos jóvenes es de 175 mg/dl. Las determinaciones bioquímicas de colesterol plasmático suelen realizarse luego de un ayuno de 12-14 h, de manera tal que el paciente no contenga colesterol en forma de quilomicrones plasmáticos. De esta forma, la lipoproteína más abundante es la LDL que contiene aproximadamente el 70% del colesterol plasmático. **(ROSKOSKI, R. 2001)**

En general, los valores plasmáticos de colesterol son mayores en los varones que en las mujeres. Como ya mencionamos, el principal mecanismo de control de los niveles de colesterol, está dado por la retroinhibición de su síntesis, además de que un alto contenido de colesterol lleva también a un aumento de su excreción. Las fallas en los mecanismos de control provocan un aumento en los niveles circulantes que a largo plazo causan la deposición de placas ateroscleróticas que aumentan la rigidez vascular.

Con una dieta controlada, puede lograrse una reducción en la colesterolemia de entre un 10 a un 20% en la mayoría de los casos y dado que múltiples estudios epidemiológicos avalan una mayor incidencia en infarto de miocardio o infarto cerebral, la primera recomendación en el caso de hipercolesterolemia es el control de la dieta. **(ROSKOSKI, R. 2001)**

En aquellos casos en los que la restricción de colesterol de la dieta no es suficiente, se suele recurrir a terapias farmacológicas, que consisten en la administración de fármacos que reducen la colesterolemia. **(ROSKOSKI, R. 2001)**

1.3 ALIMENTO FERMENTADO

Los alimentos fermentados son alimentos que han estado sujetos a la acción de microorganismos o enzimas de tal forma que, los cambios originados por estos causan modificaciones a los alimentos. Los microorganismos de interés son bacterias, mohos y levaduras. Mediante la fermentación se puede prolongar la conservación de los alimentos, incrementar variedad en la dieta y además brindan efectos beneficiosos.

1.3.1 Historia del *Manchurian fungus*.



Kombucha, conocido también como el hongo del té negro, proviene del Asia del este. Aproximadamente hace 2.200 años se dice que en china lo utilizaron para llegar a la inmortalidad. El consumo del té fermentado se descubrió por primera vez en Manchuria, 220 años a.C., luego se extendió a Rusia, Alemania (durante la segunda guerra mundial) y finalmente a Francia, donde su consumo se volvió muy popular, como posteriormente lo hacia en Estados Unidos. Esta popularidad se debe en gran parte a los efectos curativos que se le atribuyen, siendo en los últimos años su consumo muy popular en América y en los países del centro y norte

de Europa. Una tradición cuenta que en el año 414 a.C. un monje tibetano amante de la naturaleza llamado “Kombu” fue a la casa real del emperador Inkyo y le regaló el hongo de la Kombucha. El emperador probó la bebida según las indicaciones y disfrutó tanto que quedó prendado de inmediato, a partir de ese momento se convirtió en un gran “Kombuchista”, recomendando la fabricación en todo su imperio. El éxito se extendió rápidamente y así esta legendaria bebida obtuvo su nombre: “Kombucha” que traducido significa “té de Kombu”. (STEVENS, N. 2003)

La exploración científica de los hongos comenzó en la década de 1950, con el Instituto Bacteriológico de Moscú (como parte de sus proyectos de investigación del estudio del cáncer en todo el país). Descubrieron que no era un solo organismo sino una colonia simbiótica de varias bacterias y levaduras con vías metabólicas altamente complejas y sofisticadas. Este grupo de organismos muestra un efecto antibiótico distinto a través de la presencia de ácido úsnico que está presente en algunos líquenes. También existen evidencias de que el ácido úsnico puede desactivar ciertos grupos de virus. Como dato curioso en la historia del hongo medicinal, se comenta que los científicos rusos realizaron un profundo estudio para detectar la incidencia de cáncer en todos los distritos de la URSS (Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas actualmente Rusia), y fue el caso en las Montañas Urales Occidentales, que difícilmente se registraban casos de cáncer. (STEVENS, N. 2003)

Lo más sorprendente para los investigadores fue que en esta área se fabricaban metales altamente tóxicos, como potasio, plomo y mercurio junto con los asbestos, lo que resultaba uno de los lugares más tóxicos del país, y ésto fue comprobado por los peces muertos que flotaban en el río Kama, y muchas otras especies de árboles que se empezaron a marchitar. Al realizar las respectivas investigaciones en dicho lugar se llegó a determinar que las personas no tenían cáncer porque consumían Kombucha. No obstante en 1928, el White Flag, reportó que el Kombucha era conocido en ese entonces por los efectos benéficos en la desintoxicación del organismo, limpieza de la sangre, el alivio rápido de erupciones cutáneas en el rostro, dolores de extremidades, gota, dolores constantes de cabeza, reumatismo y problemas del envejecimiento en general. (STEVENS, N. 2003)

En la década de los 60 se realizaron en Suiza numerosas investigaciones científicas sobre la Kombucha llegando a la conclusión de que sus efectos son tan saludables como el yogur. Entre otras investigaciones médicas destaca la investigación del Dr. Rudolf Sklenar que desde 1951 hasta su fallecimiento en el año de 1987 trataba a la mayoría de sus pacientes dando té de Kombucha, manifestando siempre que con la Kombucha obtenía efectos terapéuticos satisfactorios en el tratamiento de enfermedades metabólicas y también en el tratamiento de enfermedades crónicas, sin haber observado jamás efecto negativo alguno. (STEVENS, N. 2003)

Los atractivos con que cuenta son múltiples: es una bebida tradicional, barata, saludable y sobretodo ajena a los procesos industriales y comerciales que tanto daño están haciendo en la actualidad. (STEVENS, N. 2003)

1.3.2 Descripción de Kombucha



Kombucha es una bebida no alcohólica fermentada, tradicional con una historia de miles de años, la misma que se prepara fermentando el té negro endulzado con el cultivo orgánico de *Manchurian fungus*, que es una simbiosis de bacterias (*Acetobacter* spp y *Gluconobacter* sp) y levaduras (*Saccharomyces* spp). (AMMAR, E y otros. 2012)

Se denomina Kombucha tanto al fermento madre utilizada como a la bebida resultante, sin embargo vamos a llamar a cada cosa por su nombre y designar como Kombucha a la madre productora del fermento y como té de Kombucha a la bebida resultante. Frecuentemente se lo llama hongo, debido a su aspecto y textura, pero la Kombucha no es un hongo, sino una colonia de bacterias y levaduras que viven en simbiosis. El té de Kombucha es una bebida de té negro azucarado fermentado con *Manchurian fungus*, dicho té está compuesto de dos porciones: la capa flotante de celulosa y el caldo líquido agrio. Inicialmente comienza siendo una película gelatinosa transparente, que pronto se va opacando por los bordes hasta llegar a cubrir toda la superficie del líquido, adquiriendo así una forma redonda, dependiendo del borde del recipiente. Mientras se degrada el

azúcar el té se vuelve ácido, como productos de dicha degradación se obtienen ciertos ácidos y enzimas responsables del sabor característico y de sus efectos benéficos. **(RUBIO, A. 2012)**

Transcurridos entre ocho o catorce días dependiendo de las condiciones ambientales, el cultivo habrá alcanzado un grosor aproximado de entre 7 y 12 milímetros y el té presentará un sabor ligeramente achampañado; entonces es el momento de cosecharlo ya que si se deja más tiempo fermentar este se irá acidificando cada vez más hasta convertirse en vinagre. Si se deja fermentar la bebida por mayor tiempo la cantidad de azúcar será baja y existirá más de alcohol. El té fermentado se guarda en el refrigerador con el objeto de inhibir el crecimiento bacteriano y su vez proveerle un aspecto agradable al consumidor; siempre y cuando guardándose una pequeña cantidad de té fermentado que servirá para iniciar una nueva fermentación. **(STEVENS, N. 2003)**

Nota: En una semana a 22-25° C tenemos una bebida refrescante y nutritiva apta para el consumo y después de 15 días un vinagre suave antiséptico muy medicinal y adecuado para agregar a los alimentos en su consumo mejorando la textura el sabor y la digestión (ensaladas, legumbres cocidas, pescados etc.) o como preservativo natural para encurtidos, marinadas y escabeches.

1.3.3 Utensilios e ingredientes

1.3.3.1 Utensilios.

- **Olla de acero inoxidable.** Evitar usar material de aluminio, hierro o cobre.
- **Recipiente de boca ancha.** Mayor que la capacidad del líquido utilizado. El ideal es el que permita 1/3 de espacio para el aire permitiendo al líquido mantener iguales proporciones entre altura y anchura o diámetro. Esto permite una correcta oxigenación. En la fermentación hay que evitar los materiales metálicos o de componentes metálicos. Usar barro, vidrio o plástico adecuados

para alimentos ácidos. Algunos vidrios pueden contener metales pesados procedentes de los moldes y los tintes para el coloreado al igual que los plásticos. EL VIDRIO TIENE QUE SER TOTALMENTE TRANSPARENTE.

- **Colador** de rejilla si se usa té suelto.
- **Lienzo fino** que deje pasar el aire pero no el polvo [lino, papel o algodón] para tapar la boca del recipiente.
- **Banda elástica** o cordel para sujetar el Lienzo. **(RUBIO, A.2012)**

1.3.3.2 Ingredientes

1.3.3.2.1 Azúcar.

Se recomienda utilizar azúcar blanca para la fermentación de la Kombucha ya que si se utiliza otros edulcorantes como azúcar integral o miel de abeja no se obtiene un té de calidad. Si se fermenta con azúcar integral se obtiene un té con poca acidez, de aspecto turbio y sabor desagradable. Al parecer ciertas sustancias presentes en el azúcar integral (posiblemente impurezas naturales como fragmentos de caña) interfieren con el desarrollo de algunos microorganismos presentes en la Kombucha. **(STEVENS, N. 2003)**

Las primeras fermentaciones de la Kombucha con miel de abeja pueden resultar aceptables, si el cultivo se sigue alimentando con miel en lugar de sacarosa muere pronto. Los componentes de la miel interfieren con la actividad de las bacterias que son parte esencial de la Kombucha, alterando su desarrollo normal y su metabolismo. **(STEVENS, N. 2003)**

Los endulzantes artificiales como la sacarina no suministran energía alguna, sólo endulzan la bebida, por lo no tiene efecto usarlo para la Kombucha. Es importante recordar que el azúcar en la Kombucha es utilizado por los microorganismos como alimento y no como endulzante; pues a medida que avanza la fermentación lo irán descomponiendo en diversas sustancias llegando a ser mínima la concentración de

azúcar cuando la fermentación haya concluido, es decir cuanto más ácido sea el té menor será su contenido de azúcares. (RUBIO, A. 2012)

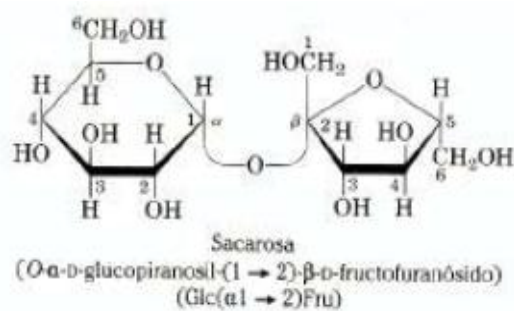
Gran parte de la sacarosa añadida al té es convertida en alcohol (etanol), que al quinto o sexto día comienza a ser transformado en ácido acético. El té fermentado contiene entre 0,4% y 0,5% de etanol, dependiendo del tiempo y de las condiciones de fermentación. Según la ley, toda bebida con un contenido de alcohol inferior a 0,5% puede denominarse bebida “sin alcohol”. (STEVENS, N. 2003)

SACAROSA C₁₂H₂₂O₁₁



Comúnmente conocida como azúcar de mesa; es un disacárido no reductor formado por la unión de 2 monosacáridos: glucosa y fructosa. Es soluble en agua, ligeramente soluble en alcohol y éter. Es dextrógira; es decir, desvía el plano de polarización de la luz hacia la derecha con una rotación específica de +66,5°, que cambia a levorrotatoria al ser hidrolizada (por el mayor poder rotatorio de la fructosa).

Este fenómeno se conoce como “inversión de la sacarosa”, el mismo que tiene lugar en el intestino gracias a la intervención de las enzimas invertasa y sacarasa. Las principales fuentes para la obtención de sacarosa son la caña de azúcar o la remolacha.



FUENTE: Sacarosa. Wikipedia 2011.

FIGURA N° 9. SACAROSA

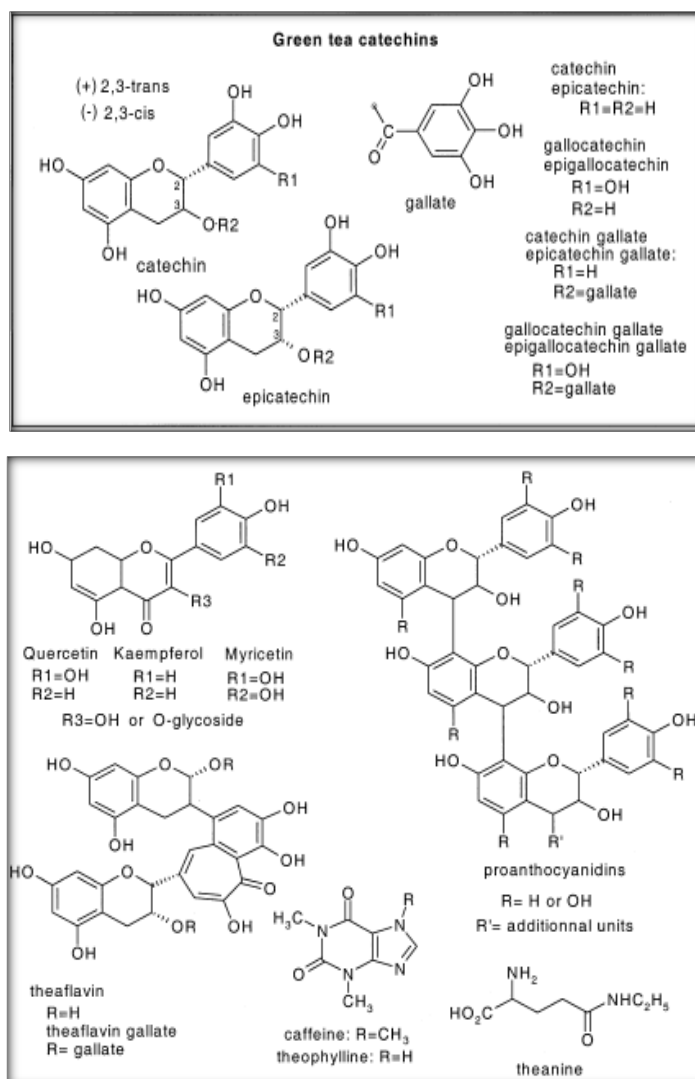
1.3.3.2.2 Té negro

Los estudios realizados han demostrado que la Kombucha elaborada con té negro produce altas concentraciones de ácidos glucónico, láctico y acético, por lo que la descomposición de la glucosa en él se realiza de un modo mucho más efectivo que en otros sustratos. Además de conferir al producto final su sabor particular y sus cualidades medicinales; el té es una importante fuente de nutrientes minerales para el cultivo.

Uno de los factores que diferencian la fermentación del té de las otras hierbas o extractos frutales es su elevado contenido en taninos. Los taninos llamados también polifenoles son moléculas grandes y complejas cuyos efectos sobre las membranas mucosas del cuerpo son astringentes y condensantes, además poseen cualidades bactericidas. Los taninos del té inhiben parcialmente el proceso de fermentación, por esta razón el contenido final de alcohol en la bebida es tan bajo. Los tés de hierbas suelen contener una cantidad mayor de aceites volátiles (aceites esenciales) lo cual interfiere con las bacterias del Kombucha, dando como resultado final una bebida de baja calidad. **(RUBIO, A. 2012)**

1.3.3.2.2.1 Composición química del té

Contiene polifenoles, flavonoides (teoflavinas y teorubiginas), catequinas, cafeína, los galatos de la catequina, adenina, teobromina, teofilina, ácidos gálicos, taninos, galotatinos, pequeñas cantidades de aminofilina y un aceite amarillo volátil que es sólido a las temperaturas ordinarias y tiene un fuerte olor y sabor aromático. La actividad antioxidante depende de la estructura de los radicales libres en los compuestos, de los sustituyentes presentes en los anillos de los flavonoides y del grado de polimerización. **(RUBIO, y STEVENS, N. 2000)**



FUENTE: Tea, Kombucha, and health: a review. DUFRESNE C. 2000.

FIGURA N° 10. ESTRUCTURAS DE ALGUNOS CONSTITUYENTES DEL TÉ

1.3.3.2.2 Beneficios del té negro

El té negro posee las siguientes propiedades:

- a. Antioxidante:** Debido a la presencia de los polifenoles. Los antioxidantes protegen al organismo contra los efectos de los radicales libres, los mismo que son un problema muy serio llegando a ser una de las principales causas de varias enfermedades como el Parkinson, problemas degenerativos del sistema cardiovascular, envejecimiento prematuro de la piel, cáncer, etc.

- b. Astringente:** Los responsables de esta propiedad son los taninos, que le confieren el sabor amargo y su consumo es ideal para combatir la diarrea o la gastritis.
- c. Diurético:** El té negro promueve la eliminación de líquidos del organismo.
- d. Reconfortante y bajo en calorías:** es muy bajo en calorías y a la vez da una sensación de saciedad, siendo ideal para reemplazar otras bebidas que aportan gran cantidad de calorías.
- e. Estimulante:** Debido a la presencia de cafeína que ayuda a mantener despierto tanto al cuerpo como a la mente, siendo ideal consumirlo en el desayuno o después de las comidas.

1.3.3.2.3 Agua

El agua si es posible de manantial, sino embotellada o filtrada. En último de los casos, si se usa agua del grifo, esta debe de ser reposada de 32 a 48 horas o hervida durante 5 a 10 minutos para que se evapore todo el cloro. Para oxigenar el agua reposada se bate con una varilla de agitación después de hacer la infusión.

Algunos entendidos en el cultivo de Kombucha sugieren usar agua destilada fundamentando que el cultivo adquiere los nutrientes necesarios del té y del azúcar ya que el agua puede ser portadora de bacterias patógenas resistentes al calor. Sin embargo si el agua de manantial es embotellada y de buena calidad sin duda será la mejor para de esta forma conservar la salud del consumidor. (**RUBIO, A. 2012 y STEVENS, N. 2000**)

1.3.3.2.4 Oxígeno

El oxígeno es fundamental en la fermentación aeróbica, es un ingrediente necesario para la correcta elaboración del té de Kombucha como también para la obtención de un cultivo sano y vigoroso. El oxígeno para la respiración de las colonias de Kombucha es tomado del aire circundante y del medio líquido de intercambio por lo que un té bien

oxigenado es una buena manera de empezar la fermentación. Para obtener un aporte adicional de oxígeno en la infusión esta se agita fuertemente con un par de varillas de vidrio o con un par de palillos chinos higiénicos. Esto es estrictamente necesario cuando el agua lleva mucho tiempo reposada en botellas o depósitos. (STEVENS, N. 2000)

El lugar donde reposa el recipiente de cultivo debe ser suficientemente ventilado, libre de contaminantes como el humo de tabaco, vapores de productos químicos y de la cocina, sobre todo si ésta no dispone de un extractor y no está ventilada adecuadamente ya que el cultivo tomará superficialmente el oxígeno del aire circundante. (RUBIO, A. 2012 y STEVENS, N. 2000)

1.3.3.2.5 Complejo microbiano:

La cantidad del complejo microbiano depende de la cantidad de bebida que se desea preparar.

1.3.3.2.5.1 Composición (Microbiota)

El té de Kombucha es una colonia viva de hongos y bacterias en crecimiento simbiótico, las mismas que puede variar dependiendo de las condiciones locales de cultivo y de los materiales empleados en la elaboración del té de Kombucha. Las principales bacterias ácido acéticas encontradas en la Kombucha son: *Acetobacter xylinum*, *A. xylinoides*, *Bacterium gluconicum*, *A. aceti*, *Acetobacter ketogenum*, *A. pasteurianum*, *Gluconobacter bluconicum*. Las levaduras identificadas en el té fermentado son: *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Kloeckera apiculata*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces lambicus*, *Brettanomyces custersii*, *Candida stellata*. Furthermore. Además otras especies de *Candida* y *Pichia* que han sido aisladas en el hongo de té. (AMMAR, H. 2012)

El *Acetobacter xylinum* tiene la habilidad de sintetizar una capa de red celulósica que mejora la asociación entre hongos y bacterias. Las levaduras convierten la sacarosa en

glucosa y fructosa produciendo etanol, CO₂. Las bacterias ácido acéticas convierten la glucosa en ácido glucorónico y la fructosa en ácido acético. Tanto la cafeína como las xantinas de la infusión del té estimulan a las bacterias respectivas a la síntesis de celulosa. El ácido acético estimula a las levaduras a la producción de etanol, que a su vez el etanol puede ser útil para el crecimiento de las bacterias ácido acéticas y producción de ácido acético. Tanto el etanol como el ácido acético se han reportado que poseen actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas ajenas al cultivo de Kombucha, proporcionándole protección, lo cual explica su supervivencia en el tiempo. **(CHEN, C y otros. 2005)**

La levadura *Pichia fermentans* fermenta la glucosa produciendo ácido láctico, al igual que la *S. ludwigii* que fermenta la glucosa, sacarosa y su acción es inhibida totalmente por la luz directa del sol. **(DUFRESNE, C y otros. 2000)**

Las bacterias y levaduras presentes en el Kombucha forman una simbiosis poderosa capaz inhibir el crecimiento potencial de bacterias contaminantes. **(DUFRESNE, C. 2013)**

1.3.4 ¿Cómo es Kombucha?

Kombucha se presenta como una tela fina sobre la superficie del líquido, la misma que adquiere la forma del envase y a medida que la fermentación avanza se va engrosando el cultivo, una vez alcanzado su dimensión este va creciendo en forma de capas hacia arriba acumulándose una sobre otra. La masa resultante es escurridiza, gelatinosa de color blanco, crema o pardo (se oscurece con los tintes del té). **(RUBIO, A. 2012)**



1.3.5 ¿Cómo se genera el hongo?

Se desarrolla flotando en la superficie como un gel transparente que luego se consolida en una estructura fuerte y gomosa originando la madre. Mientras se desarrolla la simbiosis microbiana esta va tomando la forma del recipiente donde se la cultiva; en dicha simbiosis se encuentran diversos microorganismos como bacterias y levaduras beneficiosas que la denominamos “microbiota amiga”. Se reproduce replicándose en cada elaboración del té fermentado, al formar una nueva membrana en la superficie, que va engrosando el cultivo, (en ocasiones la madre del cultivo se hunde hasta el medio o el fondo del recipiente dando lugar a una nueva madre de Kombucha sobre la superficie). Básicamente la madre está compuesta por celulosa. **(RUBIO, A. 2012 y STEVENS, N. 2000)**

1.3.5.1 Consideraciones a tener en cuenta para la elaboración del té

La luz debe ser tenue o nula. El sol directo degradará algunas vitaminas y puede perjudicar al cultivo. El lugar donde reposa el recipiente debe estar ventilada con regularidad y no estar expuesta a focos contaminantes como cocinas, tabaco, polvo etc. El tiempo de fermentación determinara el grado de acidez y la carbonatación final del producto. **(RUBIO, A. 2012)**

1.3.6 Elaboración del té de Kombucha.

1. Preparar la infusión del té.

Primeramente se debe hervir el agua durante 10 minutos apagar la hornilla, a continuación colocar el té dejándolo reposar por 10 minutos para extraer los taninos presentes en el té ya que a mayor tiempo de reposo más cantidad de tanino se extrae como resultado de ello será también más cargado y amargo. En general cuanto mejor es el té, menos temperatura necesita el agua. **(STEVENS, N. 2000.)**

2. Endulzar la infusión.

Una vez preparada y colada la infusión se agrega el azúcar seleccionado, la misma que debe quedar disuelta completamente cuando el té este templado por debajo de 30°C; excepto el azúcar blanco que se puede agregar en cualquier momento de la preparación del té. Al mismo tiempo que se mezcla el azúcar se está oxigenando la bebida, por ello se bate enérgicamente y se hacen remolinos en ambos sentidos con una cuchara o una varilla de agitación evitando los metales que no sean de acero inoxidable. (RUBIO, A.2012 y STEVENS, N. 2000)

3. Agregarla Kombucha.



Pasar la infusión al recipiente fermentador reposándolo hasta que se enfríe por debajo de 30°C, para poder agregar un 10% de té fermentado anteriormente o un cuarto de taza de vinagre blanco destilado o de manzana hervido en su defecto (Este aporte de té fermentado o vinagre baja el pH del medio de intercambio consiguiéndose una acidez apropiada, para acelerar la fermentación y ayudar al *Manchurian fungus* a protegerse de microorganismos ajenos al cultivo). (RUBIO, A. 2012)

A continuación se coloca el *Manchurian fungus* y se tapa la boca del recipiente con un paño fino (lino, algodón, o papel absorbente) que deje pasar el aire pero no el polvo evitando también la entrada de microorganismos. Se suele acomodar la madre de *Manchurian fungus* con la parte brillante hacia arriba esto es indiferente en un principio pero recomendable si se consigue una madre que siempre flota para poder retirar las capas más viejas de vez en cuando. (RUBIO, A. 2012)

4. Período de cultivo y fermento:

El tiempo necesario para obtener una buena madre de *Manchurian fungus* es de 7 a 15 días a una temperatura ambiente de alrededor de 23°C, durante el cual el té de Kombucha va adquiriendo su acidez característica, la misma que le confiere a la bebida

el carácter medicinal, dado que se han formado correctamente los ácidos terapéuticos específicos de este remedio. Si se mantienen estas características cada vez que preparamos la bebida se obtendrá tanto un buen cultivo como una buena bebida medicinal; mientras que si lo hacemos en 7 días obtenemos una bebida parecida a sidra al degustarse todavía algo dulce y el cultivo puede quedar todavía algo flojo. (STEVENS, N. 2000)

El tiempo de fermentación estará influenciado por la temperatura y la cantidad de cultivo utilizado así como la forma del recipiente, ya que una buena oxigenación sobre el cultivo es fundamental por lo que la bebida estará lista antes en un recipiente bajo y ancho que en uno alto y estrecho. La experiencia de su consumo nos mostrará las proporciones de cultivo adecuadas a utilizar en cada caso y el resto será desprendido manualmente para ofrecerlo, guardarlo o desecharlo. Siempre antes de botar un cultivo conviene sacar el extracto presionándolo con la mano cerrada, con un paño o un escurridor de rodillos. “Cualquier resto que se deseche es preferible que vuelva a la naturaleza de donde vino usándolo como abono o que acabe en el agua mejor que en la incineradora de basura. “Muchos fermentos se usan por su poder para limpiar pozos sépticos”. (RUBIO, A. 2012)

2. Filtrado.

Pasado el tiempo de fermentación se cosecha la bebida pasándola por un tamiz de tela. Hay que guardar un 10% sobre la cantidad que se quiera volver a preparar, siendo mejor recoger lo primero que se saca porque en la parte superior está más equilibrado en bacterias formadoras del cultivo y de los ácidos beneficiosos. Esta porción de bebida será el arrancador inicial para la siguiente preparación, colocando además el cultivo y si la bebida se saca todavía dulce es necesario que dicha porción para arrancador continúe acidificándose unos días más junto al cultivo de *Manchurian fungus* y de esta manera aseguramos la calidad de la siguiente preparación. (RUBIO, A. 2012)

En este paso podemos aprovechar limpiando el cultivo, es decir, eliminar las capas viejas de levaduras que se han formado en la parte inferior de la capa celulósica siempre y cuando nos interesa fomentar el equilibrio sobre las bacterias para obtener una bebida

curativa. Para lavar la Kombucha es mejor usar agua sin cloro o sumergirla en el té fermentado antes de colarlo. **(STEVENS, N. 2000)**

Si la intención es hacer la bebida más gaseosa no hay que lavarlo y se puede en este caso dejarlo en el fondo dejando la cantidad adecuada de arrancador sin filtrarla. Colar o no colar el té fermentado es opcional aunque encontremos fibras oscuras y sedimentos de aspecto raro se trata del propio crecimiento y establecimiento de la levadura residente, básicamente. Un aporte extra beneficioso, tanto a nivel nutritivo como probiótico. En caso de que se considere no muy adecuado a la vista el cultivo se cuela o se filtra. **(STEVENS, N. 2000)**

ELABORACIÓN DEL KOMBUCHA

1. Hervir el agua durante 10 min y retirar del fuego.



2. Medir Litros de agua hirviendo en un vaso de precipitación.



3. Colocar el té y extraer el principio activo por 10 min.



4. Colocar el azúcar y agitar vigorosamente.



5. Dejar enfriar la solución de té.



6. Trasvasar la solución de té al envase destinado al cultivo.



7. Añadir el 10% de té ya fermentado.



8. Colocar un cultivo joven libre de contaminación; en el caso de que exista hongo viejo retirarlo.



9. Tapar el recipiente.



10. Dejar reposar el recipiente en un ambiente fresco libre de contaminación durante 15 días.

11. Transcurrido el tiempo de fermentación cultivarlo.

12. Embotellado.

FUENTE: Lorena Morales, 2014.

FIGURA N° 11. PASOS PARA ELABORAR LA KOMBUCHA

8. Embotellado.

La bebida se guarda en botellas tapadas en un ambiente fresco o en la nevera, la fermentación continúa aunque es mucho más lenta e incluso con el frío. Si se guarda en

botellas de cristal con cierre hermético la fermentación continuará por medio de algunas levaduras anaeróbicas produciéndose una bebida carbonatada. Se podrá guardar así durante una semana e incluso más, llegado un punto en la fermentación la producción de gas se detendrá pero hay riesgo de que la botella explote debido al incremento de CO₂, sobre todo si la bebida se sacó todavía dulce. Los tapones de corcho pueden evitar esto. **(RUBIO, A. 2012)**

Es habitual que se forme una membrana gelatinosa cuando la bebida reposa unos días, por lo que si da asco habrá que colar la bebida. Todo el procedimiento se puede repetir continuamente o dejar el cultivo reposar en una buena cantidad del te fermentado haciéndose vinagre para usarlo cuando sea oportuno. El tiempo de vida útil del cultivo no está determinado pero será prudente que no pase de 40 días sin un aporte de nutrientes aportados con té dulce o con té fermentado recientemente. Si lo queremos dejar reposar por más tiempo entonces se guarda en el refrigerador tapado sin presión. **(RUBIO, A. 2012)**

Si la temperatura es superior a 28°C, se debe llevar el cultivo a un ambiente fresco o ponerlo en refrigeración en cuyo caso es mejor que el líquido esté bien ácido tirando a vinagre. Aunque no es necesario limpiar siempre el recipiente es mejor enjuagarlo cada vez evitando en lo posible el uso de detergentes; siendo mejor limpiador tanto para el fermentador como para los utensilios el propio vinagre de *Manchurian fungus* mezclado con agua caliente o fría que se obtiene dejando una cantidad del te fermentado durante un mes o más en un recipiente o botellas de boca grande. **(RUBIO, A. 2012)**

Reservar el 10% de té fermentado para utilizarlo como arrancador inicial en la siguiente preparación, asegurándose de la suficiente acidez como de la carga microbiana necesaria para ayudar al *Manchurian fungus* a arrancar la fermentación y mantener las condiciones higiénicas adecuadas evitando la proliferación microorganismos patógenos o moho que dañarían el cultivo. Mientras más crece el cultivo en capas sucesivas, más rápida es la fermentación y a la larga es necesario quitar una parte o empezar con un nuevo cultivo separando el excedente. Si las capas nuevas del cultivo no se pueden desprender de la madre con facilidad, se puede cortar el lote en porciones adecuadas y

continuar con un trozo apropiado para nuestras necesidades a la hora de hacer el fermento. En cualquier caso un nuevo *Manchurian fungus* se formará en la superficie, incluso solamente añadiendo un 10% de la bebida fermentada anteriormente siempre y cuando alcance la acidez adecuada. Tal es la capacidad de cohesión simbiótica de los microorganismos asociados a este cultivo, que son capaces de reorganizarse en poco tiempo (en unos 4 a 6 días se aprecia una evidente membrana formándose en la superficie). Para hacer un nuevo cultivo solo con té fermentado se pone más cantidad de arrancador, de 20 a 50%. (RUBIO, A. 2012)

1.3.6.1 FERMENTACIÓN Y SUS PRODUCTOS

1.3.6.1.1 FERMENTACIÓN

Fermentación es un proceso CATABÓLICO realizado por elementos vivos (bacterias, levaduras o células animales) o no vivos (enzimas) que mediante una serie de reacciones un compuesto orgánico se oxida parcialmente en ausencia de oxígeno para obtener energía química. En las fermentaciones, la glucosa no se degrada totalmente a CO₂ y H₂O, sino que se produce una degradación incompleta de la cadena carbonada. La fermentación es uno de los métodos más antiguos para la conservación de alimentos y es uno de los menos comprendidos.

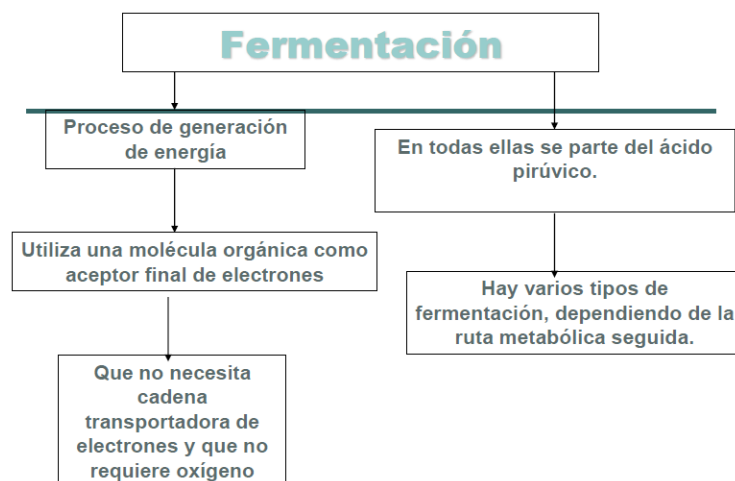
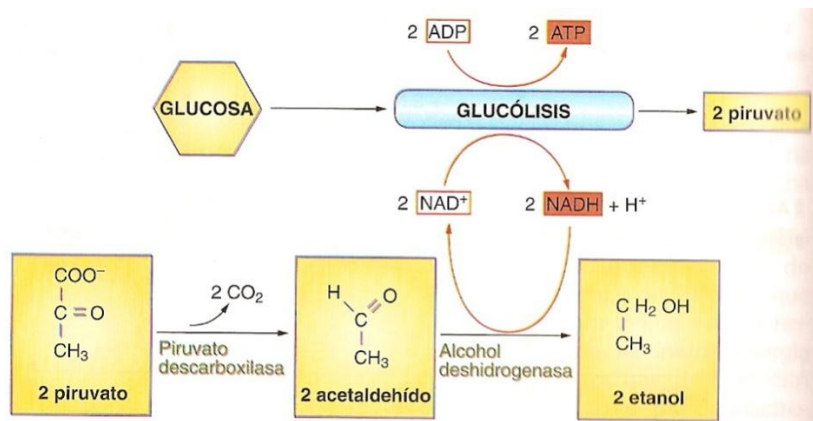


FIGURA N° 12. FERMENTACIÓN

1.3.6.1.1.1 Fermentación Alcohólica

Es un proceso anaeróbico producida por levaduras, mohos y algunas bacterias, que producen cambios químicos en las sustancias orgánicas. Las levaduras transforman los carbohidratos (generalmente azúcares: glucosa, fructosa, sacarosa, almidón, etc.) en etanol ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$), dióxido de carbono (CO_2) y ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico. La fermentación alcohólica tiene como objetivo proporcionar energía anaeróbica a los microorganismos unicelulares (levaduras) en ausencia de oxígeno a partir de la glucosa. (VÁZQUEZ, J. 2007)



FUENTE: Fermentación alcohólica. Wikipedia 2009

FIGURA N° 13. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

El oxígeno es el desencadenante inicialmente de esta fermentación, ya que las levaduras lo van a necesitar en su fase de crecimiento. Siendo mínima la cantidad de oxígeno al final de la fermentación para evitar la pérdida de etanol y la aparición en su lugar de ácido acético. En este tipo de fermentación se desprende energía en forma de calor (proceso exotérmico), siendo necesario controlar este aumento de temperatura ya que si sobrepasa los 25 – 30°C las levaduras comenzarían a morir deteniéndose el proceso fermentativo. Otro producto de la fermentación es el anhídrido carbónico (CO_2) responsable del burbujeo, la ebullición y el aroma característico de un producto fermentado. (VÁZQUEZ, J. 2007)

1.3.6.1.1.2 Fermentación láctica

El ácido pirúvico es reducido a ácido láctico por medio del $\text{NADH} + \text{H}^+$, de esta forma el NAD^+ se recupera y pueden ser degradadas nuevas moléculas de la glucosa. Mediante la fermentación láctica se originan un conjunto de ácidos que son los responsables de disminuir el pH de la disolución.

Los ácidos presentes son: ácido láctico, tartárico, málico y en menor cantidad cítrico (aparece a partir del tercer día de su fermentación). Todos estos ácidos son los responsables de proporcionar el sabor ácido característico al Kombucha. (JAYABALAN R. 2007)

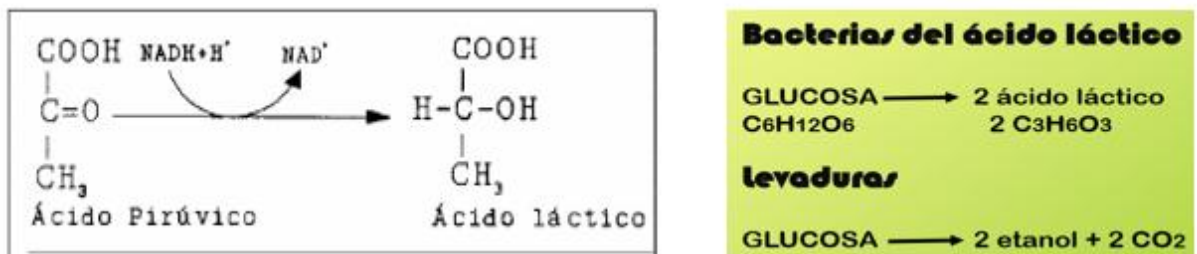
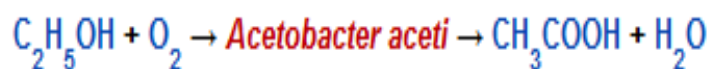


FIGURA N° 14. FERMENTACIÓN LÁCTICA

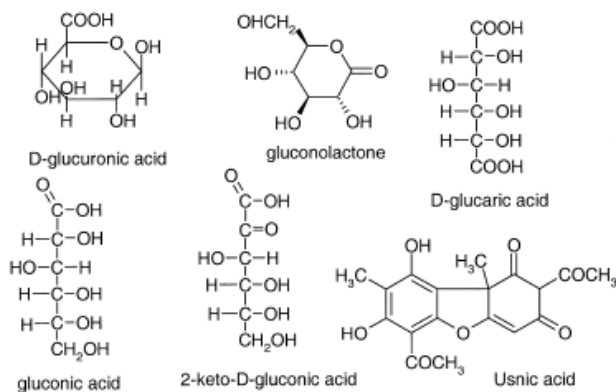
1.3.6.1.1.3 Fermentación Acética:

Es producida por el *Acetobacter*, un género de bacterias aeróbicas que utiliza como sustrato el alcohol para originar ácido acético. Estas bacterias a diferencia de las levaduras productoras de alcohol, requieren gran cantidad de O_2 para su crecimiento y actividad. El proceso metabólico se basa en la conversión del etanol en acetaldehído (Rx catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa) y del acetaldehído hidratado en ácido acético por la acción de la enzima acetaldehído deshidrogenasa: (JAYABALAN, R. 2007)



1.3.6.1.2 Productos de fermentación del *Manchurian fungus*.

Entre los metabolitos secundarios presentes en la Kombucha como resultado de procesos metabólicos, bioquímicos y químicos originados durante su cultivo tenemos: ácido acético, ácido fólico, ácido carbónico, ácido glucorónico, ácido glucónico, ácido L-láctico, ácido únsico. También se encuentran presentes las vitaminas del complejo B (B₁, B₂, B₃, B₆, B₁₂), vitamina C entre otras, enzimas, una sustancia anticoagulante denominada Heparina y distintos oligoelementos en concentraciones trazas. El producto final contiene una pequeña cantidad de alcohol (0,5 -1%) y de azúcar no utilizada. (SEBASTIÁN, SARSOTTI. 2013)



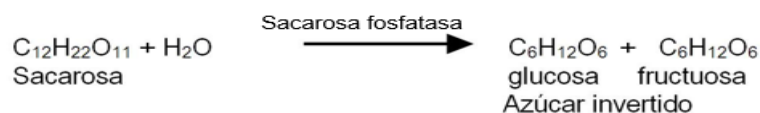
FUENTE: Tea, Kombucha, and health: a review. DUFRESNE C., 2010.

FIGURA N° 15. PRODUCTOS DEFERMENTACIÓN DE LA KOMBUCHA

En la producción de la Kombucha, sus ingredientes (el té negro y la sacarosa) sufren modificación progresiva por la acción del *Manchurian fungus*. Los principales metabolitos identificados en la bebida fermentada son los ácidos acético, láctico, glucónico y glucorónico; etanol y glicerol.

La composición metabólica y la concentración dependen de la diversidad del té, de la concentración de azúcar, como también del tiempo de fermentación. Las levaduras hidrolizan la sacarosa en glucosa y fructosa, produciendo etanol con una preferencia por la fructosa como sustrato; mientras que las bacterias acéticas utilizan la glucosa para la producción de ácido glucorónico, el mismo que es transformado en etanol y finalmente en ácido acético, generando como subproducto celulosa que se va acumulando en capas para formar el hongo. La enzima responsable de formar la masa del hongo es la celulasa

sintetasa. La síntesis de ácido láctico es atribuida a la acción de la bacteria ácido láctico sobre el etanol y el ácido acético. También se reporta que el proceso de fermentación induce a la síntesis de vitaminas del complejo B y ácido fólico. El valor del pH de la Kombucha disminuye durante el proceso de fermentación debido al incremento en el contenido de ácidos orgánicos. (DUFRESNE, C. 2000)



Fuente: Sacarosa. Wikipedia 2011

FIGURA N° 16. HIDRÓLISIS DE LA SACAROSA

Al final se obtiene un líquido considerablemente ácido (de pH alrededor de 3), de color pardo y levemente alcohólico. Por la acidez y el etanol el cultivo de Kombucha se puede mantener con cierta facilidad sin condiciones estériles.

1.3.7 Mecanismo de acción

No se dispone de información científica confiable sobre el probable mecanismo de acción "beneficioso" del té Kombucha. El nombre "Hongo del Té" es un término incorrecto y surge de la capacidad única de la bacteria de sintetizar una red de celulosa flotante que parece moho superficial en un medio no agitado y es similar en composición a la de la "madre del vinagre". Esta simbiosis se desarrolla tradicionalmente en el té negro con sacarosa durante 7 días y da como resultado una bebida espumosa y ácida bajo condiciones aeróbicas. El pH del té es de 2.0- 3.0. Las incubaciones de más tiempo producen gran cantidad de ácido acético y la formación de un vinagre suave. (STEVENS, N. 2000)

1.3.8 Composición y propiedades del té de Kombucha

El té negro fermentado a base de *Manchurian fungus* (Kombucha), está compuesto por dos porciones: una película celulosa flotante y el caldo agrio. En su composición a más de los compuestos citados anteriormente, también contiene varios compuestos nitrogenados, como los aminoácidos, proteínas; los alcaloides (cafeína, teofilina y teobromina). La composición microbiana y nutritiva puede variar dependiendo del sustrato, de los cultivos y del lugar donde se elabora ya que es totalmente casero. Los efectos beneficios del té de Kombucha se hablan en base a los polifenoles presentes en el té, a los ácidos glucónico, glucorónico y láctico, vitaminas, aminoácidos, compuestos con actividad antibiótica, y a una variedad de micronutrientes producidos durante la fermentación. Un cultivo sano y vigoroso de *Manchurian fungus* repercute en la calidad de la bebida y su efectividad. Si el té de Kombucha se fermenta correctamente a fondo, se pueden obtener:

- **Aminoácidos:** relacionados con el equilibrio de piel, pelo, cartílagos, articulaciones y del humor vítreo de los ojos. Son sintetizados por nuestro organismo, entre ellos tenemos: lisina, alanina, tirosina, valina, fenilalanina, leucina, isoleucina, serina y treonina. (STEVENS, N. 2000)
- **Enzimas:** entre ellas amilasa, invertasa y lactasa con importantes funciones digestivas como descomponer grandes moléculas en otras más pequeñas de fácil asimilación.
- **Ácidos:** acético, carbónico, glucorónico, fólico, glucónico, aspártico, glutámico, y láctico.(STEVENS, N. 2000)

El **ácido glucónico** es producido por una gran variedad de bacterias y hongos a partir de la glucosa mediante oxidación y sirve para preservar los alimentos.

Ácido glucorónico: considerado por varios autores como el agente terapéutico principal en la Kombucha, ya que desintoxica el hígado. La Kombucha ayuda al hígado a producir ácido glucorónico que es segregado normalmente cuando está sano. Es utilizado para envolver toxinas ajenas y las provenientes de las funciones corporales,

una vez sujetas por el ácido glucorónico, las toxinas pueden eliminarse del cuerpo y no se reabsorben nuevamente en su trayecto hasta ser excretadas. **(DURFRESNE, C. 2000)**

El **ácido glucorónico** es importante para la construcción de sustancias básicas del cuerpo como la membrana mucosa del estómago, los cartílagos y el humor vítreo del ojo. Además está implicado en la formación de la heparina, sustancia que impide la coagulación sanguínea. Durante el proceso de fermentación, en la conversión de los azúcares las levaduras consumen oxígeno y producen dióxido de carbono que al diluirse en el líquido se transforma en ácido carbónico. **(RUBIO, A. 2012)**

Los **ácidos**: carbónico, acético, glucónico, úsnico; y el alcohol producidos en la fermentación poseen efectos conservantes y antimicrobianos, los mismos que evitan el crecimiento de microorganismos patógenos al cultivo de *Manchurian fungus*, por lo que el té de Kombucha se puede conservar a temperaturas frescas. Cuando la bebida se convierte en vinagre (debido a un mayor tiempo de fermentación), se incrementa el ácido acético aumentando su poder conservador y es muy útil en la preparación de ensaladas.

Mínimas cantidades de vitamina B, vitamina C entre otras. Las vitaminas del complejo B ayudan a la conversión apropiada de los carbohidratos mientras que la vitamina C es antioxidante. **(RUBIO, A. 2012)**

Según bibliografía el producto final contiene baja cantidad de alcohol entre 0,3 a 0,7%, como en una cerveza sin alcohol con una pequeña cantidad de azúcares no transformados. La presencia de cafeína en el fermento oscila entre 3 y 6 mg por litro dependiendo del té utilizado y las condiciones de fermentación. Si se desea un Kombucha con bajo contenido de cafeína, es absolutamente aceptable hacerlo con té descafeinado o usar té verde. **(MALBASA, R. 2006)**

1.3.9 Cómo tomarlo

El Té de Kombucha es una bebida natural sin aparentes efectos secundarios. Sin embargo deberá dosificarse adecuadamente dependiendo de la tolerancia a cada uno de los productos fermentados; conviene empezar con una, dos o tres copitas diarias de “50 a 100 ml” repartidas con anterioridad a las comidas principales. La cantidad se incrementará progresivamente dependiendo del grado de acidez, la tolerancia al fermento y de las intenciones para su uso, aumentando las tomas, solo si fuese necesario. Se puede empezar usándolo como un vinagre suave para el aliño o tomarlo diluido en agua como refresco, ya que grandes cantidades pueden incrementar sus propiedades laxantes y depurativas; es conviene beber suficiente agua durante el día para promover la depuración. Además se puede adicionar jugos y frutas para hacerla más apetecible a la bebida se puede enmascarar el sabor agrio incluyendo trozos y zumos de fruta a la hora de filtrarlo, dando sabor a la bebida y aumentando sus propiedades nutritivas o para elevar la carbonatación. (RUBIO, A. 2012)

1.3.10 Precauciones y contraindicaciones.

1.3.10.1 Precauciones

Los recipientes utilizados para preparar el té, la fermentación, el posterior almacenamiento y embotellado de la bebida, deben ser de acero inoxidable o de vidrio transparente de buena calidad. Al manipular el *Manchurian fungus* y la bebida es recomendable evitar el contacto con cualquier metal, incluidos los anillos. (DURFRESNE, C. 2000)

1.3.10.2 Contraindicaciones

Cuando se padecen enfermedades crónicas o graves o se siente flojera y falta de energía es preferible tomar el té de Kombucha bien modificado.

En casos de **acidosis metabólica** y si el **sistema inmune** está comprometido, consultar a los terapeutas sería lo más adecuado.

En la infancia por debajo de los 6 años.- En su desarrollo no pueden tolerar el mismo grado de suplementos y productos alimenticios como en un adulto. Kombucha podría ser excesivamente fuerte.

Para niños mayores a 6 años se debería pensar en diluirlo con agua o en un zumo de fruta conveniente como el de uva.

Embarazadas y lactancia. La razón es la misma que en la infancia. La sustancia nutritiva de la madre pasará al niño neonato o al lactante, pudiendo actuar como un potente laxante ya que él bebe tiene poco desarrollado el sistema digestivo. **(DURFRESNE, C. 2000)**

1.3.11 Actividad probiótica del *Manchurian fungus*: Evaluación in vitro.

Según literatura para garantizar la efectividad de un probiótico se considera necesario que diariamente entre 10^9 y 10^{10} organismos viables alcancen el intestino delgado. Por esta razón se sugiere que los probióticos mantengan valores de viables entre 10^6 – 10^7 UFC/mL o g.

1.3.11.1 Tolerancia a la acidez

A pesar de las diferencias existentes entre cepas y especies, los m.o generalmente muestran una gran sensibilidad a valores de pH por debajo de 3, por lo tanto, la tolerancia a la acidez es considerada como una de las principales propiedades utilizadas para seleccionar bacterias potencialmente probióticas. Antes de llegar al tracto intestinal, los probióticos primero deben sobrevivir al pH estomacal, donde la secreción de ácido gástrico constituye el primer mecanismo de defensa contra los m.o ingeridos. Por ejemplo la tolerancia a la acidez de *Lactobacillus* es atribuida por la presencia de un gradiente constante entre el pH extracelular y el pH citoplasmático. **(LEÓN, M. 2012)**

Además microorganismos como *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones aeróbicas pueden utilizar ácidos orgánicos de cadena corta (acético y láctico) como fuente de carbono mediante el uso de vías anabólicas, enzimas y mecanismo de transporte específicos. Estos ácidos una vez que hayan ingresado al interior de la célula producen acidificación del citoplasma. Por lo general las células eucariotas mantienen el pH intracelular a pesar de las variaciones del pH extracelular. Para mantener los valores adecuados dentro del rango óptimo del metabolismo las bacterias expulsan protones a expensas de ATP, lo cual disminuye el consumo de glucosa generándose un aumento del pH intracelular, permitiendo a la levadura resistir pH de rango amplio desde 2.4 a 8.6. (ORTIZ A Y REUTO, J. 2007)

En condiciones de acidez los m.o Gram positivos utilizan un mecanismo de defensa conocido como **F1-F0 ATPasa**, que es una subunidad enzimática múltiple, conteniendo una porción catalítica (F1), incorporando subunidades para la hidrólisis de ATP y una porción integral de membrana (F0) que incluye subunidades que funcionan como canales de membrana para la translocación de protones. El complejo **F1F0** realiza dos reacciones acopladas: el **F0** transporta iones (protones o sodio) a través de una membrana y el segmento **F1** une el ADP y el fosfato para formar el ATP. La energía de este proceso proviene de la formación de un gradiente electroquímico compuesto de iones con carga (H^+) proporcionado por la cadena de transporte de electrones que bombea los H^+ hacia el compartimiento contrario al que se encuentra el complejo F1 que sintetiza el ATP. Este proceso se conoce como transducción de energía. (LEÓN, M. 2012)

1.3.11.2 Tolerancia a las sales biliares

La bilis es una sustancia líquida verdosa de sabor amargo, producida por el hígado. La bilis está compuesta por agua, colesterol, lecitina (fosfolípido), pigmentos biliares (bilirrubina y biliverdina), sales biliares (glicocolato de sodio y taurocolato de sodio) e iones bicarbonato. (ORTIZ A Y REUTO, J. 2007)

Mecanismo de acción y acciones farmacológicas

Mecanismo de acción: es estimulante de la secreción biliar, aumenta y promueve la expulsión de la bilis. Favorece la digestión de las grasas, las mismas que pasan a la sangre en forma saponificada. El hígado reabsorbe y reexcreta las sales biliares para formar un ciclo necesario en la absorción de las grasas. La bilis posee funciones digestivas y excretoras.

- a. **Digestiva:** Las sales biliares junto con los fosfolípidos son moléculas anfipáticas que facilitan la emulsión de los ácidos grasos de cadena larga y la ausencia de sales biliares impide la absorción de las grasas originando heces blanquecinas y con esteatorrea.
- b. **Excretora:** A través de la bilis se eliminan muchos compuestos resultantes del catabolismo de los xenobióticos.

Aunque la principal función de las sales biliares es actuar como coleréticas, cuando existen deficiencias biliares actúan como terapia sustitutiva, supliendo dicha deficiencia y al mismo tiempo estimulan la producción del flujo biliar. Otra función de la bilis es neutralizar el quimio ácido que proviene del estómago, aunque en este sentido su acción es inferior a la del jugo pancreático. **(LEÓN, M. 2012)**

Las **sales biliares** son ácidos biliares conjugados con sodio o potasio, sintetizadas en el hígado a partir del colesterol, las mismas que son almacenadas como aminoácidos conjugados en la vesícula biliar. Las sales biliares son muy tóxicas, por lo que su síntesis y catabolismo deben ser regulados de manera estricta. En condiciones fisiológicas el 70% de los ácidos biliares en el ser humano están compuestos por ácido cólico, 30% por ácido quenodesoxicólico y otros ácidos biliares secundarios que producen las bacterias al pasar por el intestino. **(LEÓN, M. 2012)**

La concentración de las sales biliares en el intestino delgado está entre 0.2% - 2.0% (w/v), dependiendo del tipo y cantidad de alimento ingerido. La formación de bilis se considera un proceso vital, ya que durante la digestión, la bilis es secretada en el intestino, jugando un papel muy importante en la emulsificación y absorción de grasas;

como también en la transformación de productos más solubles para su fácil asimilación. Además la bilis presenta una fuerte actividad antimicrobiana induciendo disgregación de la membrana lipídica, como resultado se produce estrés oxidativo en el ADN; razón por la cual la tolerancia a las sales biliares en concentración fisiológica es crucial para la colonización del intestino por las bacterias probióticas. **(LEÓN, M. 2012)**

Se conoce muy poco sobre el mecanismo de respuesta y de tolerancia a la bilis por las bacterias ácido lácticas; creyendo que varias proteínas de membrana están involucradas en el mecanismo de resistencia. La tolerancia a la bilis es considerada una característica muy importante en probióticos, que les permite sobrevivir, crecer y realizar sus actividades en el intestino delgado. **(LEÓN, M. 2012)**

Microorganismos como el *Lactobacillus spp*, posee enzimas hidrolasa (BSH), que producen la deconjugación de las sales biliares, hidrolizan el enlace amina liberando glicina y taurina de la base esteroide, mecanismo por el cual pueden resistir concentraciones de sales biliares en pruebas in vitro y el paso por el tracto gastrointestinal (TGI). **(LEÓN, M. 2012)**

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL (METODOLOGÍA)

2.1 LUGAR DE INVESTIGACIÓN.

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Alimentos de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2 FACTORES DE ESTUDIO

La cantidad de microorganismos, concentración de sacarosa, cantidad de té, ciclos de oxigenación y tiempo de fermentación.

2.3 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.

2.3.1 Materiales

- Probeta de 1000 mL
- Probeta de 100 mL
- Vaso de precipitación 1000 mL
- Vasos de precipitación 250 mL
- Alcoholímetro
- Picnómetro
- Termómetro
- Bureta de 10 mL
- Erlenmeyer de 250 mL
- Soporte universal
- Pinza de bureta
- Cánula

- Erbak
- Filtros de aire
- Pipetas de 1, 5 y 10 mL.
- Pipetas volumétricas de mL
- Mechero de alcohol
- Kitasato
- Termómetro
- Embudo Buchner
- Manguera
- Filtros para HPLC
- Botellas plásticas de 3L
- Tubos de ensayo
- Tubos tapa rosca
- Hisopos
- Reverbero
- Puntas de 1000, 500 y 100 μ L
- Gradilla para tubos
- Balones aforados de 10, 50 y 100 mL
- Piceta
- Bureta
- Guantes
- Mascarilla
- Redecilla para cabello
- Mandil
- Algodón
- Papel aluminio
- Tollas de cocina
- Toallas de cocina reutilizables
- Marcador
- Canasta
- Ollas
- Jarras de vidrio
- Pistola de silicona
- Silicona en barra
- Botellas de vidrio
- Etiquetas
- Detergente

2.3.2 Equipos

- Equipos de venoclisis
- Equipo de destilación
- Balanza analítica
- Equipo de HPLC
- Equipo de titulación
- pHchímetro
- Brixómetro
- Espectrofotómetro
- Alcoholímetro
- Pipeta automática de 1000 μ L
- Computador
- Autoclave
- Estufa
- Refrigerador
- Bombas de aire
- Potenciómetro
- Desgasificador
- Cámara microbiológica

2.3.3 Reactivos

- Reactivo de colesterol
- Estándar de colesterol
- Alcohol potable
- Alcohol antiséptico
- Fenolftaleína
- HCl conc.
- HCl 0,1N
- NaOH 0,1N
- NaOH al 50%
- Ácido ascórbico
- H_3PO_4
- Tiras reactivas para colesterol y triglicéridos.
- Alcohol industrial (para mechero)
- Solución de fenolftaleína, 0,5% en 95% de alcohol etílico.
- Solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.5 % en agua)
- Solución indicadora de azul de metileno al 1%
- H_2SO_4
- Solución buffer, de pH 4,00.
- Solución buffer, de pH 7,00.
- Na_2CO_3
- Naranja de metilo
- Carrez I y II
- Feling A y B
- Dragendorf
- Cloruro férrico al 5%
- Acetato de sodio

2.3.4 Sustancias

- Agua de fuente
- Agua bidestilada
- Agua destilada
- Agua Clorada
- Té negro
- Inóculo (m.o. fermentadores)
- Azúcar blanca (sacarosa)

2.4 MÉTODOS Y TÉCNICAS

2.4.1 ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO

Según la norma IRAM (Instituto Argentino de Normalización y Certificación.) 20.001: “La evaluación sensorial es la disciplina científica utilizada para evocar, medir, analizar e interpretar las reacciones a aquellas características de alimentos y otras sustancias, que son percibidas por los sentidos del olfato, gusto, tacto, oído y vista”. **(CETERA, A. 2007-2014)**

En la práctica, un análisis organoléptico es una prueba de degustación para determinar la calidad del producto. El análisis organoléptico es una prueba siempre subjetiva. **(LÓPEZ, S. 2010).**

2.4.2 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO

El análisis físico-químico permite caracterizar un alimento desde el punto de vista nutricional y toxicológico. Dentro de los parámetros a analizar en el Kombucha tenemos:

- pH (Según Gutapadu 2007, el pH óptimo está entre los 3,5 a 4,5).
- Grados Brix
- % Acidez total.
- % Alcohol
- Determinación de vitamina C

2.4.3 ANÁLISIS COMPLEMENTARIO

El análisis complementario es un análisis básico o inmediato de los alimentos no cubre las expectativas de un análisis bromatológico o completo de un alimento; si bien forma parte de este último se hace necesario casi siempre realizar determinaciones específicas

de cada grupo de alimentos, lo que constituye el análisis complementario. (LÓPEZ, S. 2010).

2.4.3.1 Determinación del pH.

pH. Indicativo de acidez o alcalinidad de una solución acuosa. Se define como el logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno en moles por litro. El valor de pH es de 1 a 14, que indica la concentración de iones hidrógeno presentes en una solución acuosa.

En vista de que no existe normativa para la elaboración y análisis bromatológico de la Kombucha y para realizar este ensayo se hizo uso de norma NTE INEN 2 325:2002. Determinación de pH en bebidas alcohólicas. Cerveza. **VER ANEXO 7.**

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El método consiste en una determinación potenciométrica del pH en una muestra de Kombucha previamente desgasificada y atemperada de 20°C a 25°C.

2.4.3.2 Determinación de Acidez

En alimentos el grado de acidez indica el contenido en ácidos libres. Se determina mediante una valoración (volumetría) con un reactivo básico. El resultado se expresa como el % del ácido predominante en el material.

2.4.3.2.1 Método Volumétrico: Titulación con fenolftaleína

FUNDAMENTO: En el procedimiento usual para determinar la concentración total de ácido, una alícuota de la solución que contiene el ácido se titula con una solución estándar de álcali hasta el punto en el cual una cantidad equivalente de la base ha sido

añadida. Este punto final puede detectarse mediante indicadores (cambio de color), electrométricamente (pHmetro), etc. Para realizar el ensayo de acidez se aplicó la NTE INEN 2 323: 2002-12: Determinación de la acidez total. **VER ANEXO 8.**

2.4.3.3 Determinación de sólidos solubles

Sólidos solubles.-Es la cantidad de sólidos disueltos en la bebida, expresada en grados Brix (porcentaje de masa). Los sólidos solubles equivalen al contenido de azúcar en disolución.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Transferir varias veces la muestra de un vaso a otro vaso de precipitación, para eliminar el anhídrido carbónico existente.

PROCEDIMIENTO

La determinación debe efectuarse por duplicado sobre la misma muestra preparada.

1. Con la ayuda de una micropipeta colocar 1 gota de muestra en el lente del brixómetro y observar a la luz solar.
2. Anotar el valor leído en el campo del lente del brixómetro.

2.4.3.4 Determinación de alcohol.

La determinación de alcohol en el alimento elaborado se realizó con la ayuda de un alcoholímetro.

2.4.3.5 Determinación de la gravedad específica

Se aplicó la norma NTE INEN 2322:2010. Determinación de alcohol. Bebidas alcohólicas. Cerveza. **VER ANEXO 9.**

2.4.3.6 Determinación de azúcares: Método de Fehling

2.4.3.6.1 Azúcares reductores

PROCEDIMIENTO

1. Pesar 5g de muestra
2. Adicionar 15 mL de solución de Carrez I y 15mL de solución de Carrez II, agitando después de cada adición.
3. Aforar a 250 mL con agua destilada y filtra por filtro de pliegues.
4. Colocar el filtrado en una bureta de 50 mL
5. En un Erlenmeyer de 250 mL colocar mL de solución de Fehling A y mL de solución de Fehling B.
6. Mezclar y añadir 40 mL de agua destilada, núcleos de ebullición y colocar en una fuente calorífica y calentar hasta ebullición. En este momento y controlando el tiempo con un cronómetro empezar a añadir lentamente cada 2 segundos y en pequeña cantidad de 0,5mL la solución problema desde la bureta, sin dejar hervir.
7. A 1 minuto y 55 segundos de ebullición adicionar 3 gotas de solución indicadora de azul de metileno al 1% y continuar la titulación a ritmo de 0,1mL por segundo hasta color rojo brillante.
8. Repetir la titulación adicionando de una sola vez el volumen gastado inicialmente en la titulación anterior, menos de 0,5 mL.
9. Titular a ritmo de 0,5mL cada 10 segundos. **(LUCERO, O. 2011)**

CÁLCULOS

El % de azúcares reductores se obtiene aplicando la siguiente fórmula:

$$\%AR = (A \times a \times 100) (W \times V)$$

Donde:

%AR = Porcentaje de azúcares reductores

A= Aforo de la muestra

a= Título de Fehling (10cc de solución de Fehling es igual a 0,05g de glucosa)

W= peso de la muestra en gramos

V= Volumen de la solución problema gastado en la titulación.

2.4.3.6.2 Azúcares totales

PROCEDIMIENTO

1. Pesar 5g de muestra previamente preparada (desmuestraada).
2. Colocar en un balón volumétrico de 250 mL y añadir 100 mL de agua destilada.
3. Adicional mL de HCl concentrado.
4. Calentar a reflujo 20 minutos.
5. Neutralizar con NaOH al 50% hasta pH 7.
6. Aforar a 250 mL con agua destilada.
7. Filtrar y colocar el filtrado en una bureta de 50 mL.
8. En un Erlenmeyer de 250 mL colocar mL de solución de Fehling A y mL de solución de Fehling B, mezclar y añadir 40 mL de agua destilada, núcleos de ebullición y colocar en una fuente calorífica y calentar hasta ebullición.
9. En este momento y controlando el tiempo con un cronómetro empezar a añadir lentamente cada 2 segundos y en pequeña cantidad de 0,5mL la solución problema desde la bureta, sin dejar hervir.
10. A 1 minuto y 55 segundos de ebullición adicionar 3 gotas de solución indicadora de azul de metileno al 1% y continuar la titulación a ritmo de 0,1mL por segundo hasta color rojo brillante
11. Repetir la titulación adicionando de una sola vez el volumen gastado inicialmente en la titulación anterior, menos de 0,5mL.
12. Titular a ritmo de 0,5mL cada 10 segundos.(LUCERO,O. 2011)

CÁLCULOS

El % de azúcares reductores se obtiene aplicando la siguiente fórmula:

$$\%AR = (A \times a \times 100) (W \times V)$$

Donde:

%AR = Porcentaje de azúcares reductores

A= Aforo de la muestra

a= Titulo de Fehling (10cc de solución de fehling es igual a 0,05g de glucosa)

W= peso de la muestra en gramos

V= Volumen de la solución problema gastado en la titulación. (LUCERO, O. 2011)

Nota: se puede obviar el indicador para apreciar mejor el punto final de titulación.

2.4.3.6.3 Azúcares no reductores (Sacarosa)

Se saca por cálculo, previa determinación de experimental de los azúcares reductores y totales con la siguiente fórmula:

$$\%AT = \%AR + \%ANR$$

$$\%ANR \text{ (SACARORA)} = \%AT - \%AR. \text{ (LUCERO, O. 2011)}$$

2.4.3.7 Determinación de vitamina C o Ácido Ascórbico (AA).

2.4.3.7.1 Determinación de Vitamina C por HPLC.

FUNDAMENTO DE HPLC: Es una técnica de separación que se basa en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida, las separaciones se logran por procesos de partición o intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada. Cromatografía de partición en fase reversa con una fase móvil polar.

Fase móvil: La fase móvil que se utilizó fue una solución de ácido fosfórico H_3PO_4 0.05 M (metanol- agua 30%) filtrada al vacío, posteriormente es desgasificada en ultrasonido por diez minutos.

Para la preparación del H_3PO_4 se utilizó agua bidestilada.

$$\frac{0,05 \text{ mol}}{L} \times \frac{98 \text{ g}}{\text{mol}} \times \frac{\text{mL}}{1,2 \text{ g}} \times 1L = 4,0833$$

$$4,0833 \approx 4,1$$

Estándar de vitamina C. Se preparó 50 ppm de ácido ascórbico, para ello se pesó 0.005 g de ácido ascórbico estándar y se aforó a 50 mL con ácido fosfórico 0.05 M grado HPLC. Tomar 1mL de la solución y aforar a 100mL Filtrar el sobrenadante con acrodiscos de membrana de 45 μm . Colocar en el vial para su inyección.

Para la cuantificación de vitamina C se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Conc. Vit. C } (\mu\text{g/g}) = \frac{A.M * C.E * F.D}{A.E}$$

Donde:

Conc. Vit. C ($\mu\text{g/g}$)= Es la concentración de vitamina C presente en la muestra analizada. A.M = Área de la muestra

A.E = Área del Estándar

C.E = Concentración del estándar

F.D = Factor de dilución.

2.4.4 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

El análisis microbiológico consta de los siguientes análisis:

- Recuento de aerobios mesófilos
- Determinación de mohos y levaduras.
- Determinación de coliformes.

2.4.4.1 Recuento de aerobios mesófilos.

Para realizar el recuento de aerobios mesófilos se aplicó la norma INEN 1529 - 5. **VER ANEXO 10.**

FUNDAMENTO DEL RECUENTO EN PLACA AGAR (PCA).

La productividad de este medio, está basada en el alto contenido nutricional de sus componentes, la peptona de caseína aporta nutrientes, el extracto de levadura actúa como sustrato vitamínico y la glucosa como fuente energética, favoreciendo el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos, sin precisar de otros aditivos. **(CULTIMED. 2003)**

2.4.4.2 Recuento de coliformes totales

Para realizar el recuento de coliformes se utilizó la norma INEN 1529 – 7. **VER ANEXO 11.**

FUNDAMENTO DEL AGAR MACCONKEY

Por la presencia de las sales biliares y el cristal violeta se inhibe el crecimiento de las bacterias Gram-positivas. Por la presencia de la lactosa, las bacterias capaces de fermentarla acidifican el medio, cambiando el color del rojo neutro y formando colonias rojas o rosadas, pudiendo presentar un halo turbio correspondiente al precipitado biliar. Las bacterias lactosa-negativas dan colonias incoloras. **(CULTIMED. 2003)**

2.4.4.3 Recuento de mohos y levaduras

Para realizar dicho recuento se siguió la norma INEN 1529-10, solo que en lugar de utilizar el medio de cultivo agar sal-levadura de Davis (SLD) se utilizó el medio de cultivo Agar Saboraud Cloranfenicol. **VER ANEXO 12.**

FUNDAMENTO

El agar Saboraud ya sea con cloranfenicol, gentamicina, penicilina o con estreptomicina son medios selectivos para el aislamiento de hongos a partir de muestras clínicas y no clínicas. Se han añadido agentes selectivos para inhibir las bacterias. El cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro que inhibe una amplia variedad de bacterias Gram negativas y Gram positivas, pero puede tener un efecto inhibitor en numerosos hongos patógenos, por lo que se ha demostrado que los antimicrobianos como penicilina, gentamicina y estreptomicina, o una combinación de los mismos, son eficaces en la inhibición de bacterias sin afectar el crecimiento fúngico. Estos medios se utilizan para el aislamiento de hongos a partir de muestras clínicas o materiales en los que se sospeche la presencia de contaminantes bacterianos. **(BECTON DICKINSON.2013)**

2.4.4.4 Identificación de microorganismos

Para determinar los microorganismos presentes en la bebida de té negro fermentada a base de *Manchurian fungus* se realizó la tinción Gram.

2.4.4.4.1 Tinción Gram

FUNDAMENTO

De gran importancia en microbiología porque permite diferenciar dos grandes grupos de bacterias (Gram positivas y negativas), según se comporten ante esta tinción. El fundamento radica en la diferente estructura de la pared celular de ambos grupos: las bacterias Gram (+) poseen una capa gruesa de peptidoglicano y carecen de membrana externa, mientras que las bacterias Gram (-) tienen una capa de peptidoglicano más fina y una membrana lipopolisacáridica externa. Tras la tinción con el Cristal violeta se efectúa un lavado con etanol que arrastrará al colorante sólo en las Gram negativas, mientras que en las Gram positivas el colorante queda retenido y las células permanecerán azules. Las células Gram (-) se teñirán después con un colorante de contraste (safranina) para que puedan observarse. (MARTÍNEZ, A. 2011)

Materiales: portaobjetos, mechero, asa de platino, pipeta, pinzas de madera, microscopio.

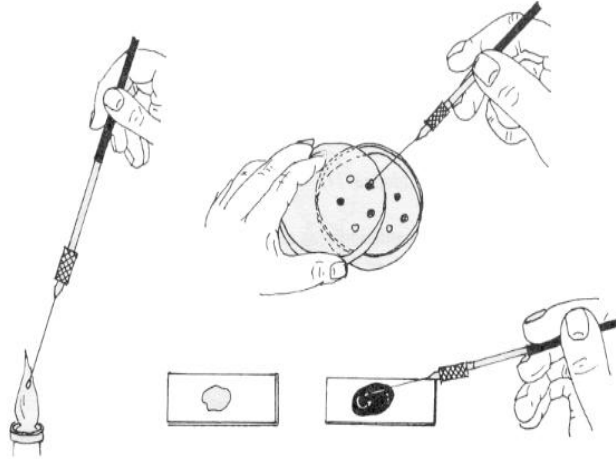
Reactivos: lugol, cristal violeta, fucsina diluida o safranina, alcohol 96°, aceite de inmersión.

2.4.4.4.1.1 PROCEDIMIENTO

I. Preparación la muestra:

1. Colocar sobre un portaobjetos una gota de agua y en ella suspender una cierta cantidad de microorganismos.

2. Realizar un frotis y dejarlo secar.
3. Fijar el frotis dándole varios pases a los portas sobre la llama del mechero, con la muestra hacia arriba.



Coloración.

1. Cubrirle frotis con cristal violeta durante 1 minuto.
2. Lavar con agua (deslizándolo el agua sobre el porta) para eliminar el exceso de colorante.
3. Cubrir la muestra con lugol (mordente) durante 1 min.
4. Lavar con agua.
5. Decolorar con alcohol (96°) por 30 segundos. Al decolorar con alcohol las bacterias Gram (-) no retiene el color violeta, por lo tanto quedan incoloras; mientras que la bacterias Gram (+) seguirían violeta.
6. Lavar con agua.
7. Cubrir el portaobjetos con el segundo colorante o de contraste, que es la safranina, 1 minuto. Este colorante sólo entrará en las bacterias Gram (-), que quedarán rojas. Las Gram (+) seguirán violetas.
8. Lavar con agua y dejar secar. Observar con el lente de inmersión (lente 100x).

2.4.5 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Esta prueba se realizó con el objetivo de determinar los principales grupos fitoquímicos presentes en la bebida de Kombucha.

2.4.5.1 Identificación de azúcares reductores

Permite reconocer en los extractos la presencia de azúcares reductores. Para ello si no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redissolver en 1- 2 mL de agua. Se adiciona 2 mL del reactivo y se calienta en baño de agua de 5-10 minutos la mezcla. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo. **(PEREIRA, S y otros. 2009)**

2.4.5.2 Ensayo Espuma

Permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esteroidal como triterpénica. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye su volumen dos a cinco veces en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos. El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2mm de altura y es persistente por más de 2 minutos. **(PEREIRA, S y otros. 2009)**

2.4.5.3 Ensayo de Cloruro Férrico (FeCl₃)

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9 % en agua). Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos. A una alícuota del extracto se añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

- Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
- Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos. **(PEREIRA, S y otros. 2009)**

2.4.5.4 Ensayo de Shidona

Permite reconocer la presencia de flavonoides en el extracto vegetal. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos se añade 1mL de alcohol amílico se mezclan la fases y se dejan reposar hasta que se separen.

Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma, a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado. El ensayo se considera como positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo intenso en todos los casos. **(PEREIRA, S y otros. 2009)**

2.4.5.5 Ensayo de Ninhidrina

Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de aminoácidos libres o de aminas en general. Se toma una alícuota del extracto en alcohol, o el residuo de la concentración en baño de agua, si el extracto se encuentra en otro solvente orgánico, se mezcla con 2 mL de solución al 2% de ninhidrina en agua. La mezcla se calienta 5 -10 minutos en baño de agua. Este ensayo se considera positivo cuando se desarrolla un color azul violáceo. **(PEREIRA, S y otros. 2009)**

2.4.6 CAPACIDAD PROBIÓTICA DEL *Manchurian fungus*:

Para determinar la capacidad probiótica de la bebida en estudio se realizaron diferentes pruebas “in vitro” por triplicado. Dentro de las pruebas realizadas para determinar la capacidad probiótica tenemos:

1. Tolerancia a sales biliares.
2. Determinación de resistencia a jugos gástricos.
3. Reducción del colesterol en presencia de sales biliares.

2.4.6.1 Tolerancia a pH.

Para realizar este ensayo se utilizó el medio de cultivo caldo soya triptica (TSB), siendo un medio de cultivo líquido altamente nutritivo recomendado para la recuperación y aislamiento de toda clase de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

El caldo TSB es un medio de cultivo libre de sustancias inhibitorias e indicadores, razón por lo cual lo hace ampliamente útil en procedimientos de diagnóstico e investigación. Por su abundante base nutritiva, este medio es adecuado para el crecimiento de bacterias y levaduras exigentes. **(BECTON, DICKINSON AND COMPANY. 2008)**

PROCEDIMIENTO

La tolerancia al pH fue evaluada siguiendo la metodología aplicada por **ORTIZ, A y REUTO, J**, con ligeras modificaciones. Se preparó caldo soya triptica ajustando el pH entre 4.5 y 5.0 (se trabajó a pH 4.95) con HCl concentrado, posteriormente se esterilizó a 121°C durante 15 min.

En un tubo tapa rosca se inoculó 1 mL de bebida en 9 mL de caldo soya triptica con pH ajustado, posteriormente se incubó a 37°C durante 24 horas. Finalizado el período de incubación se realizaron recuentos en placa por la técnica de microgota, para lo cual se tomó 100µL de muestra y se depositó en agar PCA, posteriormente las placas fueron incubadas por 24h a 37°C. **(ORTIZ, A Y REUTO, J. 2007)**

2.4.6.2 Resistencia a la simulación de los jugos gástrico y pancreático.

La acidez estomacal presenta un pH entre 1.2 - 3 es la primera barrera que un microorganismo potencialmente probiótico debe superarla, ya que el pH está directamente relacionado con la capacidad de un microorganismo para sobrevivir o multiplicarse en un alimento o en un medio de cultivo. El tiempo medio desde que un alimento entra hasta que sale del estómago es de 90 minutos (vaciamiento gástrico).

La pepsina es la principal enzima digestiva que se segrega en el estómago, esta enzima hidroliza las proteínas en el estómago, mientras que la pancreatina favorece la hidrólisis de grasas, proteínas y azúcares, facilitando la digestión de las mismas. La pepsina se libera en el estómago como pepsinógeno que por acción del ácido clorhídrico es transformado a pepsina que es componente principal del jugo gástrico. El HCl controla el paso de bacterias hacia el intestino y estimula la secreción de secretina, que estimula a su vez la secreción pancreática y biliar. La pepsina es más activa a un pH entre 2 - 3 y se desactiva permanentemente a un pH superior de 5. (EcuRed. 2014)

Debido a que en el mercado no fue posible encontrar pepsina y pancreatina puras, se utilizaron formas farmacéuticas que en su formulación contienen dichas enzimas como principio activo. Las formas farmacéuticas que se adquirieron fueron Espasmo Canulase ® (pepsina) y Pankreoflat ® (pancreatina).

Las simulaciones de los jugos gástrico y pancreático fueron preparadas tomando como base la metodología aplicada por **MONTEAGUDO A, y otros. 2012**; ya que en el mercado no fue posible encontrar pepsina y pancreatina puras, por lo tanto se utilizó formas farmacéuticas que su formulación contienen dichas enzimas como principio activo.

TABLA VI. DESCRIPCIÓN DE LAS FORMAS FARMACÉUTICAS

Forma farmacéutica	Descripción
Espasmo Canulase ®	Laboratorio farmacéutico Novartis PRINCIPIO ACTIVO (p.a.) Cada comprimido contiene: Pancreatina amilasa mínimo 2100 unidades Pancreatina lipasa mínimo 1200 unidades Pancreatina proteasa mínimo 80 unidades
Pankreoflat ® N	Laboratorio farmacéutico BAYER PRINCIPIO ACTIVO (p.a.) Cada tableta contiene: Pancreatina 170mg.

FUENTE: Morales L., 2014

2.4.6.2.1 Procedimiento

La simulación del jugo gástrico se preparó por suspensión de pepsina en solución salina estéril (0,5% p/v) utilizando 1,43g de polvo de la forma farmacéutica Espasmo Canulase® que contienen pancreatina como p.a., y el pH de la solución fue ajustado a 2,7 con HCl conc. Mientras que la simulación del jugo pancreático fue preparado por una suspensión de pancreatina en una solución salina estéril (0,5% NaCl p/v). Se utilizó una concentración de 0,0081g/mL de polvo de la forma farmacéutica Pancreoflat ® que contiene como p.a.170 mg de pancreatina y el pH de esta solución se ajustó a 8.2 con NaOH 0,1N.

La tolerancia del test forzado a la simulación de los jugos gástrico y pancreático se determinó transfiriendo una alícuota de 0,2 mL de bebida fermentada a un tubo tapa rosca, posteriormente se adicionó 0,3 mL de NaCl (0,5% p/v) y 1 mL de la simulación de jugo gástrico o una pequeña cantidad de pancreático. La mezcla fue incubada a 37° C por 120 min para la tolerancia gástrica y 180 min para la tolerancia pancreática. Para proteger la tolerancia se tomaron alícuotas de 0,1 mL periódicamente para la determinación de la cuenta de viables totales según el método de siembra en superficie.

2.4.6.3 Tolerancia a las sales biliares

El pH ácido del estómago no es la única barrera que los microorganismos probióticos deben superarla para llegar vivos al intestino y ejercer su efecto beneficioso en el huésped. En el intestino delgado, el impedimento más importante para los microorganismos son las sales biliares por lo que los probióticos para ejercer su acción benéfica deben resistir a la acción de esta barrera natural. La concentración de sales biliares en el intestino humano es variable y difícil de predecir. (ORTIZ, A Y REUTO, J. 2007)

2.4.6.3.1 Procedimiento

El caldo Soya Triptica fue suplementado con sales biliares (cálculos biliares) hasta obtener una concentración de 0.3% y 0,6% (p/v), respectivamente. Posteriormente el medio de cultivo fue esterilizado a 121° C durante 15 min.

En un tubo tapa rosca se inoculó 1 mL de bebida fermentada con 9 mL de caldo Soya Triptica suplementado con sales biliares, el mismo que fue incubado a 37° C durante 24 horas. Finalizado el tiempo de incubación, se realizaron recuentos en placa de cada concentración de caldo Soya Triptica adicionado de sales biliares. Se sembró por el método de superficie 100 µL de cada muestra en agar PCA, las placas fueron incubadas a 37° C por 24 horas y el recuento se reportó en UFC/mL.

2.4.6.4 Reducción del colesterol en presencia de sales biliares.

Se preparó el medio de cultivo caldo Soya Triptica suplementado con 0,3% de sales biliares. A continuación se tomó 2 tubos tapa rosca, en cada tubo se colocó 9 mL de caldo Soya Triptica suplementado con sales biliares y 500 µL de estándar de colesterol de la casa comercial Human cuya concentración marcada es de 200mg/ dL. A uno de los tubos se le adicionó 1 mL de muestra (bebida) mientras que al otro tubo no se le adicionó bebida ya que fue utilizado como control. La mezcla se llevó a incubar a 37° C por 24 horas, transcurrido este tiempo se centrifugaron los tubos a 2500 rpm durante 5 minutos. Se tomó 1 mL del sobrenadante de cada tubo y se lee la absorbancia en el espectrofotómetro tanto del control como de la muestra a 500 nm frente al blanco de colesterol Human.

2.4.6.5 Evaluación funcional de la B.K frente a varios patógenos.

Para determinar la sensibilidad de los m.o se utiliza el agar Mueller-Hinton, porque es un medio de cultivo considerado el mejor para realizar las pruebas de sensibilidad de rutina dado que:

- Muestra buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad
- Contiene bajo nivel de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina.
- Es adecuado para el desarrollo de la mayoría de las bacterias patógenas.
- Existen suficientes datos recopilados que avalan la experiencia de las pruebas de sensibilidad realizadas en este medio. (MALBRÁN, C. 2001)

Para estandarizar la densidad del inóculo se utilizó el estándar Mc Farland (de escala 0.5) como estándar de turbidez; el mismo que se debe guardar en refrigeración para conservarlo por mayor tiempo (6 meses).

2.4.6.5.1 Procedimiento

Para realizar la prueba de sensibilidad antimicrobiana de la bebida optimizada de Kombucha se utilizaron microorganismos patógenos tanto Gram positivos (*Staphylococcus aureus*, y *Candida*) como Gram negativos (*Escherichia coli* y *Salmonella gallinarum*).

Pasos a seguir para evaluar la capacidad probiótica de la B.K.

1. Para activar las cepas ATCC de los patógenos, se inocularon cada una de las cepas en el medio de cultivo líquido Cerebro Corazón y se llevaron a incubar a 37° C por 24 horas.
2. Posteriormente se sembraron las cepas reactivadas en los medios de cultivo selectivos para cada uno de los patógenos. Se utilizó agar Mackonkey para las bacterias *E. coli* y *Salmonella gallinarum*, Manitol para *S. aureus* y para *Candida* se utilizó agar Sabouraud-cloranfenicol, las mismas que se incubaron por 24 horas.
3. Para conservar los patógenos reactivados se sembraron cada una de ellos en agar Mueller Hinton pico flauta.

4. Se tomaron 4 tubos tapa rosca y en cada uno de ellos se colocó 5 mL de bebida fermentada. A continuación se inoculó un patógeno en cada tubo hasta alcanzar una concentración igual a la del estándar MacFarland (10^5 UFC) y los tubos fueron incubados a 37°C por 24 horas.
5. Transcurrido las 24 horas se procedieron a sembrar cada uno de los patógenos en agar Mueller Hinton, llevándolos a incubar a 37°C por 24 horas.
6. Finalmente se contaron las colonias que crecieron y se reportaron en UFC.

2.4.7 DISEÑO EXPERIMENTAL DE PLACKETT BURMAN (PB)

Los diseños de PB son diseños factoriales fraccionados a dos niveles, que se utilizan para estudiar $K=N-1$ variables, en N ensayos, donde N es múltiplo de 4.

Los diseños factoriales se utilizan para estudiar el efecto conjunto de varios factores sobre una respuesta. Estos diseños se basan en la variación simultánea de un número limitado de niveles de un factor. El diseño de PB trabaja generando matrices ortogonales como la de matriz de Hadamard que matemáticamente es una matriz cuadrada cuyas entradas son +1 o -1 y cuyas filas son mutuamente ortogonales. En la práctica las matrices se utilizan como método de screening o cribado con el objetivo de identificar los factores importantes en un proceso que tienen realmente influencia en la variable. El diseño de PB consta de dos fases que son: (**Quality Trainig Portal. 2014**)

- a. Screening
- b. Optimización por la metodología superficies respuesta.

La ventaja que presentan los diseños PB respecto a otros diseños de 'screening' (Taguchi, etc.), es su completa ortogonalidad entre las variables y el número reducido de experimentos cuando se trabaja con muchos factores.

Estudio de cribado o screening.

Al plantear una investigación se encuentra una larga lista de factores influyentes, que para obtener un estudio optimizado es necesario reducir dichos factores a un número manejable, razón por lo cual se deben cribar en función de su influencia en la respuesta considerando su significancia estadística; es decir, de un grupo de factores se analiza

cuál o cuáles son los factores que mayor influencia presentan sobre una variable.
(QualityTrainigPortal. 2014)

Optimización: Metodología superficie respuesta.

Esta metodología es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas utilizadas para moldear y analizar problemas en los que una variable de interés es influenciada por otras. El objetivo es optimizar la variable de interés lo cual se logra al determinar las condiciones óptimas de operación del sistema, para lo cual se utilizó el diseño de Viewer. **(RIVAS, Y. 2014)**

Al optimizar una o varias respuestas en un producto o proceso, se debe conocer que valores de los factores proporcionan respuestas (rendimiento, sabor, etc.) con la calidad deseada. Estos se pueden conocer calculando con un modelo matemático denominado superficie de respuesta que relaciona los factores más relevantes con las respuestas.
(RIVAS, Y. 2014)

CAPÍTULO III

3. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

3.1.PREFORMULACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LA B.K

Para la preformulación y el posterior estudio de optimización de la BK se aplicó los diseños experimentales de Plackett Burman (PB), que son diseños fraccionados factoriales que se dan a dos niveles y se utilizan para estudiar el efecto conjunto de varios factores sobre una variable. Para facilitar el trabajo estadístico se utilizó el programa DOEpack 2000 serie Nº: P-DOEW-3.0-F4CG_-0001-UWE, dentro del cual se encuentran incluidos dichos diseños.

Los diseños de PB son diseños de optimización, que trabajan generando matrices ortogonales. Además estos diseños se dan en dos fases que son:

- a. Screening o cribado y la
- b. Optimización

3.3.1 Estudio de cribado o screening de la B.K

En la BK se realizó el screening de preformulación con la finalidad de identificar qué factor o factores influyen sobre una variable. Para realizar el screening se plantearon varios factores y variables como se muestran en el cuadro Nº 1.

CUADRO N°1. PLANTEAMIENTO DEL DISEÑO

FACTORES			VARIABLES
Factores	Cantidad	Unidades	Variable
Sacarosa (Sa.)	0,25	M	- pH
	0,5	M	- Grados Brix
Té negro (Té)	625	ppm	- Cantidad de m.o
	2500	ppm	- Densidad
Tiempo de fermentación (t)	7	Días	- Acidez titulable
	15	Días	- Vitamina C
Ciclos de oxigenación (O ₂)	30	Minutos	- Grado
	60	Minutos	alcohólico
Concentración de inóculo [Inó.]	12500	ppm	
	25000	ppm	

Donde:

La **sacarosa** aporta la energía necesaria para el metabolismo de los microorganismos, mientras que el **té negro** aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo de dichos microorganismos.

Tiempo de fermentación: de él penderá el grado de acidez y la carbonatación final de la bebida.

Ciclos de oxigenación: son necesarios para que se produzca la fermentación aerobia.

Concentración de inóculo: se buscó una concentración adecuada para obtener un producto de calidad.

Los factores planteados en este estudio son de 2 tipos:

- a. **Tecnológicos:** Tiempo y Sacarosa
- b. **Formulación:** Té negro, ciclos de oxigenación, concentración de inóculo. **Ver cuadro N° 1.**

Además las cantidades planteadas para cada factor fueron escogidas disirniendo varios estudios científicos y de ellos se escogió la mejor formulación para obtener un producto de calidad.

En el cribado de la BK se plantearon 5 factores, 7 variables y se realizaron 8 ensayos para poder evaluar cuál de todos los ensayos planteados presentan mejores atributos de calidad para obtener una bebida optimizada. **VER CUADRO N° 2 y N° 3.**

CUADRO N°2. PREFORFULACIÓN DE LA BK

TRATAMIENTOS					
RUN	Sa.	Té	t	O ₂	[Inó.]
1	0,5	2500	15	60	25000
2	0,5	2500	15	30	12500
3	0,5	625	7	30	12500
4	0,5	625	7	60	25000
5	0,25	625	15	60	12500
6	0,25	625	15	30	25000
7	0,25	2500	7	30	25000
8	0,25	2500	7	60	12500

Una vez que las formulaciones cumplieron con los tiempos de fermentación (T.F) establecidos, se procedió a evaluar cada una de las variables propuestas por triplicado.

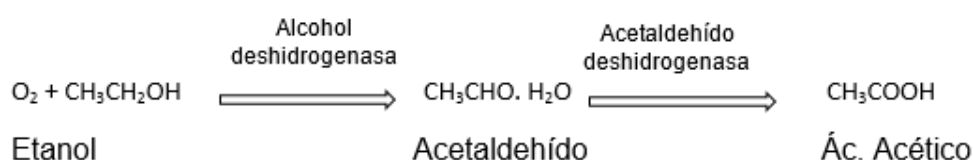
CUADRO N°3. EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE VARIABLES

RUN	pH			° Brix			[m.o]			d			I _A		
	R #1	R #2	R #3	R #1	R #2	R #3	R #1	R #2	R #3	R #1	R #2	R #3	R #1	R #2	R #3
1	3	3	3,01	7,4	7,4	7,4	920	410	1000	1,0279	1,0279	1,0281	0,2619	0,2716	0,291
2	3,12	3,11	3,12	8	8	8	290	290	250	1,0389	1,0389	1,0389	0,1552	0,1746	0,1552
3	3,58	3,56	3,58	8,2	8,2	8,2	2470	1980	2240	1,0297	1,0275	1,0297	0,0472	0,0567	0,0567
4	3,42	3,41	3,42	8,6	8,6	8,6	1700	1500	1600	1,0313	1,0313	1,0313	0,0945	0,0756	0,0945
5	3,24	3,24	3,24	4,8	4,8	4,8	1270	1210	1000	1,0259	1,0272	1,0272	0,1067	0,097	0,1067
6	2,97	2,98	2,97	4,6	4,6	4,6	180	150	320	1,0216	1,0218	1,0218	0,1746	0,1649	0,1746
7	3,5	3,51	3,51	4,6	4,6	4,6	3960	2730	3345	1,0205	1,0208	1,0206	0,0945	0,0756	0,085
8	3,52	3,51	3,52	5,2	5,2	4,6	3700	2500	3100	1,0184	1,0186	1,0184	0,1134	0,1039	0,0945

CONTINUACIÓN.....

RUN	Vit. C			° A		
	R #1	R #2	R #3	R #1	R #2	R #3
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0

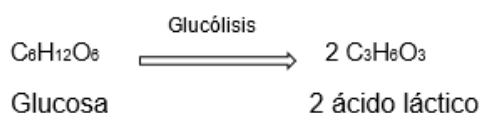
Como se puede observar en el cuadro № 3, los resultados obtenidos al evaluar cada uno de los factores planteados en cada una de las formulaciones son muy similares entre sí a excepción de la concentración microbiana, en la cual existe una ligera variación. También se observó que en la BK no existe vitamina C debido a que es fácilmente degradada por el oxígeno, como tampoco existió alcohol ya que los taninos inhiben parcialmente la fermentación alcohólica y la poca cantidad de etanol generado es oxidado por las bacterias acéticas (*Acetobacter*) a ácido acético. Estas bacterias a diferencia de las levaduras productoras de alcohol, requieren gran cantidad de O₂ para su crecimiento y actividad. El proceso metabólico se basa en la conversión del etanol a acetaldehído (se encuentra hidratado) y este a su vez es transformado en ácido acético.



Fuente: Morales L. 2014

FIGURA N° 17. OXIDACIÓN DEL ETANOL

Las bacterias ácido lácticas actúan sobre el etanol y el ácido acético produciendo ácido láctico.



3.3.1.1.1 Análisis estadístico de Medias (ANOM) y ANOVA

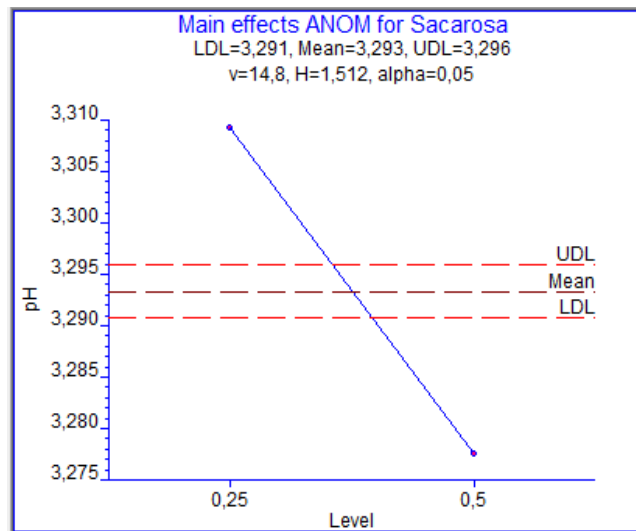
Se realizó el análisis de medias(ANOM) con la finalidad de identificar los factores que afectan las respuestas promedio de cada una de las variables planteadas; mientras que ANOVA permitió valorar la variabilidad que existe tanto entre datos experimentales de cada variable como entre las matrices generadas en el estudio de optimización.

3.3.1.1.1.1 ANOM: Efecto principal de varios factores sobre el pH

En este estudio se realizó el ANOM con un nivel de significancia del 0,05 % para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de cada una de las variables planteadas en el screening.

Efecto de la concentración de sacarosa sobre el pH

CUADRO N° 4. pH vs SACAROSA



Como se puede observar en el cuadro N° 4, la concentración de sacarosa sobre el pH presenta un efecto negativo, es decir; mientras mayor sea la concentración de sacarosa más ácida es la bebida. Como se conoce la Kombucha una simbiosis de bacterias (*Acetobacter spp*, *Gluconobacter*) y levaduras del género *Sacharomyces*, en la cual se generan 3 tipos de fermentación que son alcohólica, láctica y acética originándose los

ácidos acético, láctico, glucónico, glucorónico, carbónico y etanol, que son responsables de la acidez y del olor característico de la Kombucha.

Las levaduras hidrolizan la sacarosa en glucosa y fructosa, produciendo etanol y CO₂; mientras que bacterias ácido acéticas convierten la glucosa en ácido glucorónico y la fructosa en ácido acético. La levadura *Pichia fermentans*, fermenta la glucosa produciendo ácido láctico. Las bacterias acéticas utilizan la glucosa para la producción de ácido glucorónico, el mismo que es transformado en etanol, y este es oxidado por dichas bacterias a ácido acético, generando como subproducto celulosa que se va acumulando en capas para formar el hongo.

Las bacterias ácido lácticas actúan sobre el etanol y el ácido acético produciendo ácido láctico. Por todas las razones expuestas anteriormente la BK es ácida.

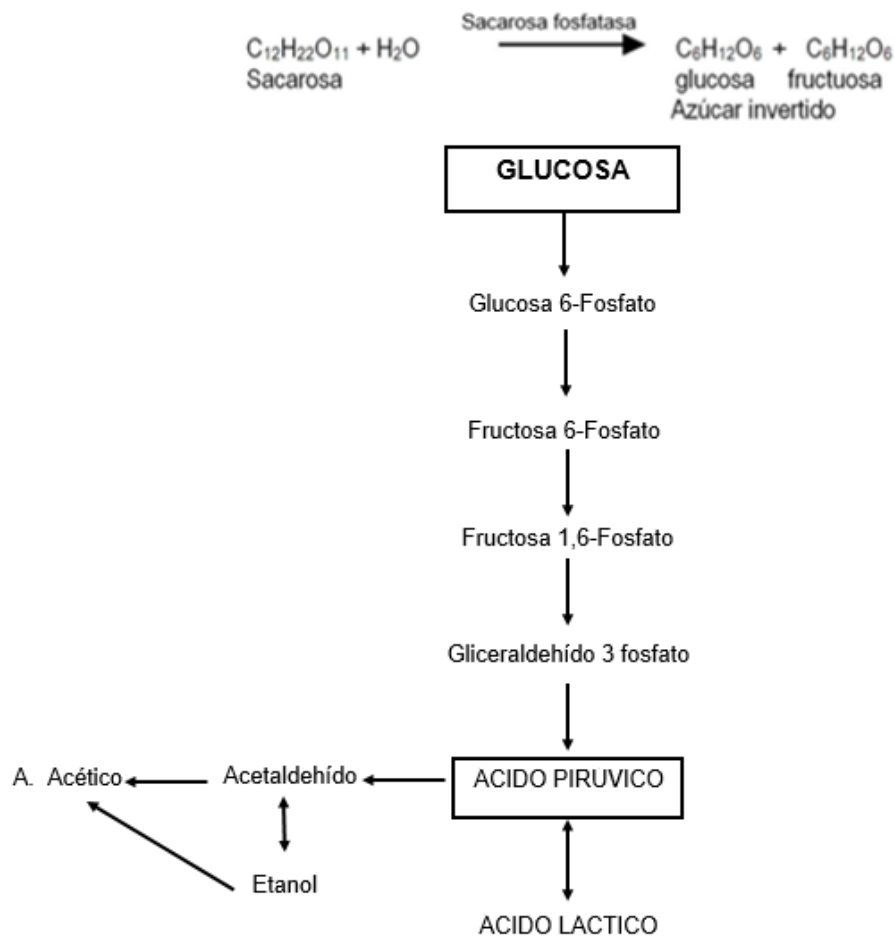
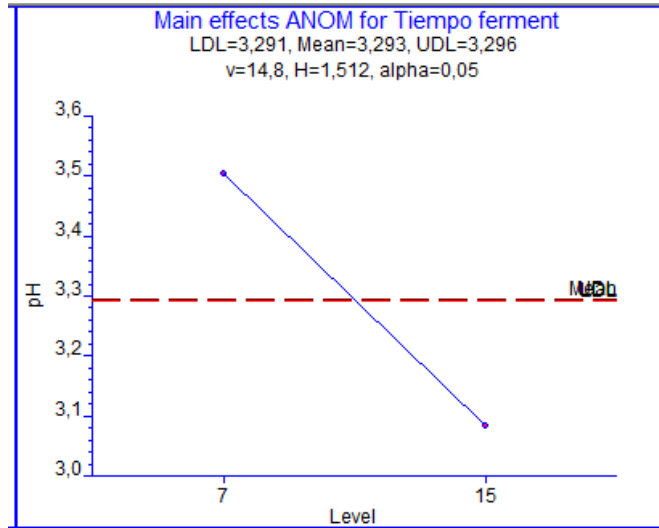


FIGURA N° 18. ÁCIDOS PRODUCIDOS EN LA FERMENTACIÓN DE LA BK

Efecto del tiempo de fermentación sobre el pH

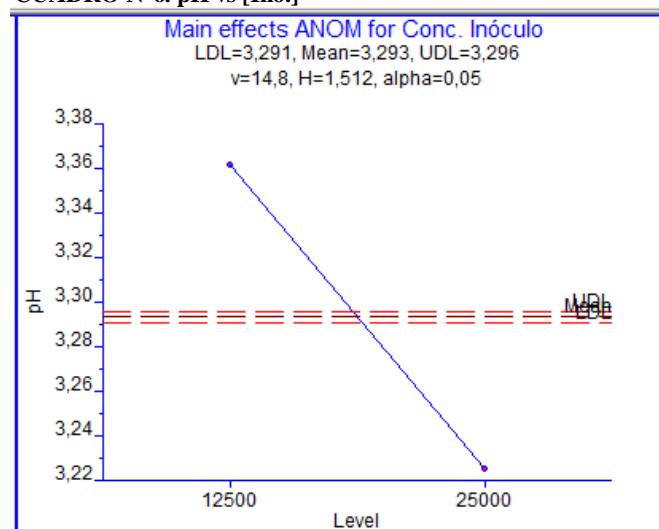
CUADRO N° 5. pH vs T.F



En el cuadro N° 5 se puede apreciar que el tiempo de fermentación (T.F) influye negativamente sobre el pH, es decir, a mayor T.F más ácida es la BK, ya que existe el tiempo necesario para que los m.o transformen la sacarosa en glucosa y fructosa, que a su vez son transformadas en ácidos acético, láctico, glucorónico, glucónico, carbónico etanol, etc., que son responsables de la acidez de dicha bebida.

Efecto de la concentración de inóculo sobre el pH

CUADRO N°6. pH vs [Inó.]

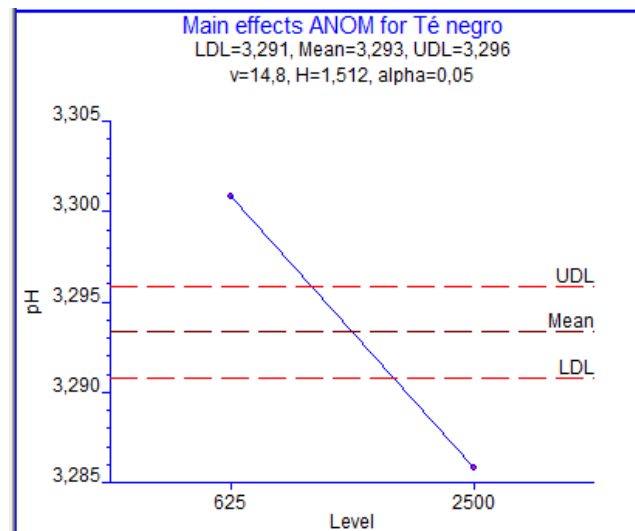


En el cuadro Nº 6 se observa claramente que el efecto de la [Inó.] sobre el pH es negativo, es decir, mientras mayor cantidad de inóculo exista más ácida será la BK. Al existir mayor cantidad de m.o la sacarosa es rápidamente desdoblada generándose los respectivos metabolitos, entre ellos los ácidos acético, láctico, glucorónico, etc., que son los responsables de la acidez de BK.

A medida que transcurre el T.F, la concentración microbiana inicial aumenta ya que la cafeína y las xantinas presentes en la infusión de té estimulan a las bacterias acéticas a la síntesis de ácido acético obteniendo como producto secundario celulosa que se va acumulando en capas para formar el hongo, entonces al existir una mayor concentración microbiana la bebida adquiere una mayor acidez.

Efecto de la concentración de té negro sobre el pH

CUADRO Nº7. pH vs CONCENTRACIÓN DE TÉ NEGRO

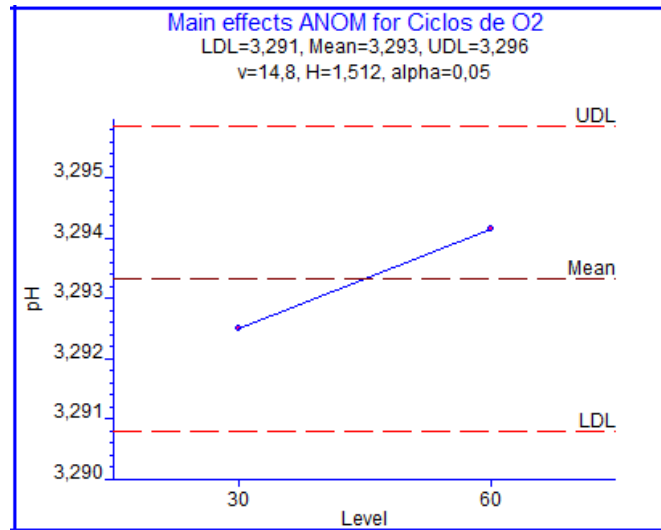


En el cuadro Nº 7 se observa que el efecto de la concentración de té negro sobre el pH es negativo, ya que al aumentar la cantidad de té negro la BK adquiere mayor acidez. El pH es ácido debido a que el té negro posee gran cantidad de enzimas fenolasas, por lo tanto la actividad enzimática es alta. Las fenolasas catalizan la oxidación de algunos polifenoles mejorando la conversión de glucosa, lo que quiere decir que mientras mayor cantidad de té negro exista mayor será la cantidad de fenolasas para catalizar oxidación de los polifenoles, por ende una mayor cantidad de glucosa va a ser desdoblada

originando los metabolitos secundarios correspondientes, entre ellos los ácidos que son los responsables de la acidez de la BK.

Efecto de los ciclos de oxigenación sobre el pH

CUADRO N° 8. pH vs CICLOS DE O2

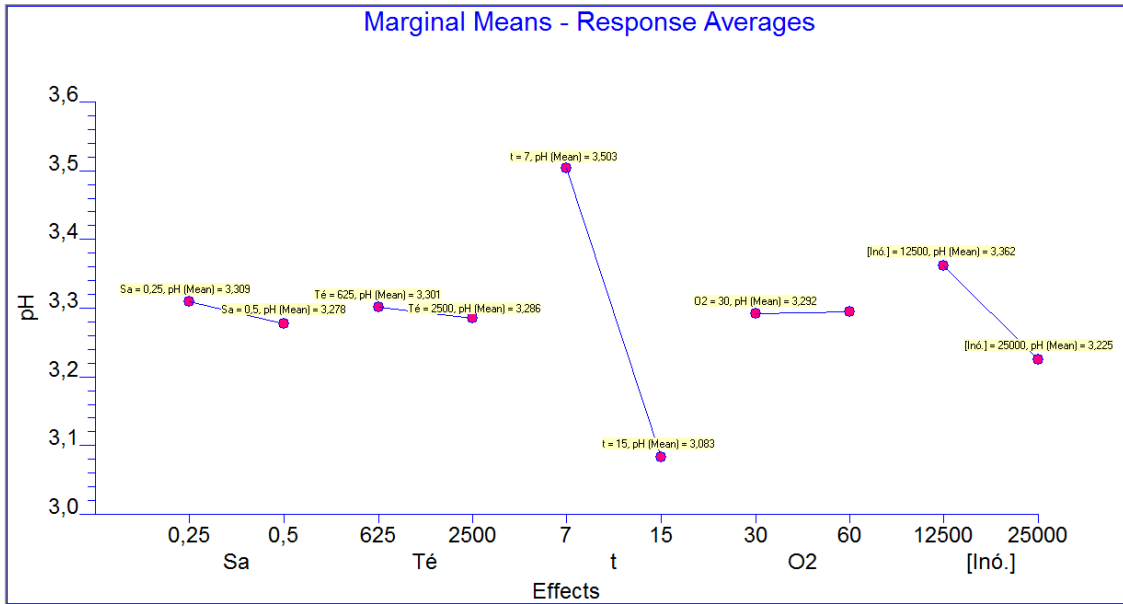


En el cuadro N° 8 se observa que el efecto de los ciclos de oxigenación sobre el pH es positivo, ya que al aumentar el tiempo de oxigenación el pH también se incrementa; es decir a mayor tiempo de oxigenación menos ácida es la bebida. La Kombucha es una simbiosis constituida por m.o aerobios y anaerobios; por lo tanto, la oxigenación inhibe la fermentación anaerobia, razón por la cual el pH no es tan ácido.

3.3.1.1.2 Medias marginales-Respuestas de los promedios del pH

Con la gráfica de medias marginales podemos ver de forma general como cada uno de los factores planteados en el cuadro N° 1 influyen sobre una variable, en este caso sobre el pH.

CUADRO N°9. EVALUACIÓN DE LAS MEDIAS MARGINALES



En el cuadro se N° 9 se observa que la concentración de sacarosa, té, inóculo y el tiempo de fermentación afectan negativamente sobre el pH, es decir, a mayor concentración de cada uno de estos factores más ácida es la BK ya que existe el sustrato y el tiempo necesario para que se genere los productos de fermentación respectivos. En la Kombucha se produce tres tipos de fermentación: acética, láctica y alcohólica, en la cual se originan los ácidos acético, láctico, glucónico, glucorónico, carbónico y etanol que son responsables de la acidez, del sabor y del olor característico de la Kombucha. Además el etanol es oxidado a ácido acético.

También se puede apreciar que los ciclos de oxigenación afecta positivamente al pH porque inhiben la fermentación anaerobia, mientras mayor sean los ciclos de oxigenación menos ácida es la bebida.

3.3.1.1.1.3 Análisis estadístico de Varianzas (ANOVA)

Se realizó el ANOVA con un nivel de significancia del 0,05%, para evaluar la variabilidad que existe entre los datos del pH obtenidos experimentalmente como también para valorar la matriz que mayor variabilidad produce en el pH.

CUADRO N°10. ANOVA

Source	SS	DF	MS	F-ratio	I-hat	P-value	% contrib
ANOVA tables for pH (Response Averages) - Alpha level = 0,05							
One-Way ANOVA							
Source	SS	DF	MS	F-ratio	I-hat	P-value	% contrib
Between	1,229	7	0,1755	4213 *		<0,001	
Within (error)	0,0006667	16	4,167E-05				
TOTAL	1,229	23					
Single degree of freedom ANOVA							
Source	SS	DF	MS	F-ratio	I-hat	P-value	% contrib
A Sa (0,25 v 0,5),Té x t,O2 x	0,006017	1	0,006017	144,4 *	-0,03167	<0,001	0,5
B Té (625 v 2500),Sa x t,t x t	0,00135	1	0,00135	32,4 *	-0,015	<0,001	0,1
C t (7 v 15),Sa x Té,Té x O2	1,058	1	1,058	25400 *	-0,42	<0,001	86,1
D O2 (30 v 60),Sa x [Inó.],Té	1,667E-05	1	1,667E-05	0,4	0,001667	0,536	0,0
E [Inó.] (12500 v 25000),Sa x	0,1121	1	0,1121	2690 *	-0,1367	<0,001	9,1
F Té x O2,t x [Inó.],Sa x Té x	0,01707	1	0,01707	409,6 *	-0,05333	<0,001	1,4
G Té x [Inó.],t x O2,Sa x Té x	0,03375	1	0,03375	810 *	0,075	<0,001	2,7
Within (error)	0,0006667	16	4,167E-05				
TOTAL	1,229	23					

En el cuadro N° 10 se observa que existe variabilidad entre datos experimentales del pH con una SS de 1,229, cuya desviación de medias (MS) fue 0,1755. La matriz que mayor influencia presenta sobre el pH es el tiempo de fermentación con el 86,1%, cuya SS es de 1,058 y el valor observado es < 0,001.

3.3.1.1.1.4 Optimización del pH (metodología superficies respuesta)

El objetivo de la optimización es optimizar el pH mediante la metodología superficies respuesta, la misma que se base en el uso de matrices ortogonales. Los diseños de PB trabaja generando matrices ortogonales como la de matriz de Hadamard que matemáticamente es una matriz cuadrada cuyas entradas son +1 o -1 y cuyas filas son completamente ortogonales.

3.3.1.1.4.1 Generación de matrices

CUADRO N°11. OPTIMIZACIÓN DEL pH

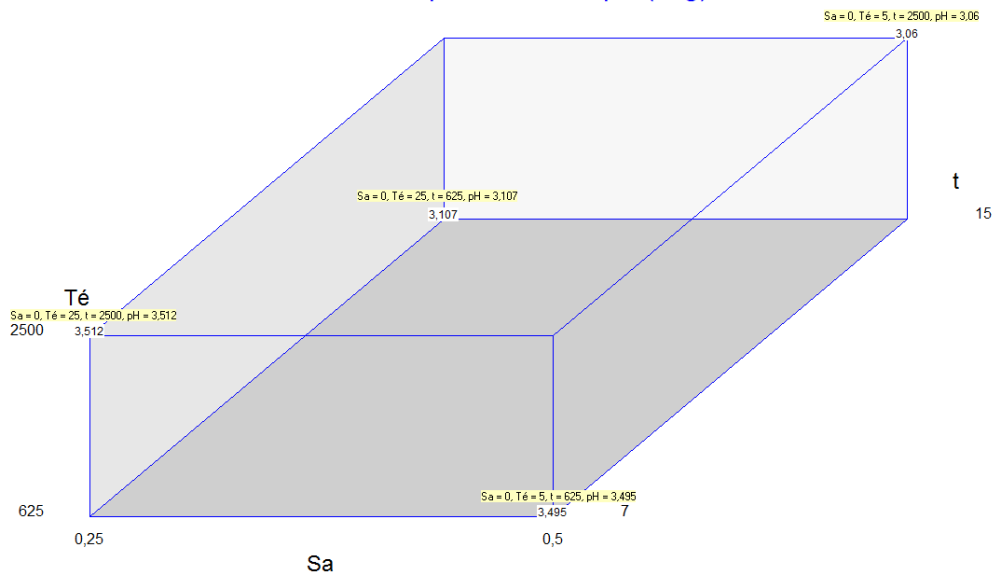
Design Viewer - 8-run Reflected Plackett-Burman												
File												
Treatments						Contrasts						
	Sa	Té	t	O2	[Inó.]	A	B	C	D	E	F	G
Run						Sa	Té	t	O2	[Inó.]		
1	0,5	2500	15	60	25000	1	1	1	1	1	1	1
2	0,5	2500	15	30	12500	1	1	1	-1	-1	-1	-1
3	0,5	625	7	30	12500	1	-1	-1	-1	-1	1	1
4	0,5	625	7	60	25000	1	-1	-1	1	1	-1	-1
5	0,25	625	15	60	12500	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	0,25	625	15	30	25000	-1	-1	1	-1	1	1	-1
7	0,25	2500	7	30	25000	-1	1	-1	-1	1	-1	1
8	0,25	2500	7	60	12500	-1	1	-1	1	-1	1	-1
					Alias:	BC	AC	AB	AE	AD	BD	BE
						DE	CDE	BDE	BCE	BCD	CE	CD
											ABE	ABD
											ACD	ACE

En el cuadro N° 11 se puede apreciar que la matriz C, que viene a ser el tiempo de fermentación es el factor que mayor influencia presenta sobre el pH y a la vez dicho factor presenta una interacción principal con la concentración de sacarosa (matriz A) y té negro(matriz B). Estas tres matrices se evaluaron en conjunto obteniéndose un pH de 3,06.

3.3.1.1.4.2 Evaluación de matrices

CUADRO N° 12. EVALUACIÓN DE LAS MATRICES

Response Plot for pH (Avg)



En el cuadro N° 12 se observa que al unir dichos factores se obtiene una gráfica de aristas, donde el valor óptimo del pH fue de 3,09 y para obtener dicho valor se necesitó una formulación compuesta por una concentración 0,5M de sacarosa, 2500ppm de té negro y 15 días de fermentación, tiempo necesario para que se generen los ácidos respectivos que son responsables del sabor y del olor característico de la Kombucha.

3.3.1.1.2 Grados Brix: Análisis ANOM y ANOVA

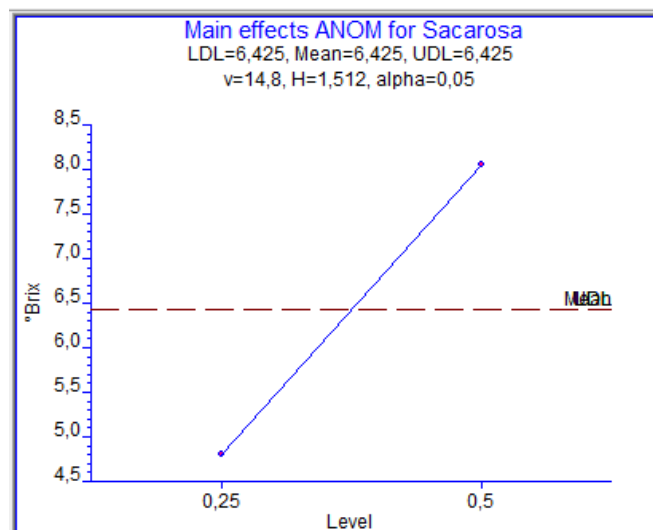
Tanto el ANOM como el ANOVA para los grados Brix fueron evaluados con un nivel de significancia de 0,05%.

3.3.1.1.2.1 ANOM de los grados Brix

Se evaluó cada uno de los factores planteados en el cuadro N° 1 para ver cuál es el factor o factores que mayor influencia presentan en los grados Brix.

Efecto de la concentración de sacarosa sobre los grados Brix

CUADRO N°13. BRIX vs [Sa]

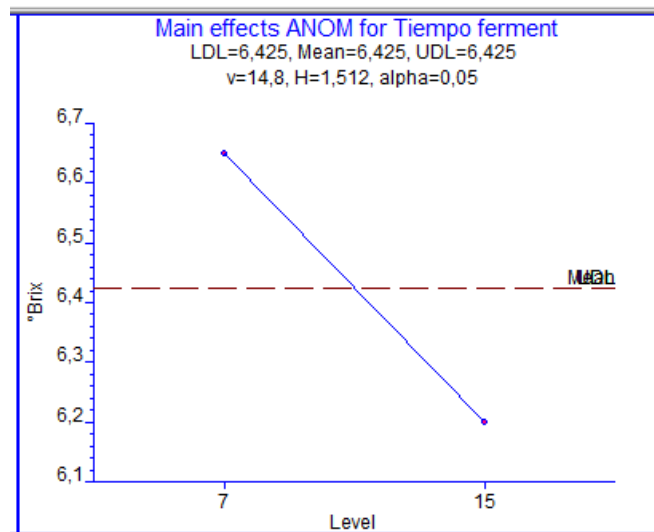


En el cuadro N°13 se puede apreciar que el efecto de la concentración de sacarosa frente a los grados Brix es un efecto positivo ya que al aumentar la concentración de sacarosa, también se incrementa la cantidad de sólidos disueltos (SD). Es una relación directamente proporcional.

Al existir mayor cantidad de sacarosa va existir mayor cantidad de azúcar en disolución porque a más de los productos generados por la hidrólisis de la sacarosa va a existir una parte de sacarosa que no ha sido hidrolizada, razón por lo cual la cantidad de azúcar en disolución es mayor, produciéndose una elevación en los grados Brix.

Efecto del tiempo de fermentación sobre los grados Brix

CUADRO N°14. °BRIX vs T.F

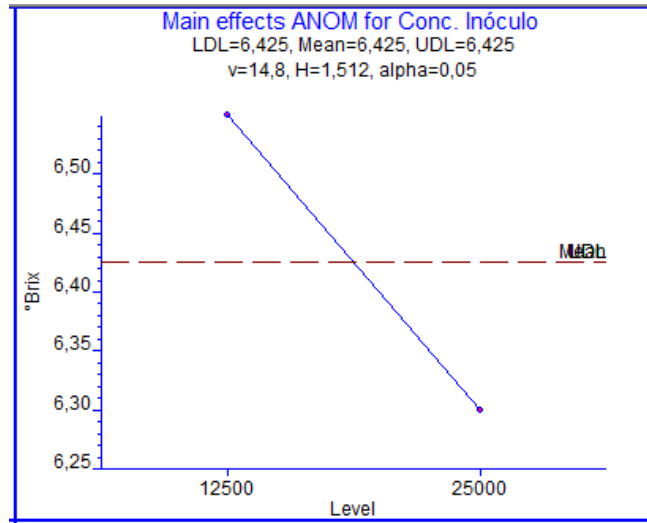


En el cuadro N° 14 se observa que el T.F influye negativamente en los grados Brix, es decir, a mayor T.F menor cantidad de azúcares en disolución existen, ya que gran parte el azúcar ha sido utilizada por los m.o para su supervivencia y producción de los metabolitos secundarios propios de la fermentación.

A medida que la fermentación avanza tanto la glucosa como la fructosa son consumidas por los m.o liberando energía química ATP, necesaria para que los microorganismos realicen sus actividades metabólicas. Como este proceso va a ser un ciclo constante va a llegar un momento en que la cantidad de azúcar sea mínima, por lo tanto los grados Brix también serán bajos.

Efecto de la concentración de inóculo sobre los grados Brix

CUADRO N°15. °BRIX vs [Inó.]

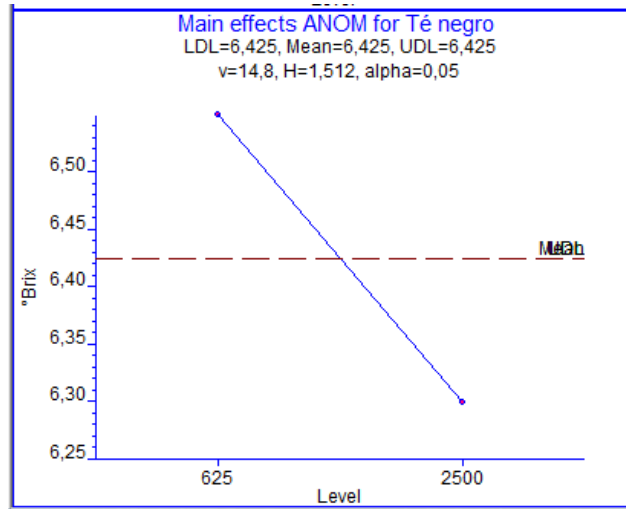


En el cuadro N° 15 se puede apreciar que la concentración de inóculo posee un efecto negativo sobre los grados Brix, es decir a mayor concentración de inóculo menor es la cantidad de sólidos disueltos y viceversa. Debido a la elevada concentración microbiana la cantidad de azúcar en disolución es baja, ya que mayor parte de ella ha sido consumida por los microorganismos originando ácido láctico, glucorónico, acético y carbónico.

Además las bacterias acéticas utilizan la glucosa para la producción de ácido glucorónico, el mismo que es transformado en etanol y finalmente en ácido acético, generando como subproducto celulosa necesaria para desarrollo del Kombucha hijo. Al existir una constante formación del hongo, la cantidad de m.o se eleva, mientras que la cantidad de azúcar en disolución es baja.

Concentración de Té negro sobre los grados Brix

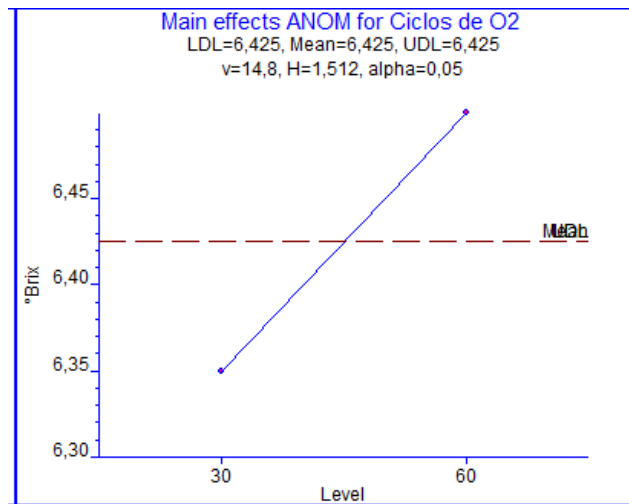
CUADRO N°16. BRIX vs CONCENTRACIÓN DE TÉ NEGRO



En el cuadro N° 16 se nota claramente que la concentración de té negro influye negativamente en los grados Brix; es decir, mientras mayor concentración de té negro exista más baja será la cantidad de azúcar en disolución. Como es conocido el té negro contiene una elevada cantidad de enzimas principalmente fenolasas; estas enzimas catalizan la oxidación de algunos polifenoles y mejoran la conversión de la glucosa, por esta razón la concentración de los SD es baja.

Efecto de los ciclos de oxigenación sobre los grados Brix

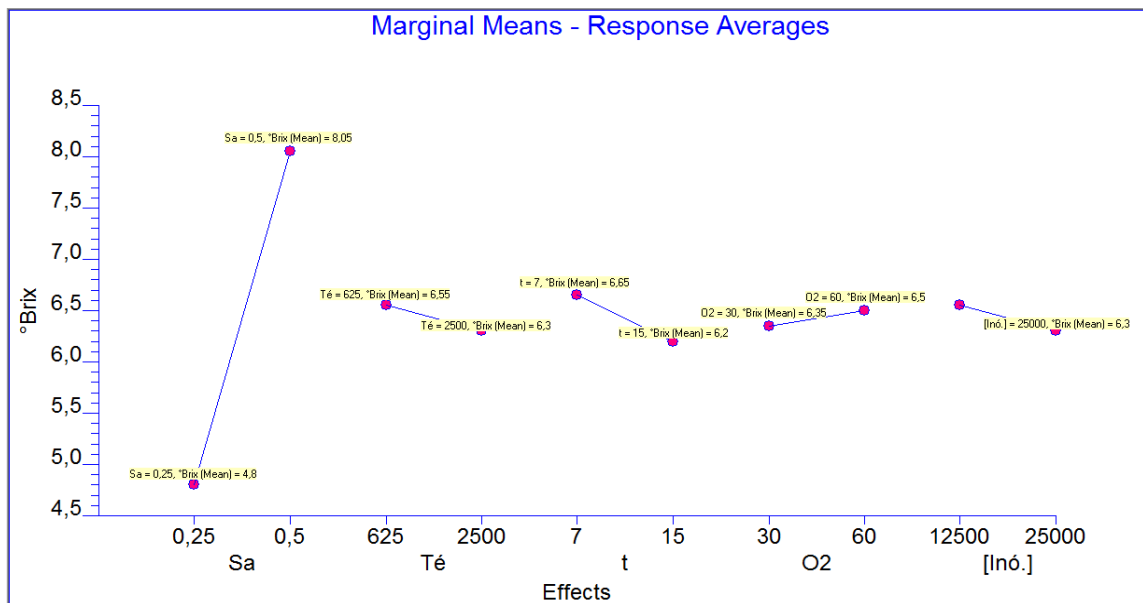
CUADRO N°17. °BRIX vs CICLOS DE OXIGENACIÓN



En el cuadro N° 17 se nota claramente que los ciclos de oxigenación influyen positivamente en los grados Brix; es decir, a mayor tiempo de oxigenación mayor cantidad de azúcar en disolución existe ya que el oxígeno inhibe la fermentación anaerobia, por esta razón la cantidad de azúcar en disolución es alta.

3.3.1.1.2 Medias marginales

CUADRO N°18. [m.o] vs Té, Sa., t, O2, [Inó.]



En el cuadro N° 18 se observan como las medias de los grados Brix van variando en cada factor independientemente de su nivel, sea este alto o bajo. En esta gráfica se observa que la concentración de sacarosa y los ciclos de oxigenación influyen positivamente en los grados Brix, es decir a mayor concentración de sacarosa mayor es la cantidad de azúcar en disolución; mientras que el oxígeno inhibe la fermentación anaerobia ya que en la Kombucha se encuentran microorganismos aerobios y anaerobios, por ende existe una mayor cantidad de azúcar en disolución.

También se nota que la concentración de té, de microorganismos y el T.F poseen un efecto negativo sobre los grados Brix. Al existir una elevada [té] y de la [microorganismos] con un tiempo de fermentación de 15 días más bajos son los grados,

ya que existe una baja concentración de azúcar en disolución debido a que la mayor cantidad de azúcar ha sido fermentada.

3.3.1.1.2.3 Análisis estadístico de varianzas (ANOVA)

CUADRO N°19. ANOVA DE LOS °BRIX

Source	SS	DF	MS	F-ratio	I-hat	P-value	% contrib
ANOVA tables for Grados Brix (Response Averages) - Alpha level = 0,05							
One-Way ANOVA							
Source	SS	DF	MS	F-ratio	I-hat	P-value	% contrib
Between	66,34	7	9,478	1,962E+15 *		<0,001	
Within (error)	0	16	0				
TOTAL	66,34	23					
Single degree of freedom ANOVA							
Source	SS	DF	MS	F-ratio	I-hat	P-value	% contrib
A Sa (0,25 v 0,5),Té x t,O2 x	63,37	1	63,37	1,312E+16 *	3,25	<0,001	95,5
B Té (625 v 2500),Sa x t,t x t	0,375	1	0,375	7,761E+13 *	-0,25	<0,001	0,6
C t (7 v 15),Sa x Té,Té x O2	1,215	1	1,215	2,515E+14 *	-0,45	<0,001	1,8
D O2 (30 v 60),Sa x [Inó.],Té	0,135	1	0,135	2,794E+13 *	0,15	<0,001	0,2
E [Inó.] (12500 v 25000),Sa x	0,375	1	0,375	7,761E+13 *	-0,25	<0,001	0,6
F Té x O2,t x [Inó.],Sa x Té x	0,135	1	0,135	2,794E+13 *	-0,15	<0,001	0,2
G Té x [Inó.],t x O2,Sa x Té x	0,735	1	0,735	1,521E+14 *	-0,35	<0,001	1,1
Within (error)	0	16	0				
TOTAL	66,34	23					

En el cuadro N° 19 podemos observar la variabilidad que existe entre datos. Al aplicar el ANOVA para los valores de los grados Brix obtenidos experimentalmente se observó que la SS entre los datos fue de 66,34, con una desviación media de 9,478 lo cual indica que existe variabilidad entre los valores medidos para los grados Brix. Mientras que al analizar la variabilidad de datos entre las matrices generadas en este estudio se observó que el factor que mayor influencia presenta sobre los grados Brix es la concentración de sacarosa con el 95,5%, cuya SS es de 66,37 y con una desviación media (MS) de 9,478, donde el valor observado fue < 0,001.

3.3.1.1.2.4 Optimización de los grados Brix

3.3.1.1.2.4.1 Generación de matrices

Para optimizar los grados Brix se aplicaron matrices ortogonales, las mismas que se obtienen al aplicar el diseño de PB, donde las matrices presentan entradas marcadas con 1 y -1 y sus filas son completamente ortogonales.

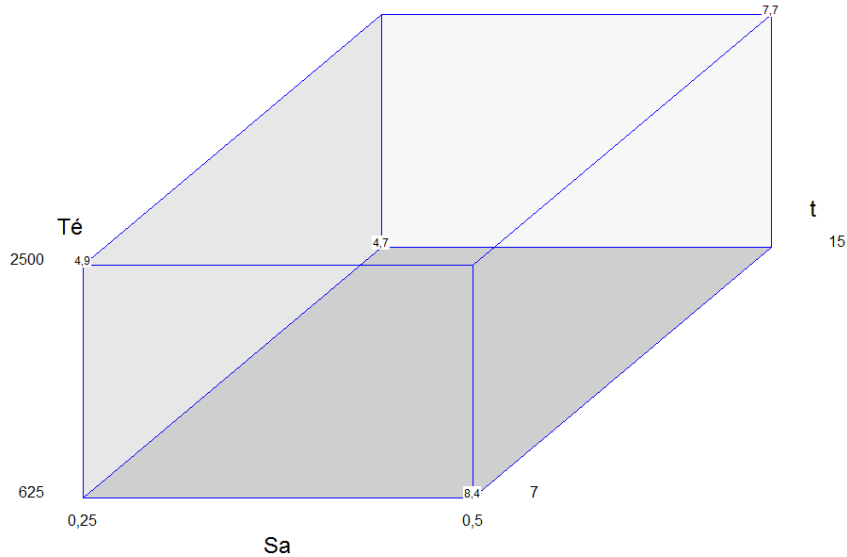
CUADRO N°20. GENERACIÓN DE MATRICES PARA °BRIX

Design Viewer - 8-run Reflected Plackett-Burman												
File												
Run	Treatments					Contrasts						
	Sa	Té	t	O2	[Inó.]	A	B	C	D	E	F	G
1	0,5	2500	15	60	25000	1	1	1	1	1	1	1
2	0,5	2500	15	30	12500	1	1	1	-1	-1	-1	-1
3	0,5	625	7	30	12500	1	-1	-1	-1	-1	1	1
4	0,5	625	7	60	25000	1	-1	-1	1	1	-1	-1
5	0,25	625	15	60	12500	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	0,25	625	15	30	25000	-1	-1	1	-1	1	1	-1
7	0,25	2500	7	30	25000	-1	1	-1	-1	1	-1	1
8	0,25	2500	7	60	12500	-1	1	-1	1	-1	1	-1
					Alias:	BC	AC	AB	AE	AD	BD	BE
						DE	CDE	BDE	BCE	BCD	CE	CD
											ABE	ABD
											ACD	ACE

Teniendo en cuenta que la matriz A representada por la sacarosa es el factor que mayormente influye en la variabilidad de los grados Brix se puede observar en el cuadro N° 20 que la sacarosa (matriz A) presenta una interacción principal con el T.F (matriz C) y la concentración de té (matriz B).

3.3.1.1.2.4.2 Evaluación de matrices: Superficies respuesta

CUADRO N°21.GRADOS BRIX vs t y [té]
Response Plot for °Brix (Avg)



En el cuadro N°21 se observa que los grados Brix óptimos para elaborar la de BK son de 7.7, los mismos que se consigue al formular la BK con 2500ppm de té negro, 0,5M de sacarosa y un tiempo de fermentación de 15 días.

3.3.1.1.3 ANOM y ANOVA para la [m.o]

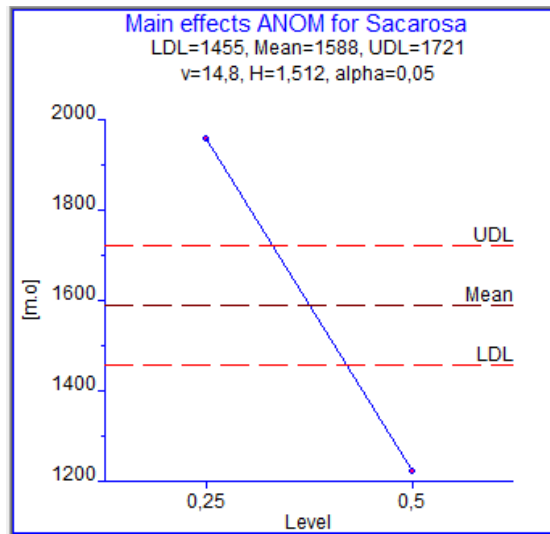
Se realizó tanto el análisis de medias como el análisis de variabilidad que existen entre datos a un nivel de significancia del 0,05%.

3.3.1.1.3.1 ANOM: Efectos de varios factores sobre la [m.o]

En el análisis de medias se pudo observar como cada uno de los factores planteados influyen sobren la concentración de microorganismos.

Efectos de la concentración de sacarosa sobre la concentración microbiana

CUADRO N°22. [m.o] vs [Sacarosa]



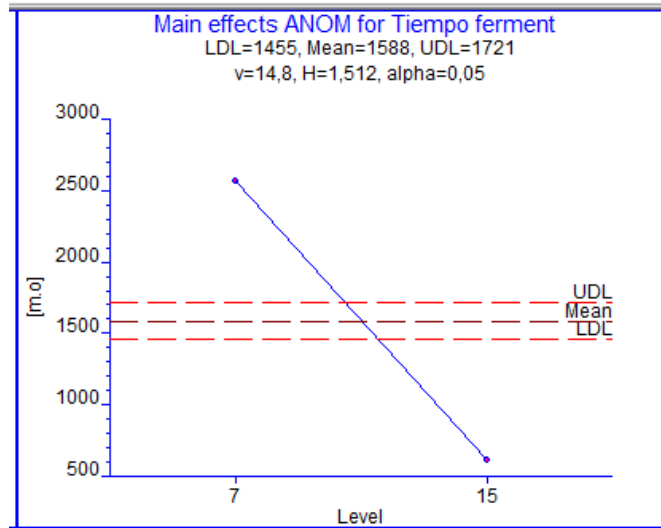
En el cuadro N° 22 se observa que la concentración de sacarosa sobre la [m.o] tiene un efecto negativo, ya que a mayor cantidad de sacarosa menor es la cantidad de microorganismos presente en la B.K y viceversa.

Al hidrolizar la sacarosa se obtiene glucosa y fructosa, las mismas que son degradados por las bacterias y levaduras a ácidos orgánicos de baja cadena carbonada como ácido acético, glucorónico, láctico, y otros subproductos secundarios. Al existir una elevada cantidad de azúcar las bacterias van a estar constantemente generando dichos ácidos llegando un momento en que la cantidad de sustrato va a ser limitada y los microorganismos van a tener que competir por el sustrato donde el más fuerte sobrevivirá.

Al existir una constante producción de ácidos, también existe la formación de la capa celulósica donde los microorganismos son atrapados para formando el nuevo hijo Kombucha. Por las razones expuestas anteriormente la cantidad de microorganismos en la BK es baja.

Principales efectos del tiempo de fermentación sobre la [m.o]

CUADRO N°23. [m.o] vs TF

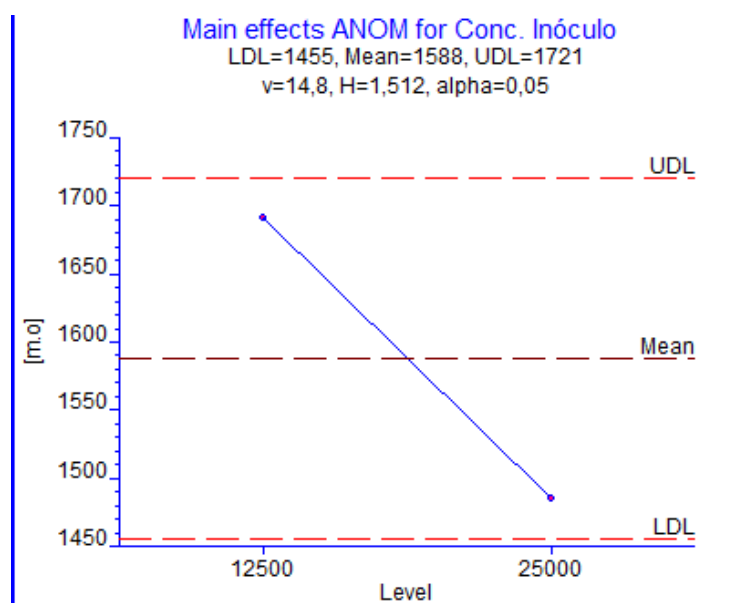


En el cuadro N° 23 se observa que el tiempo de fermentación posee un efecto negativo sobre la [m.o], es decir, a mayor tiempo de fermentación menor concentración de microorganismos y viceversa. A medida que la fermentación avanza las bacterias son atrapadas por la red celulósica para generar el hijo Kombucha, posteriormente se van muriendo ya sea porque han cumplido con su ciclo de vida o por la falta de nutrientes.

Cuando existe una alta carga microbiana la fermentación del azúcar se produce rápidamente y en un tiempo mucho menor, pero va a llegar un tiempo en que la concentración de sustrato va a ser mínima donde los m.o van a empezar a competir por el sustrato pereciendo el más débil. Los m.o para su desarrollo necesitan de energía química ATP, la misma que es obtenida a partir del azúcar, por ende a medida que la fermentación avanza los m.o parecen quedando reducidos a la mínima cantidad posible.

Efectos principales de la [Inó.] sobre la [m.o]

CUADRO N°24. [m.o] vs [Inó.]

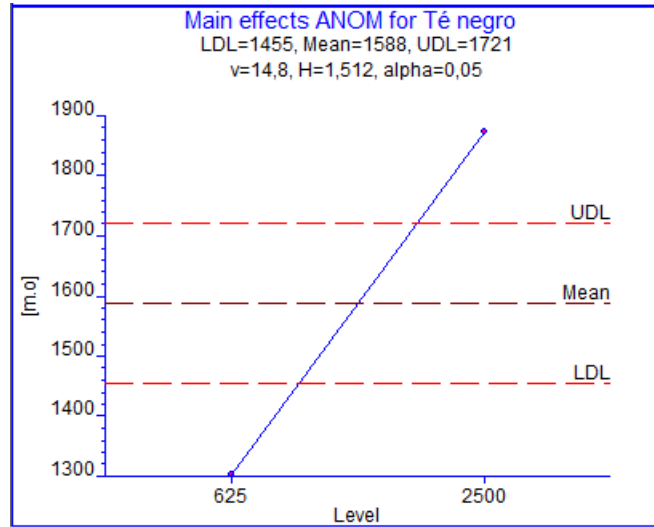


En el cuadro N° 24 se observa que la [Inó.] posee un efecto negativo sobre la concentración de microorganismos; es decir, a mayor concentración de inóculo menor es la [m.o] existentes en la B.K.

La concentración de microorganismos es baja porque existe suficiente concentración de inóculo para llevar a cabo la fermentación en el menor tiempo posible, además a medida que la fermentación avanza la B.K adquiere mayor acidez y al mismo tiempo la cantidad de sustrato cada vez es más limitada. Por ende la concentración de microorganismos es baja, ya sea por la falta de nutrientes o porque los microorganismos han cumplido con su ciclo de vida. Además la baja concentración de microorganismo puede deberse a que estos quedan atrapados en la capa de celulósica para formar el nuevo hijo Kombucha.

Efectos principales dela [té] sobre la [m.o]

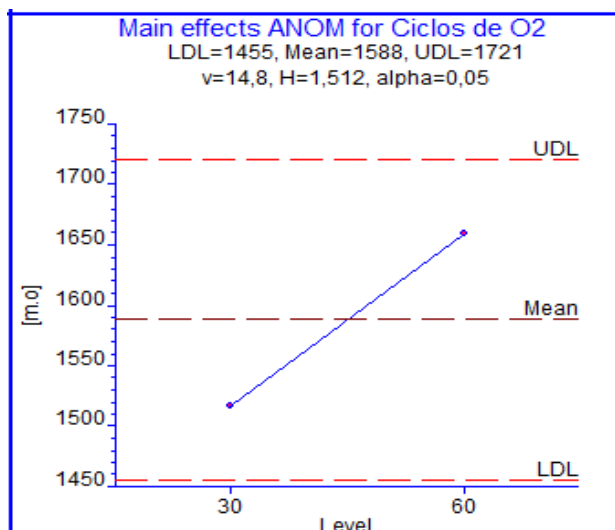
CUADRO N°25. [m.o] vs [té]



En el cuadro N° 25se observa que la [té] sobre la [m.o] tiene un efecto positivo, es decir mientras mayor sea la cantidad de té negro mayor es la concentración de microorganismos. Al existir una mayor cantidad de té negro mayor va hacer la cantidad de microorganismos ya que el té aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo de dichos microorganismos.

Principales efectos de los ciclos de oxigenación sobre la [m.o]

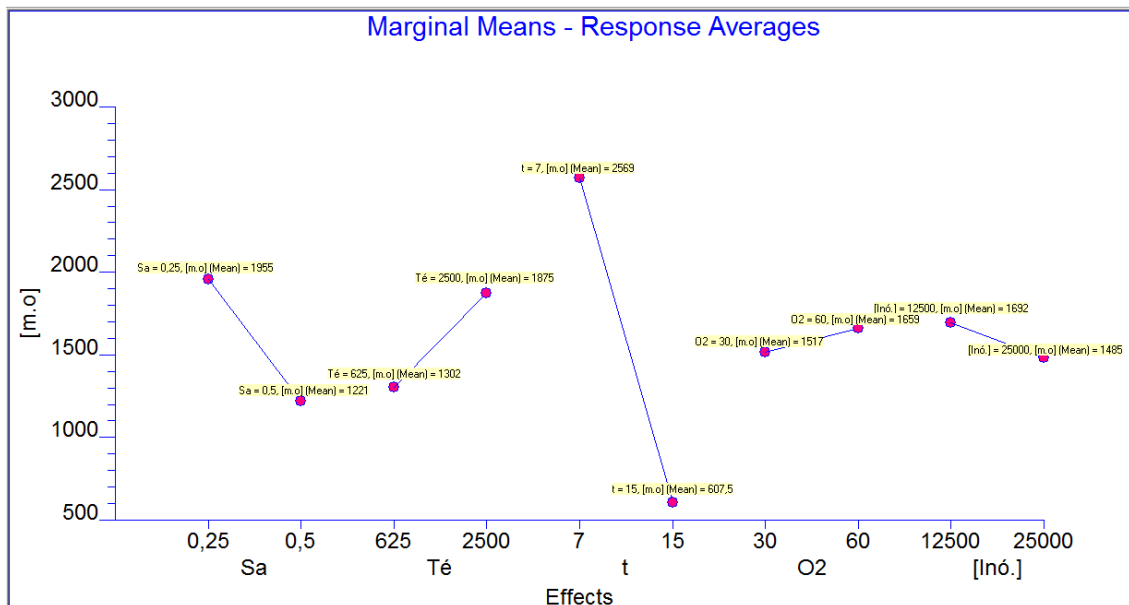
CUADRO N°26. [m.o] vs TIEMPO DE OXIGENACIÓN



En el cuadro N° 26 se evidencia que los ciclos de oxigenación poseen un efecto positivo sobre la [m.o], debido a que el oxígeno inhibe la fermentación anaerobia, por ende la concentración de microorganismos es alta.

3.3.1.1.3.2 Medias marginales para la [m.o]

CUADRO N°27. MEDIAS MARGINALES DE LA [m.o]



En el cuadro N° 27 se puede apreciar como la concentración media de microorganismos se ve alterada a medida que es influenciada por uno de los factores. En la gráfica se observa claramente que el factor que más afecta a la concentración microbiana es el tiempo de fermentación, obteniendo una baja concentración de microorganismos al fermentar la bebida por 15 días. También se puede apreciar que la concentración de sacarosa, la concentración de inóculo y el T.F presentan un efecto negativo sobre la concentración de microorganismos, es decir a mayor concentración de estos factores menor será la concentración de microorganismos.

Además se puede apreciar en la gráfica que la concentración de té y el tiempo de fermentación poseen un efecto positivo sobre la concentración microbiana, debido a que se ve inhibida la fermentación anaerobia.

3.3.1.1.3.3 ANOVA

En este estudio se realizó el ANOVA con un nivel de significancia del 0,05 % para evaluar la variabilidad que existe entre los valores observados de la concentración microbiana y entre las matrices generadas.

CUADRO N°28. ANOVA

Source	SS	DF	MS	F-ratio	I-hat	P-value	% contrib
ANOVA tables for Cantidad de m.o (Response Averages) - Alpha level = 0,1							
One-Way ANOVA							
Source	SS	DF	MS	F-ratio	I-hat	P-value	% contrib
Between	3,068E+07	7	4383000	37,32 *		<0,001	
Within (error)	1879000	16	117500				
TOTAL	3,256E+07	23					
Single degree of freedom ANOVA							
Source	SS	DF	MS	F-ratio	I-hat	P-value	% contrib
A Sa (0,25 v 0,5),Té x t,O2 x	3238000	1	3238000	27,57 *	-734,6	<0,001	9,9
B Té (625 v 2500),Sa x t,t x C	1969000	1	1969000	16,77 *	572,9	<0,001	6,0
C t (7 v 15),Sa x Té,Té x O2	2,308E+07	1	2,308E+07	196,5 *	-1961	<0,001	70,9
D O2 (30 v 60),Sa x [Inó.],Té	121100	1	121100	1,031	142,1	0,325	0,4
E [Inó.] (12500 v 25000),Sa x	257300	1	257300	2,191	-207,1	0,158	0,8
F Té x O2,t x [Inó.],Sa x Té x	1276	1	1276	0,01086	-14,58	0,918	0,0
G Té x [Inó.],t x O2,Sa x Té x	2016000	1	2016000	17,16 *	579,6	<0,001	6,2
Within (error)	1879000	16	117500				
TOTAL	3,256E+07	23					

En el cuadro N° 28 se observa que el factor que mayor influencia tiene sobre la concentración microbiana es el tiempo de fermentación (matriz C) con un 70,9% y una SS de 1969000. Además se evaluó la variabilidad entre los datos experimentales de la cantidad de microorganismos obteniendo una SS entre datos de 3,0686E07 con una MS de 4383000 y con un valor observado < 0,001 en ambos casos.

3.3.1.1.3.4 Optimización de la [m.o]

3.3.1.1.3.4.1 Generación de matrices

Para optimizarla carga microbiana de la BK, en el diseño de PB se generaron matrices ortogonales según el diseño de Veiwer para 8 corridas, las mismas que son valoradas con la ayuda del software DOEpack 2000, con un nivel de significancia del 0,05%.

CUADRO N° 29. EVALUACIÓN DE MATRICES

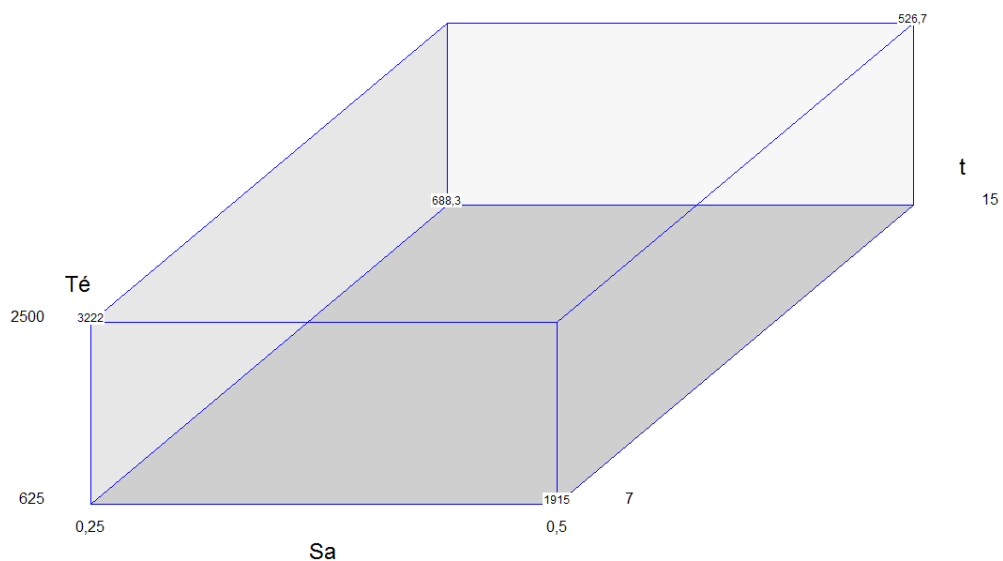
Design Viewer - 8-run Reflected Plackett-Burman												
File												
Run	Treatments					Contrasts						
	Sa	Té	t	O2	[Inó.]	A	B	C	D	E	F	G
1	0,5	2500	15	60	25000	1	1	1	1	1	1	1
2	0,5	2500	15	30	12500	1	1	1	-1	-1	-1	-1
3	0,5	625	7	30	12500	1	-1	-1	-1	-1	1	1
4	0,5	625	7	60	25000	1	-1	-1	1	1	-1	-1
5	0,25	625	15	60	12500	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	0,25	625	15	30	25000	-1	-1	1	-1	1	1	-1
7	0,25	2500	7	30	25000	-1	1	-1	-1	1	-1	1
8	0,25	2500	7	60	12500	-1	1	-1	1	-1	1	-1
Alias:						BC	AC	AB	AE	AD	BD	BE
						DE	CDE	BDE	BCE	BCD	CE	CD
											ABE	ABD
											ACD	ACE

En el cuadro N° 29 se puede apreciar las matrices generadas en este estudio para optimizar la concentración de microorganismos teniendo en cuenta que el tiempo de fermentación es el factor que mayormente influye sobre la concentración de microorganismos y al mismo tiempo se evaluó la interacción que el T.F (matriz C) presenta con la sacarosa (matriz A) y la cantidad de té (matriz B).

3.3.1.1.3.4.2 Evaluación de matrices: Superficies-respuesta

CUADRO N°30. [m.o] vs T.F y [Té]

Response Plot for [m.o] (Avg)



Como se observa en cuadro N°30, al aplicar la metodología superficies respuesta se logró optimizar la concentración microbiana con un valor óptimo de 526,7 UFC/mL. Esta concentración microbiana se consigue al evaluar en conjunto la concentración de sacarosa, té y el tiempo de fermentación. Para obtener una concentración microbiana óptima se requiere una concentración de 2500 ppm de té negro y una concentración 0,5 M de sacarosa dejando fermentarla bebida por 15 días.

3.3.1.1.4 ANOM y ANOVA para la densidad

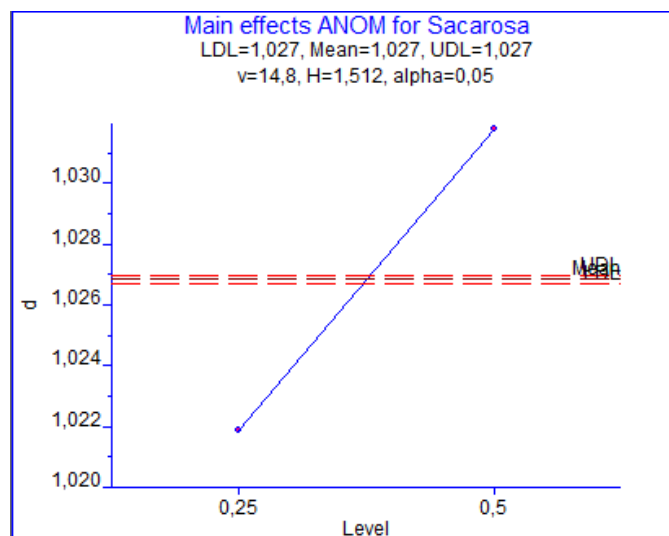
Se realizó el análisis de medias (ANOM) con la finalidad de identificar los factores que afectan positiva o negativamente a la densidad; mientras que ANOVA nos permitió valorar la variabilidad que existe tanto entre datos experimentales de cada variable como entre las matrices generadas en el estudio de optimización.

3.3.1.1.4.1 ANOM de la densidad frente a varios factores

Para conocer los efectos principales que provocan los diferentes factores planteados sobre las medias de la densidad se utilizó el ANOM con una significancia del 0,05 %.

Influencia de la [Sacarosa] sobre la densidad

CUADRO N° 31. DENSIDAD vs [Sa.]

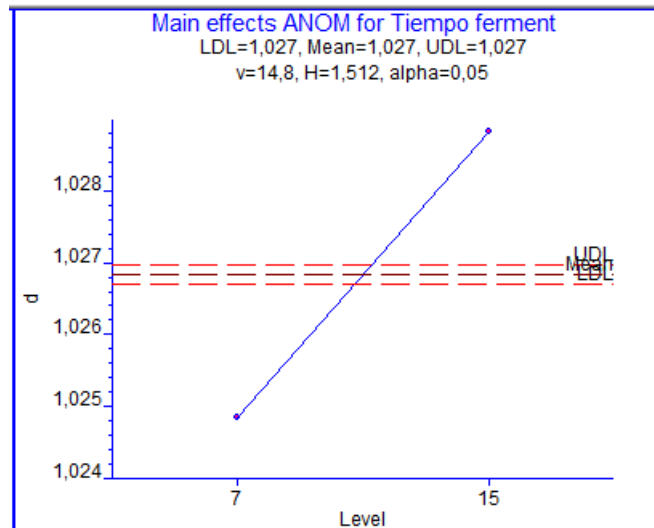


En el cuadro Nº 31 se puede apreciar que la sacarosa influye positivamente sobre la densidad; es decir, mientras mayor sea la cantidad de sacarosa en la BK más densa será dicha bebida. La bebida adquiere la densidad en función a la cantidad de azúcar que existe en la disolución.

Además la sacarosa es hidrolizada por la simbiosis de Kombucha originando glucosa y fructosa, donde la fructosa es mucho más dulce que glucosa. Estos azúcares son los responsables de la densidad, o sea mientras mayor cantidad de azúcar exista en la disolución más densa es la bebida.

Efectos principales del T.F sobre la densidad

CUADRO N°32. DENSIDAD vs TIEMPO DE FERMENTACIÓN



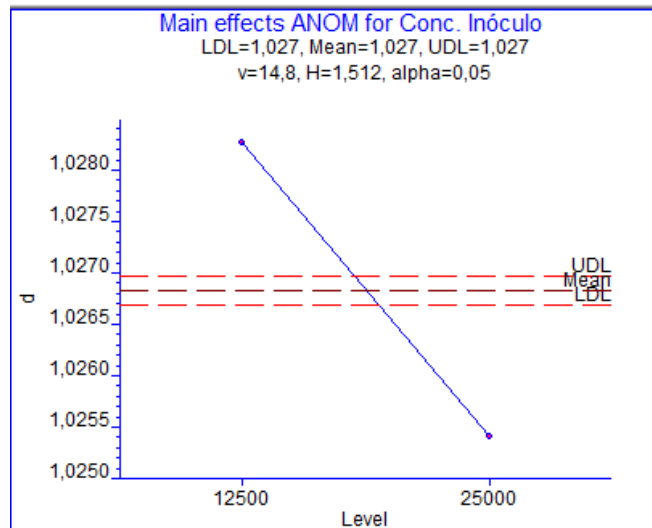
En el cuadro Nº 32 se puede apreciar que el T.F influye positivamente sobre la densidad; es decir a mayor tiempo de fermentación mayor es la densidad y viceversa. La densidad de la BK se debe a la cantidad de azúcar que existe en disolución, es así que mientras mayor sea el tiempo fermentativo mayor cantidad de sacarosa será degradada por la simbiosis de Kombucha originando como productos glucosa y fructosa, que al existir en altas concentraciones elevan la densidad.

A los 7 días de fermentación notamos que la sacarosa no ha sido degradada totalmente, por lo tanto la densidad es baja ya que al dejar que la fermentación transcurra durante

15 días se nota que existe mayor cantidad de sacarosa degradada por ende la densidad de la bebida aumenta.

Influencia de la [Inó.] sobre la densidad

CUADRO N°33. DENSIDAD vs CONCENTRACIÓN DE INÓCULO



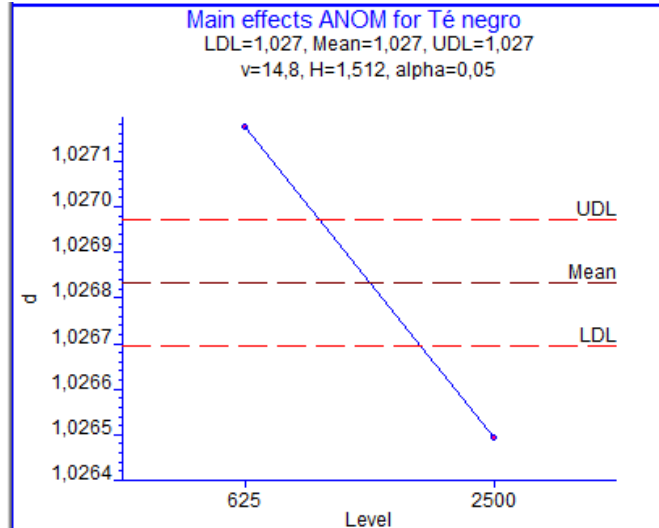
En el cuadro N° 33 se observa que la concentración de inóculo influye negativamente sobre la densidad, es decir, a mayor concentración de inóculo menor es la densidad. Este decrecimiento de la densidad se debe a que los m.o han transformado la mayor cantidad de azúcar en sus metabolitos secundarios correspondientes, existiendo una baja concentración de azúcar. Además los m.o utilizan el azúcar para obtener energía química ATP para llevar a cabo su ciclo metabólico.

Una vez que la sacarosa ha sido transformada a glucosa y fructosa, estos azúcares a medida que avanza la fermentación son consumidos tanto por las levaduras como por las bacterias generando los metabolitos propios de la fermentación del Kombucha.

Por ejemplo la glucosa es transformada por las levaduras en etanol y CO₂ y a su vez el etanol es oxidado por las bacterias acéticas a ácido acético. Por lo tanto en la BK existe una baja concentración de azúcares en disolución, razón por la cual la densidad decrece.

Efecto principal de la [Té] sobre la densidad

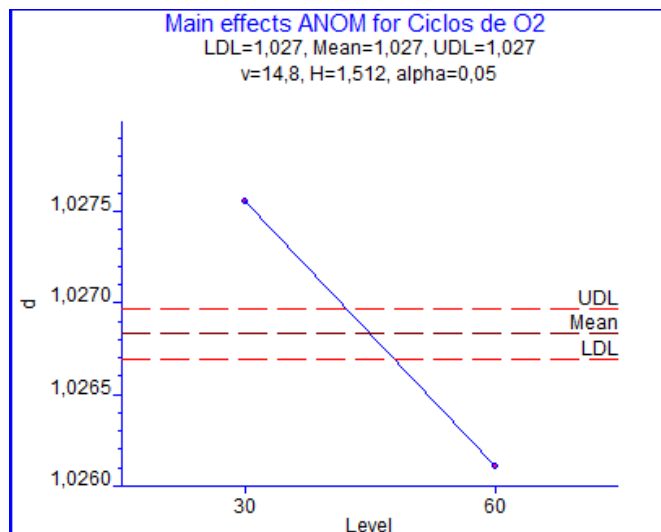
CUADRO N° 34. DENSIDAD vs [Té]



En el cuadro N° 34 se observa que la [Té] influye negativamente en la densidad, es decir, mientras mayor cantidad de té negro exista en la disolución menor es la densidad de la BK. Esto se debe a que el té posee gran cantidad de fenolasas, responsable de la oxidación de algunos polifenoles, razón por la cual aumenta la degradación de los azúcares y por ende la densidad decrece.

Efecto principal de los ciclos de oxigenación sobre la densidad

CUADRO N°35. DENSIDAD vs CICLOS DE OXIGENACIÓN



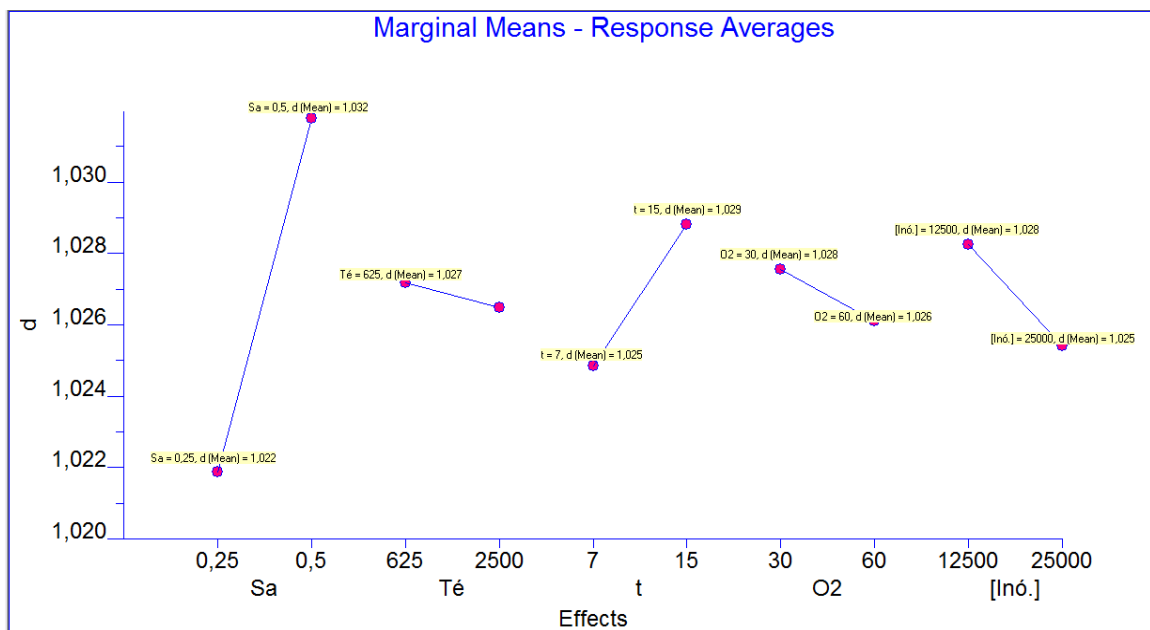
Como se puede observar en el cuadro №. 35, los ciclos de oxigenación afectan negativamente a la densidad; es decir, mientras mayor sea el tiempo de oxigenación menor es la densidad de la bebida.

El oxígeno inhibe la fermentación anaerobia, razón por la cual la sacarosa no se degrada completamente ya que solo se está produciendo la fermentación aeróbica provocando un decrecimiento en la densidad.

3.3.1.1.4.2 Medias marginales.

Las medias marginales nos muestran en conjunto como cada uno de los factores influyen sobre la densidad.

CUADRO N° 36. MEDIAS MARGINALES PARA LA DENSIDAD



En el cuadro №. 36 se puede observar como los factores influyen en una respuesta, en este caso sobre la densidad. Cada factor se evalúa por niveles obteniendo medias de densidad diferentes en cada nivel de los factores planteados, además se nota que el factor que mayormente influye en la densidad es la sacarosa con una concentración de 0,5 M.

También se observa que la sacarosa y el tiempo de fermentación poseen un efecto positivo sobre la densidad, mientras que la concentración de té, la concentración de microorganismos y el tiempo de fermentación posee un efecto negativo sobre la densidad. Al existir una mayor concentración de té, de microorganismos y al ser un tiempo mayor de fermentación va a existir una baja concentración de azúcares por tal razón la densidad es baja.

3.3.1.1.4.3 ANOVA

CUADRO N° 37. ANOVA

Source	SS	DF	MS	F-ratio	I-hat	P-value	% contrib
ANOVA tables for Densidad (Response Averages) - Alpha level = 0,05							
One-Way ANOVA							
Source	SS	DF	MS	F-ratio	I-hat	P-value	% contrib
Between	0,0009176	7	0,0001311	484 *		<0,001	
Within (error)		0	16	0			
TOTAL	0,0009219	23					
Single degree of freedom ANOVA							
Source	SS	DF	MS	F-ratio	I-hat	P-value	% contrib
A Sa (0,25 v 0,5),Té x t,O2 x	0,0005881	1	0,0005881	2171 *	0,0099	<0,001	63,8
B Té (625 v 2500),Sa x t,t x C	0	1	0	10,34 *	-0,0006833	0,005	0,0
C t (7 v 15),Sa x Té,Té x O2	0,0000952	1	0,0000952	351,5 *	0,003983	<0,001	10,3
D O2 (30 v 60),Sa x [Inó.],Té	1,262E-05	1	1,262E-05	46,58 *	-0,00145	<0,001	1,4
E [Inó.] (12500 v 25000),Sa x	4,874E-05	1	4,874E-05	180 *	-0,00285	<0,001	5,3
F Té x O2,t x [Inó.],Sa x Té x	0,0001561	1	0,0001561	576,2 *	-0,0051	<0,001	16,9
G Té x [Inó.],t x O2,Sa x Té x	1,411E-05	1	1,411E-05	52,09 *	-0,001533	<0,001	1,5
Within (error)		0	16	0			
TOTAL	0,0009219	23					

En el cuadro N° 37 se observa la variabilidad que existe entre los valores experimentales de la densidad como también se evaluó la variabilidad que se presenta entre las matrices generadas en el estudio. Entre los valores experimentales de la densidad se obtiene una SS de 0,0009176, con una desviación (MS) entre medias de 0,0001311 y con un valor observado < 0,001.

La matriz que mayor variabilidad produce sobre la densidad es la sacarosa (matriz A) con 63,8%, cuya SS y MS es de 0,0005881 con un valor observado < 0,001

3.3.1.1.4.4 Optimización de la densidad

Para la optimización de la densidad se aplicó la metodología superficies respuesta que se basa en el uso de matrices ortogonales.

3.3.1.1.4.4.1 Generación de matrices

Mediante el uso del programa DOEpack 2000 y haciendo uso de los diseños de PB que se encuentran comprendidos en dicho programa se logró obtener siete matrices mediante el diseño de Veiwer- 8 corridas reflejadas en PB, las mismas que nos permiten encontrar el valor óptimo dentro de los ocho ensayos propuestos.

CUADRO N°38. GENERACIÓN DE MATRICES

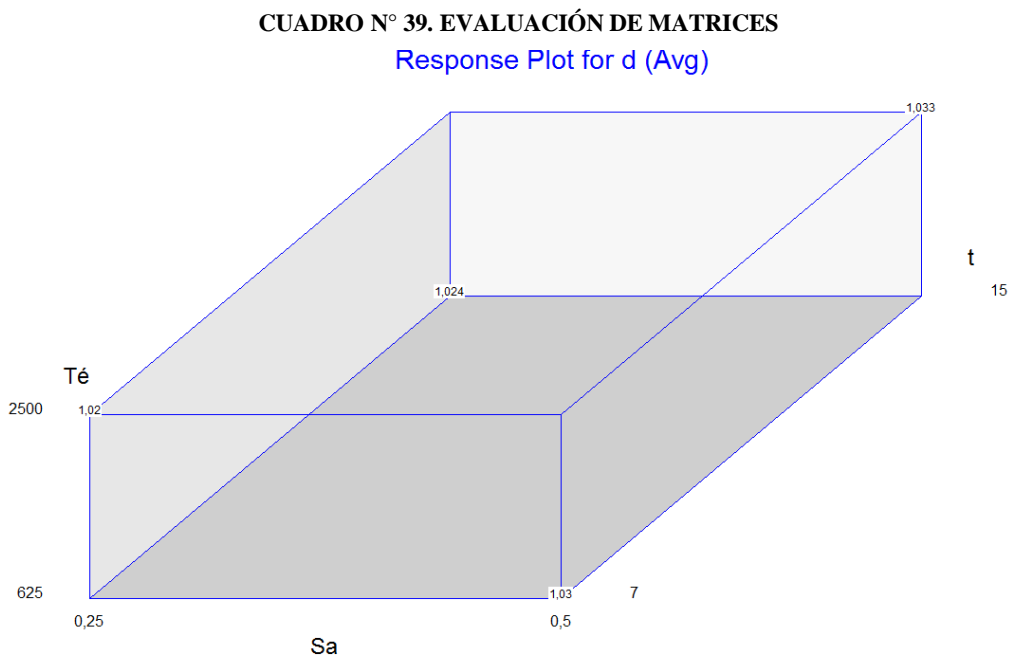
Design Viewer - 8-run Reflected Plackett-Burman												
File												
Run	Treatments					Contrasts						
	Sa	Té	t	O2	[Inó.]	A	B	C	D	E	F	G
1	0,5	2500	15	60	25000	1	1	1	1	1	1	1
2	0,5	2500	15	30	12500	1	1	1	-1	-1	-1	-1
3	0,5	625	7	30	12500	1	-1	-1	-1	-1	1	1
4	0,5	625	7	60	25000	1	-1	-1	1	1	-1	-1
5	0,25	625	15	60	12500	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	0,25	625	15	30	25000	-1	-1	1	-1	1	1	-1
7	0,25	2500	7	30	25000	-1	1	-1	-1	1	-1	1
8	0,25	2500	7	60	12500	-1	1	-1	1	-1	1	-1
					Alias:	BC	AC	AB	AE	AD	BD	BE
						DE	CDE	BDE	BCE	BCD	CE	CD
											ABE	ABD
											ACD	ACE

Conociendo que la concentración de sacarosa (matriz A) es el factor que mayor variabilidad presenta en la densidad, en el cuadro N° 36 se puede apreciar que dicha matriz presenta una interacción principal con las matrices B ([té] y C (T.F), además cada una de las matrices en los distintos ensayos se encuentran representadas como 1 o -1. También se observan que las interacciones de cada matriz se encuentran distribuidas en función a la importancia.

Para optimizar la densidad a más de la concentración de la sacarosa se debe tomar en cuenta tanto el T.F como la concentración de té ya que de estos factores se depende para obtener un valor óptimo de la densidad.

3.3.1.1.4.4.2 Evaluación de las matrices: Superficies respuesta

Al aplicar la metodología superficies respuesta se obtiene matrices ortogonales que son muy útiles para optimizar la densidad.



En el cuadro N° 39 se evaluaron conjuntamente las matrices A, B y C obteniendo un valor óptimo para la densidad de 1,033. Este valor se obtiene al elaborar una BK con 2500ppm de té, 0,5M de sacarosa dejando fermentar por 15 días.

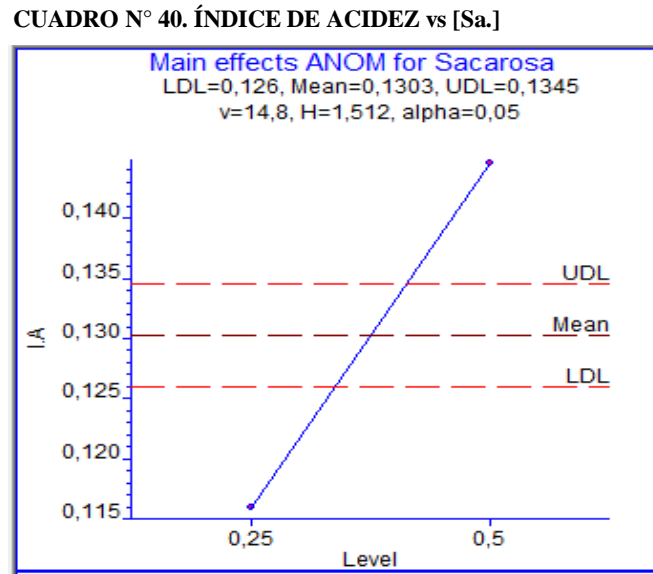
3.3.1.1.5 ANOM y ANOVA para evaluar el I_A

Ambos parámetros se realizó con un nivel de significancia del 0,05%.

3.3.1.1.5.1 ANOM para el I_A

Se realizó el ANOM para observar como los factores planteados el en cuadro N° 1 influyen sobre el I_A.

Efectos de la concentración de Sacarosa sobre el índice de acidez

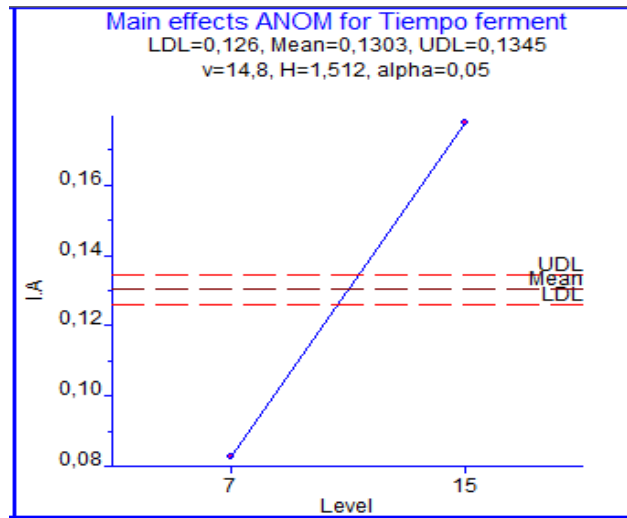


En el cuadro N°. 40 se puede observar que la concentración de sacarosa tiene un efecto positivo sobre el índice de acidez; es decir mientras mayor cantidad de sustrato exista mayor será la producción de ácidos orgánicos, por ende el índice de acidez incrementa.

Si existe una alta concentración de sacarosa los microorganismos presentes en la Kombucha se encargan de hidrolizarla generando glucosa y fructosa, a la vez estos azúcares resultantes son utilizados por las bacterias y levaduras generando otros subproductos. En el caso de las levaduras estas utilizan la glucosa para producir etanol y CO₂, que a vez el etanol es oxidado a ácido acético por las bacterias acéticas (*Acetobacter*) mientras que las bacterias ácido lácticas actúan sobre el etanol y el ácido acético produciendo ácido láctico, además las bacterias acéticas convierten la glucosa en ácido glucorónico y la fructosa en ácido acético. Por estas razones la bebida posee un elevado índice de acidez.

Influencia del T.F sobre el índice de acidez

CUADRO N° 41. ÍNDICE DE ACIDEZ vs TIEMPO DE FERMENTACIÓN

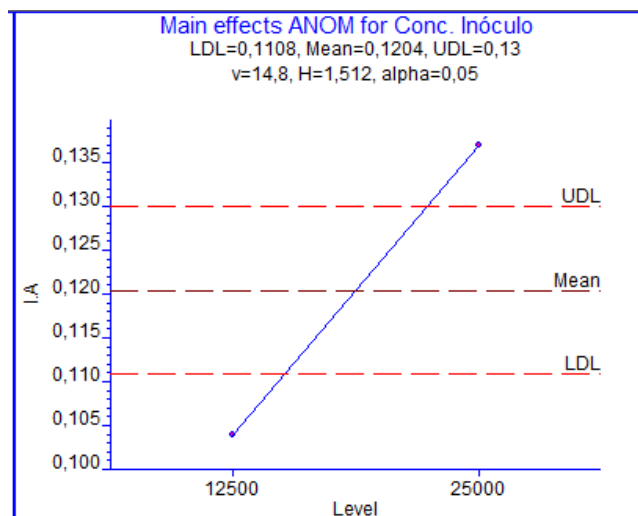


La Kombucha es una simbiosis de bacterias y levaduras capaces de transformar el azúcar a compuestos orgánicos de bajo peso molecular, es así que a medida que la fermentación avanza el I_A se eleva, existiendo una relación directamente proporcional.

Como se puede apreciar en el cuadro N° 41, el T.F influye positivamente sobre el I_A , es decir, a mayor T.F mayor es el I_A , esto nos indica que a mayor tiempo fermentación mayor es la cantidad de ácidos orgánicos producidos, razón por la cual el I_A se eleva.

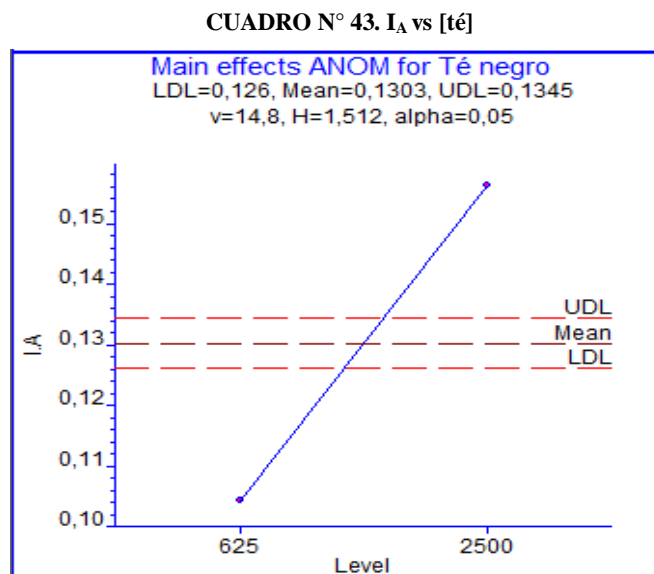
Influencia de la [Inó.] sobre el I_A

CUADRO N° 42. I_A vs [Inó.]



En el cuadro N° 42 se observa que la concentración de inóculo posee un efecto positivo sobre el índice de acidez, es decir, a mayor [Inó.] mayor es el I_A . Mientras mayor carga microbiana existente más efectivo será el proceso fermentativo, obteniéndose como productos ácidos orgánicos de bajo peso molecular. Dentro de los principales ácidos generados tenemos: ácido acético, láctico, glucorónico, H_2CO_3 , etc., los mismos que son responsables del sabor y aroma característica de la BK.

Efectos principales de la [té] sobre el I_A

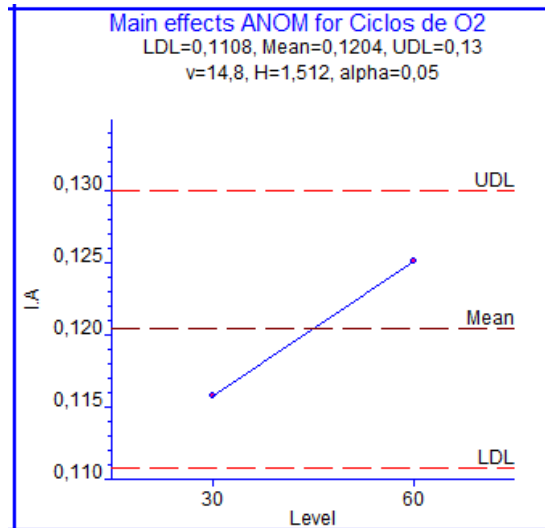


Al observar el cuadro N° 43, se nota que la concentración de té negro influye positivamente en el I_A , ya que a mayor [té] mayor es índice de acidez. Al existir una mayor [té] en la disolución mayor será el desdoblamiento de la glucosa porque el té negro posee una elevada cantidad de enzimas fenolasas responsables de la oxidación de polifenoles, lo cual permite que la glucosa sea fácilmente degradada.

El té negro aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos, mientras que el azúcar por medio de la fermentación es transformada a compuestos orgánicos de bajo peso molecular, entre ellos los ácidos: acético, láctico, glucorónico, etc., que son los responsables de la acidez de la BK. Al existir una alta concentración de ácidos el I_A se eleva.

Efectos principales los ciclos de O₂ sobre el I_A

CUADRO N° 44. I_A vs TIEMPO DE OXIGENACIÓN

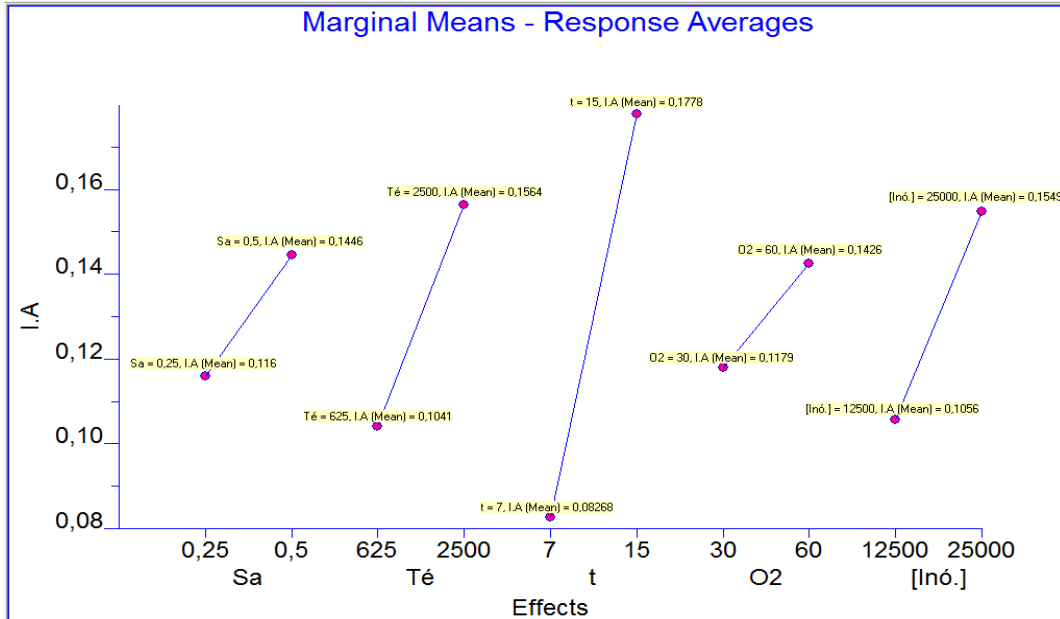


Se nota claramente en el cuadro N° 44 que la oxigenación influye positivamente sobre el I_A, esto quiere decir que mientras mayor sea el tiempo de oxigenación mayor será el I_A y viceversa. El oxígeno inhibe la fermentación anaerobia, pero no así la fermentación aeróbica, tal es el caso de las bacterias acéticas que utilizan el oxígeno para oxidar el etanol a ácido acético. Además en la fermentación aerobia se producen ácidos orgánicos de baja cadena carbonada razón por la cual el índice de acidez es alto.

3.3.1.1.5.2 Medias marginales

Esta prueba se realizó para ver como las medias del I_A varían frente a varios factores.

CUADRO N° 45. MEDIAS MARGINALES PARA EL I_A



En el cuadro N° 45 se observa como las medias del I_A van variando en cada uno de los factores planteados a medida que se produce la fermentación. Además se puede apreciar que la concentración de sacarosa, té, inóculo, tiempo de oxigenación y el tiempo de fermentación presentan un valor positivo, es decir, mientras mayor sea la cantidad de dichos factores mayor será el índice de acidez debido a la presencia de ácidos generados en la fermentación del Kombucha.

3.3.1.1.5.3 Análisis estadístico ANOVA para el I_A

Se realizó el ANOVA para analizar la variabilidad que existe tanto entre datos experimentales del I_A como entre las matrices generadas en el estudio.

CUADRO N° 46. ANOVA

Source	SS	DF	MS	F-ratio	I-hat	P-value	% contrib
ANOVA tables for Acidez tituable (Response Averages) - Alpha level = 0,05							
One-Way ANOVA							
Source	SS	DF	MS	F-ratio	I-hat	P-value	% contrib
Between	0,1041	7	0,01487	161,7 *		<0,001	
Within (error)	0,001471	16	9,194E-05				
TOTAL	0,1055	23					
Single degree of freedom ANOVA							
Source	SS	DF	MS	F-ratio	I-hat	P-value	% contrib
A Sa (0,25 v 0,5), Té x t, O2 x	0,004911	1	0,004911	53,41 *	0,02861	<0,001	4,7
B Té (625 v 2500), Sa x t, t x C	0,01636	1	0,01636	178 *	0,05222	<0,001	15,5
C t (7 v 15), Sa x Té, Té x O2	0,05433	1	0,05433	591 *	0,09516	<0,001	51,5
D O2 (30 v 60), Sa x [Inó.], Té	0,003663	1	0,003663	39,84 *	0,02471	<0,001	3,5
E [Inó.] (12500 v 25000), Sa x	0,01453	1	0,01453	158 *	0,04921	<0,001	13,8
F Té x O2, t x [Inó.], Sa x Té x	0,01025	1	0,01025	111,5 *	0,04132	<0,001	9,7
G Té x [Inó.], t x O2, Sa x Té x	2,583E-05	1	2,583E-05	0,281	-0,002075	0,603	0,0
Within (error)	0,001471	16	9,194E-05				
TOTAL	0,1055	23					

Como se puede observar en el cuadro N° 46, al aplicar ANOVA a las tablas del I_A se obtuvo una SS de 0,05562, con una SM de 0,007946 y un valor observado de 0,003 con una MS = 0,007946 y con un valor observado de 0,003

La matriz que mayormente influye sobre el I_A fue la tiempo de fermentación (matriz C), contribuyendo al cambio con el 42,8%, cuya SS es de 0,03419, con una MS de 0,03419 en una proporción (F-ratio) de 22,52 y con un valor observado menor a 0,001.

3.3.1.1.5.4 Optimización del Índice de acidez.

Para realizar la optimización del I_A se plantearon siete matrices, las mismas que fueron evaluadas mediante la metodología superficies respuesta.

3.3.1.1.5.4.1 Generación de matrices para optimizar el I_A

Mediante el diseño de Veiwer para 8 ensayos reflejados en el diseño de PB se logró obtener siete matrices las mismas que se evaluaron mediante la metodología superficies repuesta para obtener un I_A óptimo.

CUADRO N°47. GENERACIÓN DE MATRICES

Design Viewer - 8-run Reflected Plackett-Burman												
File												
Run	Treatments					Contrasts						
	Sa	Té	t	O2	[Inó.]	A	B	C	D	E	F	G
1	0,5	2500	15	60	25000	1	1	1	1	1	1	1
2	0,5	2500	15	30	12500	1	1	1	-1	-1	-1	-1
3	0,5	625	7	30	12500	1	-1	-1	-1	-1	1	1
4	0,5	625	7	60	25000	1	-1	-1	1	1	-1	-1
5	0,25	625	15	60	12500	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	0,25	625	15	30	25000	-1	-1	1	-1	1	1	-1
7	0,25	2500	7	30	25000	-1	1	-1	-1	1	-1	1
8	0,25	2500	7	60	12500	-1	1	-1	1	-1	1	-1
					Alias:	BC	AC	AB	AE	AD	BD	BE
						DE	CDE	BDE	BCE	BCD	CE	CD
											ABE	ABD
											ACD	ACE

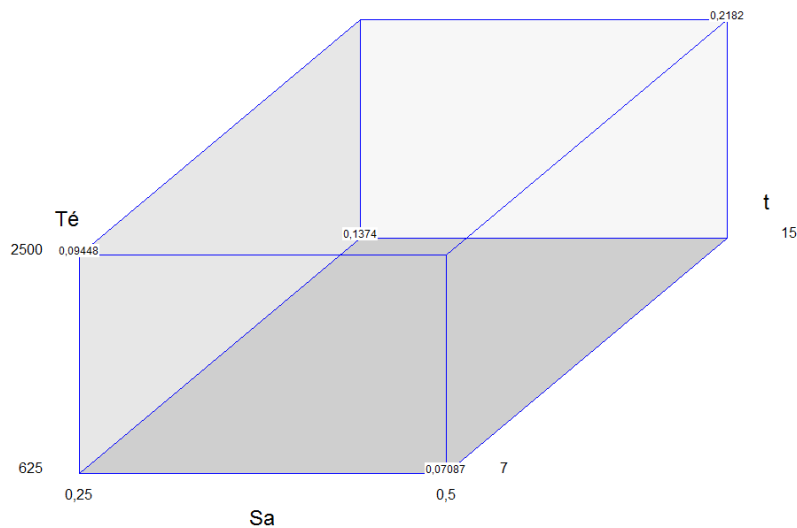
Al ser la sacarosa el factor que mayormente influye en el I_A, el cuadro N° 47 se puede apreciar que este factor presentó interacción con la concentración de té (matriz B) y el tiempo de fermentación (matriz C).

3.3.1.1.5.4.2 Evaluación de matrices (superficies respuesta)

Haciendo uso de las matrices que influyeron en el I_A se procedió a optimizar el I_A.

CUADRO N° 48. DENSIDAD vs TF Y [Sa]

Response Plot for I_A (Avg)



En el cuadro N° 48 se observa claramente que el I_A optimizado fue 0.22%, el mismo que se consigue al evaluar la interacción que presenta la matriz C (T.F) con las matrices AB ([Sa.] y [té]), el mismo que se obtiene al preparar una B.K con una concentración de 2500 ppm de té negro a una concentración 0,5 M de sacarosa y con un tiempo de fermentación de 15 días.

3.3.1.1.6 Determinación de vitamina C

La lectura del estándar de vitamina C fue de 2.933, por lo tanto todas las muestras que contengan Vitamina C deberán estar dentro en este pico.


Al realizar la lectura de cada uno de los 8 ensayos formulados se determinó que en ninguna muestra existió vitamina C ya que la vitamina C es fácilmente degradable por la presencia de oxígeno. **VER ANEXO 13**

3.2 EVALUACIÓN DE LA BEBIDA OPTIMIZADA.





3.2.1 Tamizaje fitoquímico

Se realizó el tamizaje fitoquímico con el objetivo de conocer los grupos fitoquímicos presentes en la bebida fermentada. Esta es una prueba cualitativa de mucha utilidad.

CUADRO N° 49. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Prueba	Resultados	Discusión
Identificación de azúcares reductores	Aparentemente negativo ya que no aparece el color rojo característico. 	Se encuentran presentes en mínimas cantidades ya que no se observó la presencia del precipitado azul, pero si existe un cambio de color de la muestra que cambia de amarillo traslucido a amarillo fuerte y con micelas de color amarillo. Se encuentran en mínimas cantidades ya que los m.o presentes en la Kombucha a medida que avanza la fermentación han degradado la mayor cantidad de azúcar generando compuestos orgánicos de baja cadena carbonada como por ejemplo ácido láctico, acético, glucorónico, etc. Por esta razón la cantidad de azúcares reductores es baja.

CONTINUACIÓN.....

Saponinas	Positivo	Se determina la prueba como positiva por la formación de espuma, ya que las saponinas son componentes propios del té negro.
		
Cloruro Férrico	Positivo	Pasa de color amarillo tenue a verde oscuro por lo tanto existe flavonoides. Los flavonoides son antioxidantes importantes que inhiben parcialmente el estrés oxidativo de las células.
		
Shinoda	Positivo	Presencia de flavonoides de tipo catequínicos.
		
Ninhidrina	Negativo	Cualitativamente se determinó que no existen aminoácidos o se encuentran en mínima cantidad, para lo cual sería necesario realizar su cuantificación mediante HPLC.
		

3.2.2 Análisis organoléptico

Es un análisis de suma importancia y de mucha utilidad ya que determina la calidad de BK. Este análisis se realizó mediante evaluación sensorial de los parámetros descritos en el cuadro № 50.

CUADRO N° 50. ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO




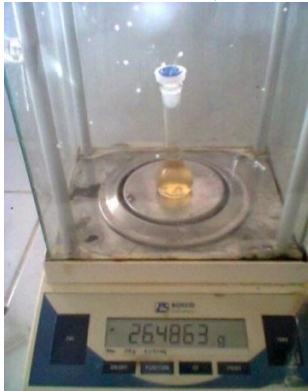
Parámetros	Resultados	Discusiones
Sabor	Dulce ligeramente avinagrada	Es el sabor característico de la BK debido a la presencia de ácidos orgánicos de cadena carbonada corta como ácido acético, láctico, glucorónico, carbónico, etc. Además el ácido carbónico es el responsable del burbujeo de la bebida.
Olor	Ligeramente ácido	Por la presencia de ácidos orgánicos como también por la cantidad de azúcares que existen en disolución ya que a medida que transcurre el tiempo de fermentación va acentuando su olor ácido.
Color	Amarillo traslúcido, con presencia de espuma debido a que en la B:K existe CO ₂	Amarillo traslúcido que se va opacando a medida que la fermentación avanza, ya que existe mayor concentración de ácidos, por lo tanto el I _A se eleva produciendo una BK de color amarillo opaco. También existe presencia de CO ₂ que se encuentra en forma ácido carbónico, el mismo que es responsable del sabor característico de la BK
Aspecto	Líquido pegajoso con presencia	Es pegajoso por la presencia de azúcares, además el CO ₂ le proporciona el sabor característico de la BK.



3.2.3 Análisis fisicoquímico

Se evaluaron los parámetros planteados en el cuadro № 50 con finalidad de determinar la calidad del producto.

CUADRO N° 51. ANÁLISIS FISICOQUÍMICO

Parámetro	Resultado	Discusión
pH	$3.5 \pm 0,1$ 	El pH óptimo obtenido mediante la metodología superficies respuesta fue 3.06 La BK preparada con la formulación optimizada presentó un pH de 3.5 muy cercano al pH óptimo. La BK partió con un pH inicial de 3.75 que luego de a ver transcurrido los 15 días de fermentación presentó un pH de 3.5, el mismo que indica que existe mayor cantidad de ácidos razón por la cual el valor del pH se reduce.
I _A	$0.39\% \pm 0.01$ 	El I_A óptimo que se obtuvo fue 0.22% La acidez se reporta en ácido glucorónico, ya que es el principal componente terapéutico de la BK. La BK partió con un índice de acidez de 0.1067 obtenido luego de la fermentación un I _A de 0.39%; lo cual indica que una cantidad considerable de azúcar ha sido degradada por los microorganismos presentes en la BK.
° Brix	8.2 	El valor óptimo encontrado aplicando la metodología superficies respuesta fue de ° Brix= 7.7 Los grados Brix obtenidos en la BK elaborada con la formulación optimizada fueron de 8.2, lo que quiere decir que 8.2 g de azúcar existe en 100 mL de disolución. La BK inicialmente posee 8 °Brix que transcurrido los 15 días del proceso fermentativo presentó 8.2 °Brix. Esta proporción nos indica que existe una cantidad considerable de azúcar sin degradarse y si la fermentación continúa esta cantidad de azúcar será baja.
Densidad	$\bar{X} = 1.1780 \pm 0,07$ 	Valor óptimo= 1.033 El producto optimizado presentó una densidad de 1.1780 debido a que existe una cantidad considerable de azúcar en disolución.

3.2.4 Análisis Complementario

CUADRO N° 52. PRUEBAS CUANTITATIVAS




Prueba	Resultado	Discusión
Azúcares totales	7,2	Es la cantidad de carbohidratos presentes en la bebida.
Azúcares reductores	1,5	Nos indican la presencia de azúcares monosacáridos como la glucosa, fructosa, etc. Es de suma importancia en alimentos ya que estos azúcares junto con las proteínas producen la reacción de Maillard. Los productos mayoritarios de esta reacción son los responsables del sabor y del aroma de los alimentos.
Azúcares no reductores	5,7	Se obtiene de la diferencia entre azúcares totales y azúcares reductores
Determinación de Vitamina C	No existe vitamina C en la muestra.	No existe Vitamina C en la bebida debido a que es fácilmente degradable por el oxígeno.

3.2.5 Análisis Microbiológico

El recuento en placa es el método más utilizado para la determinación del número de células viables o UFC en un alimento. El análisis microbiológico se realizó con el objetivo de valorar la calidad sanitaria que la BK presenta.

Es importante tener en cuenta que en productos fermentados para valorar la calidad sanitaria no sirven los aerobios mesófilos por tal razón se debe tomar en cuenta las levaduras.

CUADRO N° 53. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

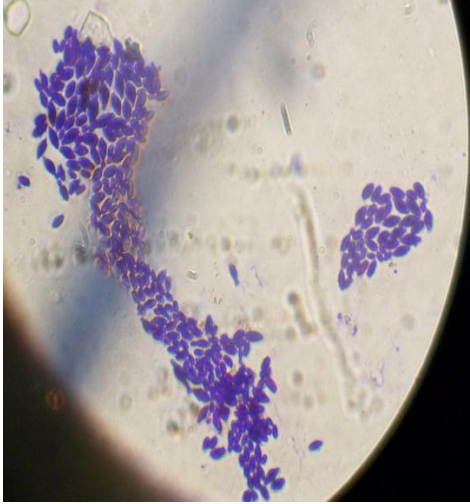
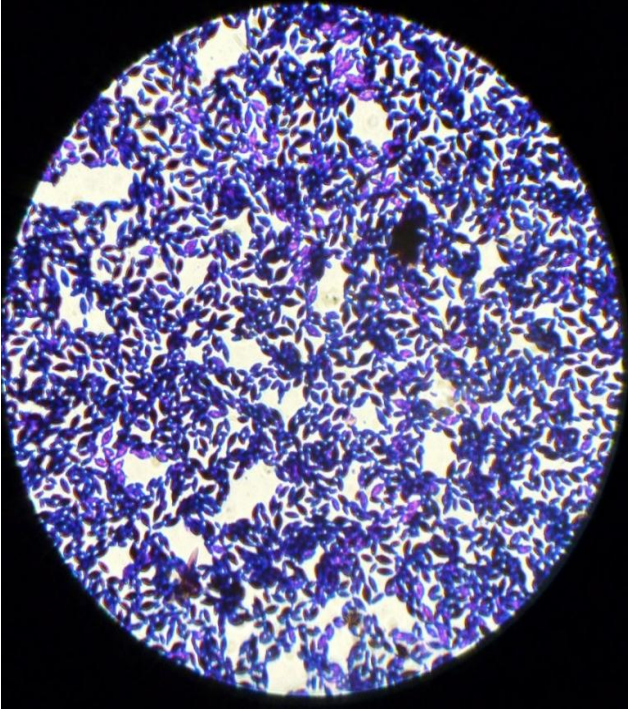
RECuento	RESULTADO	DISCUSIÓN
Aerobios mesófilos	960 UFC/mL Colonias blancas cremosas, redondeadas	Para el recuento de estos microorganismos se utilizó PCA; en dicho recuento se estima la microflora total sin especificar el tipo de microorganismos.
		
Coliformes	Ausencia de Coliformes	MacConkey es un medio selectivo para <i>E.coli</i> , principal microorganismo presente en los alimentos producto de contaminación de los mismos. Al realizar el análisis se determinó que no existe crecimiento alguno de dicho patógeno en el producto elaborado, por lo tanto el producto elaborado es de buena calidad.
		
Mohos y levaduras	700UFC/mL	Se notó el crecimiento de levaduras, las colonias son blancas cremosas irregulares, de aspecto rugoso. Como grupo indicador son útiles para evidenciar el grado general de contaminación cuando los mesófilos aerobios no son útiles, como en alimentos fermentados.
		

3.2.6 Identificación de los microorganismos presentes en la BK

TINCIÓN GRAM

Esta prueba se realizó con el objetivo de determinar qué tipo de microorganismos se encuentran presentes en la BK. Para ello se realizó una tinción Gram de las colonias que crecieron en PCA y también se realizó una tinción Gram en fresco de la BK; las mismas que al observar al microscopio se determinó que en su mayoría son levaduras. Dichas levaduras se observaron campo lleno con el lente de 100x, estas se tiñen de color violeta, son convexas con los bordes bien definidos (lisos).

CUADRO N° 54. TINCIÓN GRAM

Tinción Gram en fresco	Tinción Gram en fresco de los m.o que crecieron en PCA
	
Presencia de levaduras	

3.2.7 CAPACIDAD PROBIÓTICA: EVALUACIÓN “in vitro”

3.2.7.1 Tolerancia al pH

Los microorganismos presentaron tolerancia a pH= 4,9 obteniéndose 17900 UFC/mL, Dicha tolerancia se debe a que varias levaduras en presencia de oxígeno pueden utilizar ácidos orgánicos de baja cadena carbonada como fuente de energía; tal es el caso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que en presencia de oxígeno pueden utilizar el ácido acético y láctico como fuente de carbono mediante el uso de vías anabólicas, enzimas y mecanismo de transporte específicos. Una vez que hayan ingresado al interior de la célula dichos ácidos producen acidificación del citoplasma y para mantener los valores adecuados dentro del rango óptimo del metabolismo las levaduras expulsan protones a expensas de ATP, lo cual disminuye el consumo de glucosa generándose un aumento del pH intracelular, permitiendo así a la levaduras resistir pH de amplio rango de 2,4 a 8,6. **VER CUADRO 55**

3.2.7.2 Resistencia a la simulación de los jugos gástrico y pancreático.


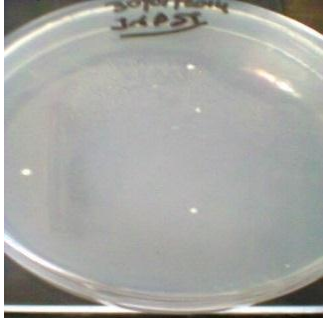
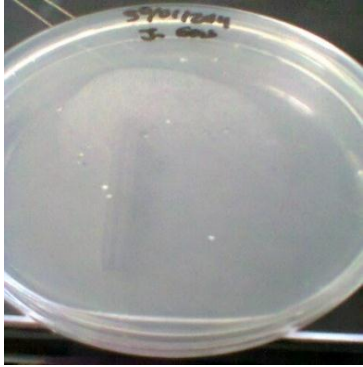
Los microorganismos resisten a la simulación del jugo gástrico a pH 2,73; esta resistencia se debe a que varios microorganismos utilizan los ácidos orgánicos de cadena carbonada corta como fuente de energía. Una vez que los ácidos hayan ingresado al interior de la célula producen acidificación citoplasmática la misma que es equilibrada mediante la liberación de protones a expensas de ATP lo cual disminuye el consumo de glucosa produciendo un aumento en pH intracelular. **VER CUADRO 55**

3.2.7.3 Resistencia a las sales biliares.

Los microorganismos resisten a esta barrera natural debido a que son capaces de hidrolizar las sales biliares originando a los ácidos biliares como producto de excreción, por ende obligan al colesterol a la síntesis de nuevos ácidos biliares **VER CUADRO 55.**

Por ejemplo algunos microorganismos como el *Lactobacillus spp*, posee enzimas hidrolasa (BSH), que producen la deconjugación de las sales biliares, hidrolizan el enlace amina liberando glicina y taurina de la base esteroide, mecanismo por el cual pueden resistir concentraciones de sales biliares en pruebas in vitro

CUADRO N° 55. EFECTO PROBIÓTICO. PRUEBAS "in vitro"

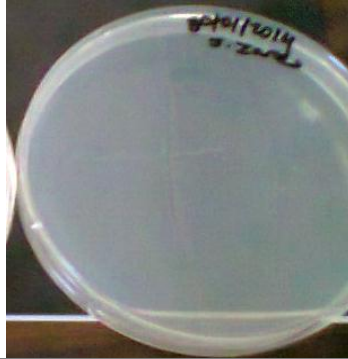
PRUEBAS	RESULTADO	DISCUSIÓN
Tolerancia al pH pH= 4,9	A pH 4,9 se obtuvieron 17920 UFC/mL 	Los microorganismos en estudio resistieron a pH de 4.9 debido a que poseen mecanismos propios de defensa.
Resistencia a la simulación del jugo gástrico. pH= 2,7	En 90 min se obtuvieron 30UFC/mL. 	Los microorganismos resistieron a pH 2,7. Se notó que mientras mayor tiempo este en contacto la B.K con la simulación del jugo gástrico mayor cantidad de microorganismos crecen en el agar PCA.
	En 3h crecieron 100UFC/mL. 	En el estómago va a suceder lo mismo ya que el estómago para su vaciamiento gástrico tarda 90 minutos, razón por la cual existe mayor crecimiento de microorganismos a los 90 minutos. Las colonias son redondas, blancas cremosas de aspecto liso.

CONTINUACIÓN.....

Resistencia a la simulación del jugo pancreático.

pH=8,2

Ninguna colonia en 90 minutos



No existió presencia de microorganismos ya que estos requieren mayor tiempo para adaptarse a las condiciones del medio.

En el organismo humano va a suceder lo mismo, a los 90 minutos no va a existir crecimiento de microorganismos ya que se requiere de 3 a 4 horas para que los alimentos lleguen al intestino y sean absorbidos.

500 UFC/mL en 3h.



La bebida en estudio demostró resistencia a la simulación del jugo pancreático a las 3horas. Se observó que mientras más tiempo transcurra más resistencia bacteriana existe.

Las colonias presentes en el medio son redondas blanquecinas, cremosas de aspecto liso.

Tolerancia a las sales biliares

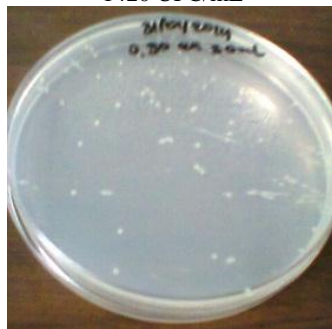
Sales Biliares [0,3%]
6200 UFC/mL



Mientras menor sea la concentración de sales biliares mayor cantidad de m.o resisten a su presencia ya que éstas a elevadas concentraciones son tóxicas.

Las colonias son redondas de color amarillo pálido de aspecto liso cremosas.

Sales Biliares [0,6%]
1420 UFC/mL




3.2.7.4 Reducción del colesterol en presencia de sales biliares.

En el cuadro Nº 56 se nota que los m.o presentes en la BK redujeron los niveles de colesterol, esta reducción puede deberse a que algunos m.o tienen la capacidad de incorporar a la membrana o adherir colesterol a la superficie, reduciendo de esta forma la disponibilidad del mismo.

Se puede decir que la disminución de colesterol en los medios de cultivo es secundaria a la precipitación del colesterol con ácidos biliares libres formados por las hidrolasas de los m.o. Además los m.o probióticos pueden disminuir el colesterol por una parte utilizando el colesterol para su propio metabolismo y por otro alteran la actividad de hidrolasas, enzimas responsables de la desconjugación de las sales biliares, lo que hace que no puedan ser reabsorbidas por el intestino y se eliminen con las heces.

CUADRO N° 56. REDUCCIÓN DEL COLESTEROL EN PRESENCIA DE SB

Descripción	Lectura del colesterol antes de incubar	Lectura del colesterol después de la incubación
Estándar	40,9 mg/dL	16,6 mg/dL
Muestra	35,6 mg/dL	10,3 mg/dL
Porcentaje de la reducción de colesterol		
Estándar	$40,9 \longrightarrow 100\%$ $16,6 \longrightarrow x$ $x = 40,6\%$	$x = (40,6 - 28,9)\%$
Muestra	$35,6 \longrightarrow 100\%$ $10,3 \longrightarrow x$ $x = 28,9\%$	
		

3.2.7.5 Actividad de la BK frente a varios patógenos

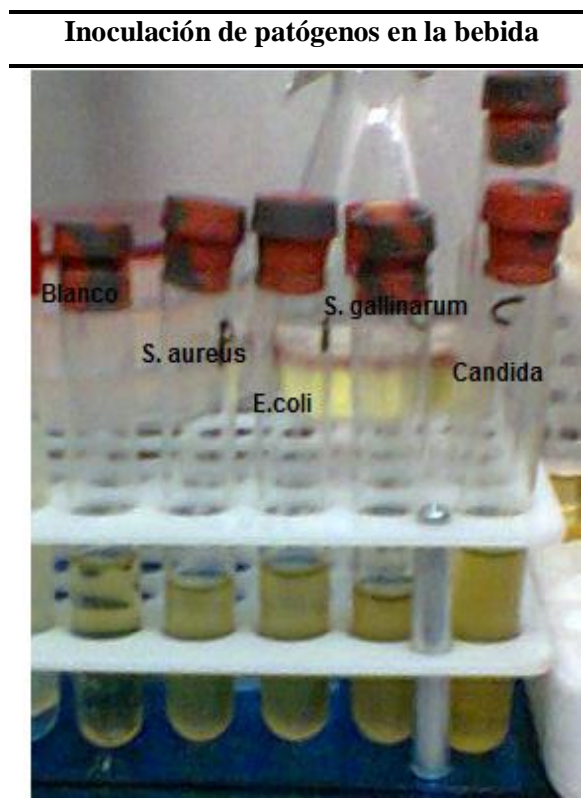
Para realizar esta prueba se escogieron dos m.o Gram positivos y dos m.o Gram negativos, con el objetivo de determinar la actividad antimicrobiana que poseen los compuestos de la B.K frente a estos patógenos. Las bacterias que se escogieron fueron:

- *Candida spp.*, son levaduras Gram positivas.
- *Staphylococcus aureus* es una bacteria anaerobia facultativa, Gram positiva. Se escogió esta bacteria debido a que en los alimentos es una bacteria contaminante debido a la mala manipulación de los mismos; además puede causar intoxicación alimentaria en humanos.
- *Salmonella gallinarum* es una bacteria Gram negativa capaz de producir infecciones intestinales. Esta bacteria es propia de las aves, en los alimentos es producto de contaminación debido a que en los huevos de las gallinas existe pequeños residuos de heces fecales.
- *Escherichia coli* es una enterobacteria Gram negativa, coliforme utilizado como indicador de contaminación fecal en productos de procedencia vegetal o animal incluyendo el agua.

Se escogieron estas bacterias porque son los focos más comunes de contaminación ya sea por la mala manipulación de los alimentos, por la mala potabilización del agua o por la contaminación de propio ambiente.

Tras haber cumplido dichos m.o con el tiempo de incubación, se pudo apreciar que existe crecimiento de *Salmonella gallinarum* y *Candida* por la presencia de turbidez en los tubos inoculados con dichos patógenos, mientras que en los tubos inoculados con *S. aureus* y *E. coli* no existió turbidez.

CUADRO N° 57. PATÓGENOS TRAS LAS 24 HORAS DE INCUBACIÓN.



Es conocido que los probióticos producen sustancias antimicrobianas como ácido láctico, acético y otros ácidos de cadena corta, peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas que aumentan la resistencia a la colonización, estimulan la producción de inmunoglobulinas e inhiben el crecimiento de patógenos; por lo tanto la bebida de Kombucha es útil frente a *S. aureus* y *E. coli* mientras que la BK no es útil frente a *Salmonella gallinarum* y *Candida* porque se necesita de una flora saprofita mayor para evitar el crecimiento de dichos m.o. **VER CUADRO N° 58.**

CUADRO N° 58. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA BK

PATÓGENO	RESULTADO	DISCUSIÓN
<i>S. aureus</i>	No creció <i>S. aureus</i> en su agar selectivo, manitol.	Con este resultado se notó que la bebida es un potencial probiótico, ya que inhibe el crecimiento de <i>S. aureus</i> . En este caso el manitol acentúa su coloración, pasando de rosado a rojo debido al cambio de pH que sufre por la adición de la B.K inoculada con dicho m.o; este cambio de pH del medio se debe a la acidez que posee la bebida
<i>E. coli</i>	En MacConkey, medio selectivo para <i>E. coli</i> no se evidenció crecimiento alguno de dicho patógeno.	Este patógeno no creció debido a la presencia de ácidos orgánicos que inhiben el crecimiento de patógenos.
<i>Candida</i>	Crece	La BK no presentó acción inhibitoria frente a <i>Candida</i> y <i>Salmonella gallinarum</i> por lo que se concluye que la bebida no es útil frente a estos patógenos, ya que estos microorganismos poseen mecanismos de defensa propios pudiendo soportar pH ácidos. Además dicha resistencia puede deberse a que se necesite una flora saprófita mayor para contrarrestar dichos m.o
<i>Salmonella gallinarum</i>	Crece	

3.2.8 Tiempo de vida útil de la BK

Se determinó que el tiempo de vida útil del producto elaborado fue de un mes manteniéndolo en refrigeración para inactivar o inhibir el proceso fermentativo propio de los microorganismos anaerobios.

También se realizó el análisis organoléptico para evaluar por medio de los órganos de los sentidos la calidad de la bebida de Kombucha.

Sabor: Ligeramente ácido.

Color: Amarillo translúcido

Olor: Ligeramente acético

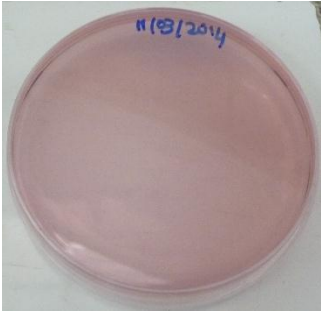
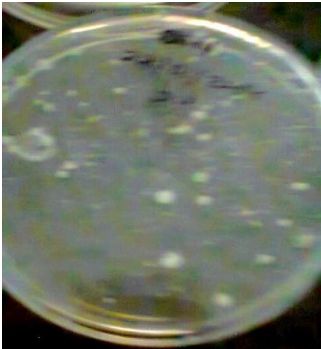
Textura: Pegajosa

CUADRO N° 59. TIEMPO DE VIDA ÚTIL

ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO		
Parámetro	Resultado	Discusión
pH	3.37 ± 0.1	Este pH es aceptable ya que le concede a la Kombucha el sabor y aroma característico.
I_A	0,28%	Esta acidez es aceptable.
° Brix	7.8	Indican que existen 7.8 g de azúcar por cada 100 mL de BK.
Densidad	1.029	Indica que aún existe sustrato para que las bacterias continúen con la fermentación

Con estos resultados se dice que la bebida es de calidad ya que se encuentra dentro de los valores obtenidos como óptimos. Posterior al análisis fisicoquímico se realizó el control microbiológico, para determinar la calidad sanitaria de la B.K

CUADRO N° 60. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LA B.K

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO			
Aerobios Mesófilos	30 UFC/mL		Al refrigerar la bebida se inhibe parcialmente la fermentación, razón por la cual el producto debe consumirse dentro del tiempo estimado ya que transcurrido dicho tiempo el producto se altera por la generación de una mayor cantidad de ácido, incluso llegando a ser un vinagre.
Coliformes	0UFC/mL		No existe presencia de microorganismos contaminantes, por lo tanto el producto es apto para el consumo humano.
Levaduras	420 UFC/mL		Al refrigerar la bebida se inhibe parcialmente el crecimiento de levaduras ya que la fermentación continúa por medio de estos m.o. Las colonias son blancas cremosas, rugosas de forma irregular. Con este resultado estamos ratificando que los microorganismos presentes en la bebida en estudio son en su mayoría levaduras.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

1. Según los parámetros aplicados en este estudio se concluye que la formulación adecuada para la elaboración de la bebida fermentada de té negro a base de *Manchurian fungus* fue el tratamiento número dos que consistió en preparar la bebida de té negro con una concentración 0,5 M de sacarosa, 2500 ppm de té negro de la marca comercial AKÍ, 12500 ppm en masa de microorganismos a inocular; toda esta preparación se realizó en 2000 mL de agua mineral Aqua Bella Vita ®.
2. Mediante el análisis organoléptico, fisicoquímico, complementario y microbiológico se determinó el rango adecuado de atributos de calidad y parámetros de proceso para obtener el producto optimizado bromatológicamente, ya que la calidad de la bebida de Kombucha depende tanto del sustrato como del tiempo de fermentación, para que el *Manchurian fungus* origine los metabolitos secundarios (ácidos) responsables del aroma y del sabor característico de la bebida. Mediante la metodología superficies respuesta se logró optimizar la BK obteniendo los siguientes valores óptimos: pH= 3,06; I_A= 0,22%; °Brix= 7,7; Densidad=1,033, mientras que la carga microbiana para aceptar como un producto de calidad fue de 526,7 UFC/mL de bebida y la BK se encuentra libre de patógenos que son responsables de intoxicaciones alimentarias. Además en el análisis complementario se obtuvo 7.3% de azúcares totales lo cual indica que la bebida es baja en calorías útil para personas diabéticas.

3. Se evaluó tanto la actividad probiótica como la actividad hipolipemiente “*in vitro*” de la Kombucha llegando a la conclusión de que el producto elaborado es un potencial probiótico ya que los microorganismos presentes en la BK toleraron a la acidez como también resistieron a la simulación del jugo gástrico y jugo pancreático, debido a que los microorganismos poseen mecanismos propios de resistencia mediante los cuales pueden equilibrar el pH extracelular con el intracelular. También presentaron resistencia a las sales biliares ya que algunos microorganismos poseen enzimas hidrolasas que desconjugan a las sales biliares aumentando la excreción de ácidos biliares, por ende obligan al colesterol a la síntesis de dichos ácidos. Los microorganismos presentes en la bebida de Kombucha también presentaron actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* y *E. coli* principales patógenos de contaminación en los alimentos, mientras que la bebida de Kombucha no es útil frente a *Salmonella gallinarum* y *Candida* concluyendo que la actividad microbiana se debe a la presencia de los ácidos acético, láctico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas producidas por los microorganismos para inhibir el crecimiento de dichos patógenos. Además los microorganismos presentes en la Kombucha redujeron los niveles de colesterol en un 11.7%, con esto se concluye que la bebida elaborada es una bebida funcional que ayudará a mejorar la calidad de vida de la población.
4. Mediante el estudio de estabilidad fisicoquímico y microbiológico se determinó que el tiempo de vida útil de la bebida de Kombucha es de un mes en refrigeración ya que transcurrido dicho período se verá afectada por la acidez debido a la presencia de una mayor concentración de ácidos y en vez de ser una bebida refrescante será un vinagre.

4.2 RECOMENDACIONES

1. Durante todo el proceso de elaboración y embotellado se recomienda utilizar material estéril para evitar contaminaciones del cultivo.
2. A la hora de elaborar la bebida fermentada a base de *Manchurian fungus* aplicar condiciones estrictas de asepsia para evitar la contaminación de la biomasa, ya que si esta se contamina se origina el moho de *Aspergillus* que es perjudicial para la salud. Por lo tanto este Kombucha debe eliminarse.
3. Se puede utilizar el *Manchurian fungus* como compostaje (abono orgánico).
4. Se recomienda utilizar la biomasa de Kombucha para la elaboración de carne como lo hacen con la soya.
5. Se recomienda aplicar procesos tecnológicos para la elaboración de la bebida de Kombucha ya que de esta forma el producto obtendrá mayor tiempo de vida útil.
6. En futuras investigaciones se recomienda realizar estudios *in vivo* y posteriormente en personas voluntarias siguiendo los protocolos de investigación.
7. Es necesario utilizar un ambiente estéril para la elaboración de la bebida ya que si existen otras sustancias químicas en el ambiente pueden contaminar la bebida; en especial la sacarosa puede hidratarse con ciertas sustancias presentes en el ambiente y por ende se contamina la bebida.
8. Hacer uso de mecheros para asegurarnos de la esterilidad del área donde se elabora la bebida.
9. El Kombucha también se puede utilizar para tratamiento de aguas servidas.

CAPÍTULO V

5.1 RESUMEN

La investigación, Desarrollo, elaboración y optimización bromatológica de una bebida de té negro fermentada a base de *Manchurian fungus* (Kombucha) y evaluación de su actividad como potencial alimento funcional, fue realizada en los laboratorios de Alimentos y Microbiología de escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Para elaborar la bebida optimizada de Kombucha se utilizó el método experimental, donde se manipularon variables independientes como la concentración de sustrato e inóculo, tiempo de fermentación y ciclos de oxigenación. Para producir 2000 mL de bebida optimizada se necesita concentraciones de glucosa 0,5 M, 2500 ppm de té negro, 12500 ppm de microorganismos a inocular con un tiempo óptimo de fermentación, 15 días. Como producto se obtiene una bebida con pH 3.06; 0.22% acidez, 7.7 °Brix y densidad 1.033. Tanto el pH como el I_A son responsables del sabor característico de la Kombucha.

En el control de calidad se obtuvo ausencia de coliformes, presencia de aerobios mesófilos (960 UFC/mL) y levaduras (720 UFC/mL) propias de la fermentación. A las colonias que crecieron en PCA (Plate Count Agar) se realizó tinción Gram como también se hizo Gram gota fresca de la bebida elaborada identificando en ambos casos levaduras.

Al evaluar la actividad probiótica del alimento y teniendo en cuenta que todos los análisis fueron realizados en la bebida y no así en la capa celulósica, existió prevalencia de levaduras, razón por la cual se realizó la tolerancia a pH 4.9, ya que estas se desarrollan entre pH 4 y 5. Las levaduras resistieron a la tolerancia de pH como también resistieron a la acción de los jugos gástrico a pH 2.7 y pancreático a pH 8.2. También se comprobó que la bebida reduce los niveles de colesterol en presencia de sales biliares debido a que dichos microorganismos poseen hidrolasas que desconjugan las sales biliares originando ácidos biliares que son excretados en las heces razón por la cual obliga al colesterol a sintetizar mayor cantidad de ácidos biliares.

Con estos resultados se concluye que el producto elaborado es un potencial probiótico apto para el consumo humano, teniendo en cuenta que los puntos críticos a la hora de elaborar la bebida son la concentración de sustrato y el tiempo de fermentación.

A los interesados en este estudio se recomienda en posteriores investigaciones realizar pruebas en animales de experimentación para corroborar los resultados obtenidos “*in vitro*” y posteriormente en humanos respetando los protocolos de investigación.

5.2 SUMMARY

This research development, production and bromatological optimization of a fermented black tea beverage with *Manchurian fungus* (Kombucha) and its activities evaluation as a potential functional food was performed in the Food and Microbiology laboratories, in Biochemistry and Pharmacy School in the Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

In order to make the Kombucha optimized beverage, the experimental method was used, independent variables such as substrate, inoculum, fermentation time and oxygenation cycles were manipulated. To produce 2000 mL of optimized beverage; 0.5 M glucose, 2500 ppm of black tea, and 12500 ppm of microorganisms to inoculate optimum fermentation time, 15 days are required. As a product a beverage with pH 3.06, 0.22% acidity, 7.7 °Brix, and density 1.033 is obtained. As much the pH as the I_A are responsible for the characteristic Kombucha flavor.

In the quality control de following results were obtained; coliform absence, presence of aerobic mesophilic (960 UFC/mL), and yeast (720 UFC/mL) specific for fermentation. Gram staining was performed to the colonies that grew on PCA (Plate Count Agar), Gram fresh drop of the elaborated beverage was also made, identifying yeas in the both cases.

In evaluating the food probiotic activity and considering that all analyzes were performed on the beverage and not on the cellulose layer, there was yeast prevalence, that is why tolerance was performed at pH 4.9, as these are developed between pH 4 and 5. Yeasts resisted pH tolerance, also resisted the action of the gastric juices at pH 2.7 and pancreatic at pH 8.2. It was also found that the beverage reduce cholesterol levels in the presence of bile salts because these microorganisms have hydrolases which desconjugate bile salts causing bile acid which are excreted in the feces, for this reason it forces the cholesterol to synthesize more bile acids amount.

After these results it is concluded that the finished product is a potential probiotic suitable for human consumption, taking into account that the critical points when preparing the beverage are the substrate concentration and fermentation time.

It is recommended for future studies to conduct test in experimental animals to corroborate the observed results "*in vitro*" and later in human beings respecting the research protocols.

CAPÍTULO VI

7.1 BIBLIOGRAFÍA

1. **BADUI, S.**, Química de los alimentos., 4 ed., México DF - México., Editorial Educacional Pearson., 2006., Pp. 50.
2. **BILBEK, R y BHUNIA, A.**, Fundamentos de microbiología de los alimentos., 4 ed., México DF - México., Editorial McGraw Hill., 2010., Pp. 28, 119, 312.
3. **GALLEGOS J.**, Manual de prácticas de Microbiología de los Alimentos., 1 ed., Riobamba - Ecuador., 2003., Pp.14 – 16, 45 -46.
4. **HORTON, R y otros.**, Principios de Bioquímica., 1 ed., México DF - México., Editorial Pearson., 2008., Pp. 258.
5. **MURRAY, R y MAYES P.**, Bioquímica de Harper., Traducida de la 25 ed. en inglés., 15 ed., Bogotá – Colombia., Editorial Manual Moderno., 2001., Pp. 302 – 325, 329 – 339.

6. RAMOS, A y otros., Probióticos y Salud., 1 ed. Madrid – España., Editorial Díaz de Santos., 2012., Pp. 3 – 9., 138 – 143.

7. ROSKOSKI, R., Bioquímica., 1 ed., México D.F – México., McGraw – Hill., 2001., Pp. 162 – 213.

8. ARANCETA, J y otros., Alimentos funcionales y salud en las etapas infantil y juvenil., 1ed., Madrid – España., Editorial Médica Panamericana., 2010., Pp.37-38.

E-Book:

<http://books.google.com.ec/books?id=9O03337S6B0C&pg=PA37&dq=caracter%20de%20los%20alimentos%20funcionales&hl=es&sa=X&ei=OYuLUsP1OubmsATa3IHIAw&ved=0CDEQ6AEwAQ#v=onepage&q=caracter%20de%20los%20alimentos%20funcionales&f=false>

9. ASTIASARÁN, I y otros., Alimentos y Nutrición en la Práctica Sanitaria., 1 ed., Madrid – España., Editorial Díaz de Santos., 2008., Pp. 64-66.

E-Book:

<http://books.google.com.ec/books?id=26LejDtx4mAC&pg=PA63&dq=alimentos+probioticos&hl=es&sa=X&ei=evqLUtLFNZPesASv94CoCQ&ved=0CwQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false>.

10. CULTIMED., Manual Básico de Microbiología., 4 ed., Barcelona – España., Panreac Química S.A., 2003. Pp. 20, 27, 63, 71, 75, 82, 89, 100, 102, 112, 114, 130

E-Book: <http://es.scribd.com/doc/23104786/Microbiologia-Manual-Basico-de-Microbiologia-%20A9-Cultimed-2003>.

- 11. MARTÍNEZ, A y otros.,** Alimentos y Nutrición en la práctica Sanitaria., 1 ed., Madrid – España., Editorial Díaz de Santos., 2003., Pp. 63 – 65.

E-Book:

<http://books.google.com.ec/books?id=26LejDtx4mAC&pg=PA63&dq=alimentos+probioticos&hl=es&sa=X&ei=g148Uuy6OYf69QSWqIFY&ved=0CDOQ6AEwAw#v=onepage&q=alimentos%20probioticos&f=false>.

- 12. MATAIX, J y SÁNCHEZ, F.,** Bioquímica., 1ed., Madrid – España., Editorial Sirio., 2010., Pp. 63 – 90.

E-Book: http://www.uco.es/master_nutricion/nb/Mataix/lipidos.pdf

- 13. STEVENS, N.,** La Kombucha. El té extraordinario., 3 ed., Barcelona – España., Editorial Sirio., 2003., Pp. 18 - 57.

E-Book:

<http://books.google.com.ec/books?id=QqITo033pMgC&pg=PA18&dq=kombucha+%28Manchurian+fungus%29&hl=es-419&sa=X&ei=nQQ7UsjTPJC88wTo5oHgAQ&ved=0CDcQ6AEwAQ#v=onepage&q=kombucha%20%28Manchurian%20fungus%29&f=false>.

- 14. VÁSQUEZ, C y otros.,** Alimentación Nutricional., 2 ed., Madrid - España., Editorial Díaz de Santos., 2005., Pp. 154 – 155.

E-Book:

<http://books.google.com.ec/books?id=F-xV6Rul96kC&pg=PA154&dq=alimentos+probioticos&hl=es&sa=X&ei=g148Uuy6OYf69QSWqIFY&ved=0CFAQ6AEwBw#v=onepage&q=alimentos%20probioticos&f=false>.

- 15. FRANCIA.,** Becton Dickinson France SA., Catálogo de medios de cultivo., BD Tryptic Soy Broth (TSB)., 1ed., Aristide Berges –Francia., Biosciences., Instrucciones de uso – Medios en frascos listos para usar.,2008.,Pp. 1 – 5.
E-Book: <https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/BA/ES-BA-257107.pdf>
- 16. ALEMANIA.,** Becton, Dickinson and Company., Catálogo de medios de cultivo., BD Sabouraud Agar with Chloramphenicol., 1ed., Heidelberg – Alemania., Biosciences., Instrucciones de uso – Medios en placa listos para usar., 2013., Pp. 1- 3.
E-Book: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8776>
- 17. CETERA, A.,** Fundación Ahdonay., Publicaciones científicas., Análisis Sensorial., 1ed., Buenos Aires – Argentina., Alimentación.org.ar., Ingeniera en Alimentos., 2007 – 2014.
E-Book:
http://www.alimentacion.org.ar/index.php?option=com_content&view=article&id=2104:analisis-sensorial-una-herramienta-fundamental&catid=38:publicaciones-especializadas&Itemid=56
- 18. CHERO, A.,** Scribd., Red académica., Composición del Jugo Gástrico., 1ed., Chiclayo – Perú., Seminario de Fisiología., 2008., api_user_11797_FiOrElla., Pp. 3 – 7.
E-Book: <http://es.scribd.com/doc/6657448/El-Jugo-Gastrico>

- 19. ESPAÑA.**, BioSystems S.A., Hoja Técnica., Triglicéridos., 1ed., Barcelona – España., TRIGLYCERIDES. 2006., Pp.1.
E-
Book:<http://www.biosimex.com.mx/pdf/insertos%20dedicados/Quimica%20clinica/12528%20trigliceridos.pdf>
- 20. ITALIA.**, FAO Y OMS., Publicaciones científicas., Evaluación de los Probióticos en los Alimentos., 1 ed., Roma – Italia., Estudio FAO nutrición y Alimentación., 2006. Pp. 3 -15.
E-Book: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512s/a0512s00.pdf>
- 21. ARGENTINA.**, LABORATORIOS BRITANIA S.A., Hoja Técnica., Recuento en Placa Agar., 1 ed., Caba – Argentina., Investigaciones “*in vitro*”, 2011., Pp: 1 – 2.
E-Book: http://www.britanialab.com/productos/242_hoja_tecnica_es.pdf
- 22. PERIAGO, J.**, Universidad de Murcia., Contenido del curso., Microbiología e higiene de los alimentos., Murcia – España. Nutrición y Bromatología., 2011., Pp. 2 – 24.
E. Book: <http://ocw.um.es/cc.-de-la-salud/higiene-inspeccion-y-control-alimentario/practicas-1/tema-1.pdf>.
- 23. SARSOTTI, S.**, Revista Acuario., Revista Científica., Composición de la Kombucha., Buena Siembra., 1 ed., Buenos Aires – argentina., 2009.
E-Book: <http://buenasiembra.com.ar/salud/articulos/composicion-de-la-kombucha-224.html>

- 24. AMMAR, E y otros.**, Revista científica., Antimicrobial effect of Kombucha analogues., 1 ed., Tunisia - Tunes., Elsevier., LWT - Food Science and Technology., Vol. 47., No.1., 2012., Pp.71 – 72.

E-Book: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643812000023>.

- 25. CHEN, C y otros.**, Revista Científica., Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of Kombucha., 1ed., Taiwan - China., Elsevier., Food Chemistry., Volumen 98., No.3., 2005., Pp.502.

E-Book: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814605005364>

- 26. COLOMBIA.**, Catálogo de medios de cultivo., Agar Sabouraud., 1ed., Bogotá - Colombia., BIOBACTER LTDA., Medios y Reactivos., Cat. 01025., 2007., Pp.1.

E-Book: <http://www.biobacter.com/INSERTOS/AGAR%20SABOURAUD%20CLORA.pdf>

- 27. COLLADO, M y otros.**, Revista científica., Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo., 1ed., Valencia – España., ACTA PEDIATRICA ESPAÑOLA, Nutrición Infantil., Vol. 61., Número 9., 2003. Pp. 150 -155.

E-Book:

<http://educapalimentos.org/site2/archivos/orientacion/PROBIOTICO.pdf>

- 28. COX, J y otros.**, Revista Científica., Yeast ecology of Kombucha fermentation., 1ed., Sydney - Australia., Elsevier., International Journal of Food Microbiology., Vol. 95., No. 2., 2004., Pp. 119 – 121.

E-Book: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160504001072>

- 29. CUETO, C y ARAGÓN, S.**, Revista Científica., Evaluación del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas para reducir el colesterol “*in vitro*”., 1ed., Bogotá – Colombia., Scientia Agropecuaria., Vol.1. No. 1., 2012., Pp. 45 – 50.

E-Book: <http://revistas.concytec.gob.pe/pdf/agro/v3n1/a06v3n1.pdf>

- 30. CUETO, M y otros.**, Revista Científica., Evaluación in vitro del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño. 1ed., Bogotá – Colombia., Universidad de La Sabana., Actual Biol., Vol. 32., No. 93., 2010., Pp. 131.

E-Book:

<http://matematicas.udea.edu.co/~actubiol/actualidadesbiologicas/raba2010v32n93art1.pdf>

- 31., DUFRESNE, C Y FARNWORTH, E.**, Revista Científica., Tea, Kombucha, and health: a review., 1ed., Casavant Blvd., Canada., Elsevier., International Journal of Food Microbiology., Vol. 33., No. 1., 2004., Pp.409 – 411, 145 - 417.

E-Book: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816050400107>

- 32. FERRER, L y otros.**, Revista Científica., Alimentos funcionales: Probióticos., 1ed., Valencia – España., ACTA PEDIATRICA ESPAÑOLA., ALIMENTOS FUNCIONALES: PROBIOTICOS., Nutrición Infantil., Vol. 59., No. 3., 2001. Pp. 150 -155.

E-Book:

<http://www.inocua.org/site/Archivos/investigaciones/Alim%20funcional%20probioticos.pdf>

33. JAYABALAN, R y otros., Revista Científica., Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation., 1ed., Tamil Nadu - India., Elsevier., Food Chemistry., Vol. 102., No. 1., 2007., Pp. 391 – 393.

E-Book:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814606004250>

34. KALLEL, L y otros., Revista Científica., Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion., 1ed., Marseille, France., Elsevier., Food Research International., Vol. 49., No. 1., 2012., Pp.226– 227.

E-Book: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996912003274>.

35. MANZANO, C y otros., Revista Científica., Efectos clínicos de los probióticos: qué dice la evidencia., 1ed., Santiago – Chile., Revista chilena Scielo., Artículos de actualización., Vol. 39., No. 1., 2012. Pp. 98 – 100.

E. Book: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182012000100010&lng=en&nrm=iso&tlng=en.

36. MARSH, A y otros. Revista Científica., Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. 1 ed., Cork – Irlanda., Elsevier., Food Microbiology., Vol. 38., 2014., Pp. 171 - 178.

E-Book:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996900000673>

37. MÉXICO., Hoja técnica., Caldo Soya y tripticaseína., DIBICO S.A., Medio de Cultivo., México DF – México., Cat.1042., 2012., Pp. 3.

E-Book: <http://www.dibico.com/fichast/1042.pdf>

- 38. MONTEAGUDO, A y otros.**, Revista Científica., In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin., 1ed., Nueva León – España., Elsevier., Journal of Functional Foods., Vol. 4., No. 2., 2012., Pp.: 532 – 533.

E-Book: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464612000394>

- 39. NAVARRO, V y otros.**, Revista Científica., Revisión. Metabolismo del colesterol: bases actualizadas., 1ed., Madrid – España., Revista Española de Obesidad., Obesidad., Vol. 7., No. 6. 2009., Pp. 360 – 363, 369.

E-Book: <http://www.seedo.es/portals/seedo/RevistaObesidad/2009-n6-Revision-Metabolismo-del-colesterol-bases-actualizadas.pdf>

- 40. OLAGENERO, G y otros.**, Artículo científico., Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos., Buenos Aires – Argentina., DIAETA., Trabajo de actualización., Vol. 25., No. 121., 2007., Pp. 20 - 29.

E-Book: http://www.fmed.uba.ar/depto/nutrnormal/funcionales_fibra.pdf

- 41. ORTIZ, A y otros.**, Revista Científica., Evaluación de la capacidad probiótica "in vitro" de una cepa nativa de *Saccharomyces cerevisiae*., 1ed., Bogotá – Colombia., Readaly.org., Evaluación de la capacidad probiótica "in vitro" de una cepa nativa de *Saccharomyces cerevisiae*. 1 ed., Vol. 13., No. 2., 2008., Pp. 138 – 140.

E. Book: <http://www.redalyc.org/pdf/499/49913205.pdf>

- 42. REYESJ, y otros.**, (2012). Revista científica., Probióticos., 1ed., México DF – México., Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas., Redalyc.org., Los

Probióticos: ¿cómo una mezcla de microorganismos hacen un gran trabajo?

Vol. 43., No. 1., 2011. Pp. 7 – 17.

E-Book: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57924376002>

- 43. SRIHARI, T y otros.**, Revista científica., Antihyperglycaemic efficacy of kombucha in streptozotocin-induced rats., 1 ed., Andhra Pradesh – India., Elsevier., Journal of Functional Foods., Vol. 5., No. 4., 2013., Pp. 1-2.

E-Book:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464613001928?np=y>.

- 44. VIDHYASAGAR, V y JEEVARATNAM, K.**, Revista científica., Evaluation of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from Idly batter for probiotic properties in vitro., 1ed., Kalapet – India., Elsevier., Journal of Functional Foods., Vol. 5., No. 1., 2013., Pp. 235 – 243.

E-Book:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464612001582>.

- 45. ECUADOR., INSTITUTO DE NORMALIZACIÓN ECUATORIANA.**, Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos., REP., NTE INEN 1529-5., Quito – Ecuador., INEN., 2006. Pp. 1 – 4.

E-Book: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.1529.5.2006.pdf>

- 46. ECUADOR., INSTITUTO DE NORMALIZACIÓN ECUATORIANA.**, Control microbiológico de los alimentos. Determinación de microorganismos coliformes por la técnica de recuento de colonias., NTE INEN 1529-7., Quito – Ecuador., INEN., 1990. Pp.1 – 5.

E-Book: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.1529.7.1990.pdf>

- 47. ECUADOR., INSTITUTO DE NORMALIZACIÓN ECUATORIANA.**, Control microbiológico de los alimentos. Mohos y levaduras viables. Recuento en

placa por siembra en profundidad Primera edición., NTE INEN 1529-10., Quito – Ecuador., INEN., 1998. Pp. 1 - 5.

E-Book: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.1529.10.1998.pdf>

48. ECUADOR., INSTITUTO DE NORMALIZACIÓN ECUATORIANA.,

Bebidas alcohólicas cervezas. Determinación de la acidez total., Requisitos., NTE INEN 2323-2002., Quito – Ecuador., INEN., 2002-12. Pp. 1 - 5.

E-Book: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.2323.2002.pdf>

49. ECUADOR., INSTITUTO DE NORMALIZACIÓN ECUATORIANA.,

Bebidas alcohólicas. Cerveza. Determinación del pH., NTE INEN 2325-2002., Quito – Ecuador., INEN., 2002. Pp. 1-3

E-Book: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.2325.2002.pdf>

50. ECUADOR., INSTITUTO DE NORMALIZACIÓN ECUATORIANA.,

Alimentos funcionales. Requisitos., NTE INEN 2587., Quito – Ecuador., INEN., 2011 Pp. 1 - 2.

E-Book: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.2587.2011.pdf>.

51. ECUADOR., INSTITUTO DE NORMALIZACIÓN ECUATORIANA.,

Leches fermentadas., Requisitos., NTE INEN 2395., Quito – Ecuador., INEN., 2011 Pp. 1 – 3.

E-Book: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.2395.2011.pdf>.

52. ECUADOR., INSTITUTO DE NORMALIZACIÓN ECUATORIANA.,

Bebidas alcohólicas. Bebidas alcohólicas. Cerveza. Determinación de alcohol., NTE INEN 2322., Quito – Ecuador., INEN., 2002., Pp. 1 - 5.

E-Book: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.2322:2000.pdf>

- 53. ACOSTA, J.,** Evaluación de *Saccharomyces cerevisiae* “Florida 1” como probiótico para consumo animal., Facultad., Carrera., Universidad Autónoma Metropolitana., México D.F – México., **Tesis.**, 2009., Pp.15 – 17.

E-Book: <http://148.206.53.84/tesiuami/UAMI15433.pdf>

- 54. LEÓN, M.,** Evaluación in vitro de Cepas de Bacterias Ácido Lácticas Nativas con Potencial Probiótico., UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA., Montevideo – Uruguay., **Tesis.**, 2012., Pp. 16, 17, 23

E-Book: <http://www.bib.fcien.edu.uy/files/etd/pasan/uy24-15766.pdf>

- 55. LÓPEZ, S y SERNA, L.,** Manual del laboratorio de análisis de alimentos., Facultad de Tecnología., Escuela de química., UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA., Pereira – España. **Tesis.**, 2010., Pp. 19, 20, 37.

E-Book:

<http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/1824/1/66407S486.pdf>

- 56. MENDOZA, A.,** Caracterización de la levadura *Kluyveromyces marxianus* como microorganismo probiótico. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Hidalgo – México. 2013., Pp 27 – 28.

E-Book:

<http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/231104/1862/1/TESIS%20SEL.pdf>.

- 57. ORTIZ, A Y REUTO, J.,** Evaluación de la capacidad probiótica *in vitro* de una cepa nativa de *Saccharomyces cerevisiae*., Facultad de Ciencias., Escuela de

Biotecnología Ambiental e Industrial., Pontificia Universidad Javeriana., Bogotá – Colombia., **Tesis.**, 2007., Pp. 45 – 49.

E-Book: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis17.pdf>

- 58. ORTIZ, A.,** Efecto hipolipemiente del extracto de las hojas de frutipan (*artocarpus altilis*), en ratas (*rattus novergicus*) con hiperlipidemia inducida., Facultad de Ciencias., Escuela de Bioquímica y Farmacia., ESPOCH., Riobamba – Ecuador., **Tesis.**, Pp. 68 -74.

E-Book:

<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2586/1/56T00358.pdf>

- 59. RODRÍGUEZ, M.,** Aislamiento y selección de las cepas de *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora., Facultad de biociencias. Departamento de genética., Universidad Autónoma de Barcelona., Barcelona – España., **Tesis.**, 2009., Pp. 8 – 10, 17, 18, 45 – 48

E-Book:

<http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3931/mrg1de1.pdf;jsessionid=120521A35D4D99AAFAB40D1B1835CAA3.tdx2?sequence=1>.

- 60. RUBIO, ALFREDO.,** Té de Kombucha y sus beneficios para el sistema digestivo., Maestría en Neuropatía., Universidad Particular Equinoccial., (UPE)., Cuenca - Ecuador., Pp. 20 - 29.

E-Book: <http://www.monografias.com/trabajos-pdf4/te-kombucha-y-salud/te-kombucha-y-salud.pdf>.

61. BEBIDAS FUNCIONALES.

E-Book.

http://www.unac.edu.pe/documentos/organizacion/vri/cdcitra/Informes_Finale

s_Investigacion/Setiembre_2011/IF_ORDONEZ%20HUAMAN_FIPA/INFO
RME%20FINAL.pdf.

Buscado el 10/03/2014

62. FOOD AND DRINK. COMPANIES AND MARKETS.

E-Book: <http://www.companiesandmarkets.com/News/Food-and-Drink/Global-functional-drinks-market-to-be-worth-89-6-billion-by-2016/NI7500>.

Buscado el 10/03/2014

63. SCALE-UP OF BLACK TEA BATCH FERMENTATION BY KOMBUCHA. INSTITUTION OF CHEMICAL ENGINEERS.

E-Book: <http://scihub.org/mail/lg.php?doi=10.1205/fbp.05061&url=aHR0cDovL2xpYmdlbi5vcmcvc2NpbWFnMy8xMC4xMjA1L2ZicC4wNTA2MS5wZGY%3D>

Buscado el 7/ 01/2014

64. INFLUENCE OF WORKING CONDITIONS UPON KOMBUCHA CONDUCTED FERMENTATION OF BLACK TEA.

E-Book: <http://scihub.org/mail/lg.php?doi=10.1205/fbp.04306&url=aHR0cDovL2xpYmdlbi5vcmcvc2NpbWFnMy8xMC4xMjA1L2ZicC4wNDMwNi5wZGY%3D>

Buscado el 7/01/2013

65. COLESTEROL.

E-Book: http://higherred.mcgraw-hill.com/sites/dl/free/9701056957/365572/capitulo_muestra.pdf

Buscado el 18/12/2013

CAPÍTULO VI

5.1 ANEXOS

ANEXO 1. ANÁLISIS QUÍMICO DEL AGUA DE FUENTE



ANEXO 2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL AGUA DE FUENTE

EXAMEN MICROBIOLÓGICO DE AGUA N° 131-13

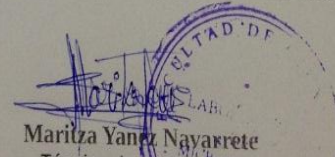
Solicitado por: Sr Telmo Rodas
Dirección: Pagma, Alausí Teléfono: 0997143089
Tipo de muestra : Agua Purificada Aqua Bella Vita
Fecha de muestreo: 13/11/2013
Fecha de Recepción: 14/11/2013 Código: 131-13

01 EXAMEN FISICO
Olor: Inodora
Color: Incolora
Aspecto: transparente

02 DETERMINACIONES	METODO USADO	VALORES DE REFERENCIA*	VALOR ENCONTRADO
NMP Colonias Coliformes totales /100 mL	Método 9223 Tecnología de Sustrato definido. Colilert . 35°C ± 0.5°C/24h.	<1	<1
NMP Colonias Coliformes fecales / 100 mL	Método 9223 Tecnología de Sustrato definido. Colilert . 35°C ± 0.5°C/24h.	<1	<1

*NTE INEN 1108. Límite máximo (para aguas potables) <1.1 significa que en el ensayo de NMP utilizando 5 tubos de 20cm³ o 10 tubos de 10 cm³ ninguno es positivo

FECHA DE ANÁLISIS
Inicio Final
14/11/2013 15/11/2013


Maritza Yaniz Nayarrete

ANEXO 3. ELABORACIÓN DEL KOMBUCHA



Adición del té negro



Adición

de inóculo



Complejo microbiano



Bebidas en proceso de fermentación



Material estéril



Bebidas cosechadas

ANEXO 4. CONTROL DE CALIDAD DEL PRODUCTO ELABORADO



Medición del pH



Determinación de la acidez



Control microbiológico

ANEXO 5. REACTIVACIÓN DE CEPAS ATCC



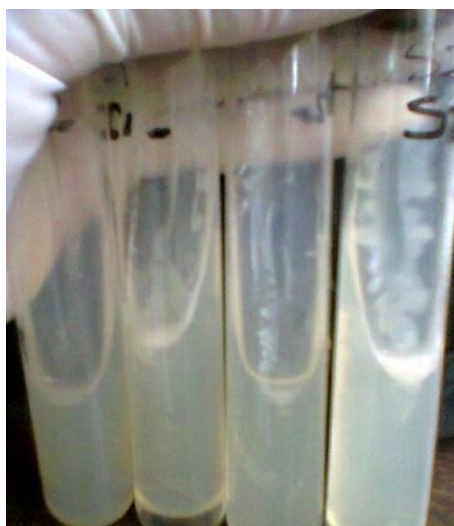
Cepas Inactivas



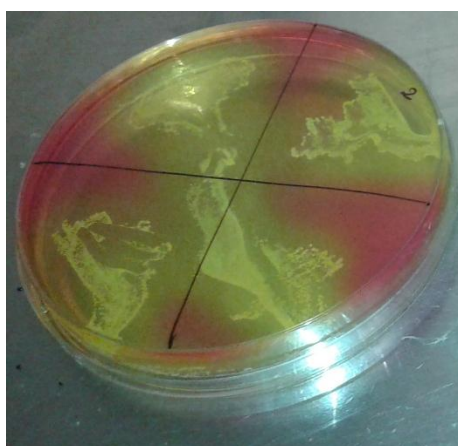
Reactivación de cepas ATCC



Reactivación de cepas ATCC

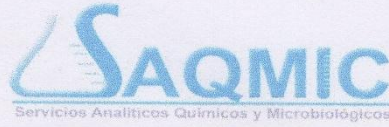


Salmonella gallinarum



Staphylococcus aureus

ANEXO 6. CUANTIFICACIÓN AZÚCARES



Contáctanos: 093387300 - 032924322 ó 0984648617 – 03360-260
Av. 11 de Noviembre y Milton Reyes
Riobamba – Ecuador

EXAMEN MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS

CÓDIGO: 34-14

CLIENTE: Srta. Lorena Morales

TIPO DE MUESTRA: Bebida fermentada a base de hongos.

FECHA DE RECEPCIÓN: 22 de enero del 2014

FECHA DE MUESTREO: 23 de enero de 2014

EXAMEN FÍSICO

COLOR: Amarillento

OLOR: Fermentativo

ASPECTO: Homogéneo, libre de material extraño.

DETERMINACIONES	UNIDADES	RESULTADO
Azucares Totales	%	7.27
Azucares Reductores	%	1.76

RESPONSABLES:

Dra. Gina Álvarez R.

Dra. Fabiola Villa

El informe sólo afecta a la muestra solicitada a ensayo; el informe no deberá reproducirse sino en su totalidad previo autorización de los responsables.

*La muestra es receptada en laboratorio.

ANEXO 7. NORMA NTE INEN. 2325: 2002

BEBIDAS ALCOHÓLICAS. CERVEZA. DETERMINACIÓN DEL pH.

ANEXO 8. NORMA NTE INEN 2323: 2002-12

BEBIDAS ALCOHÓLICAS. CERVEZA. DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ TOTAL.

ANEXO 9. NORMA NTE INEN 2322:2010

BEBIDAS ALCOHÓLICAS. CERVEZA. DETERMINACIÓN DE ALCOHOL

ANEXO 10. NORMA NTE. INEN 1529-5:2006

CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESOFILOS. RE

ANEXO 11. NORMA NTE. INEN 1529-7:1990

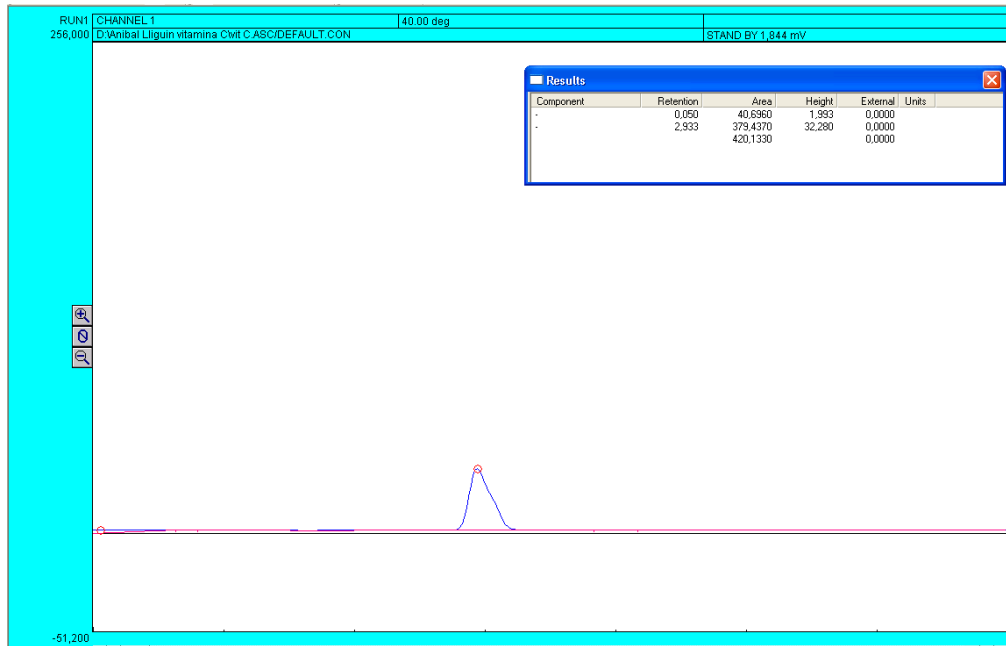
CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS COLIFORMES POR LA TÉCNICA DE RECuento DE COLONIAS.

ANEXO 12. NORMA NTE. INEN 1529 - 10:1998

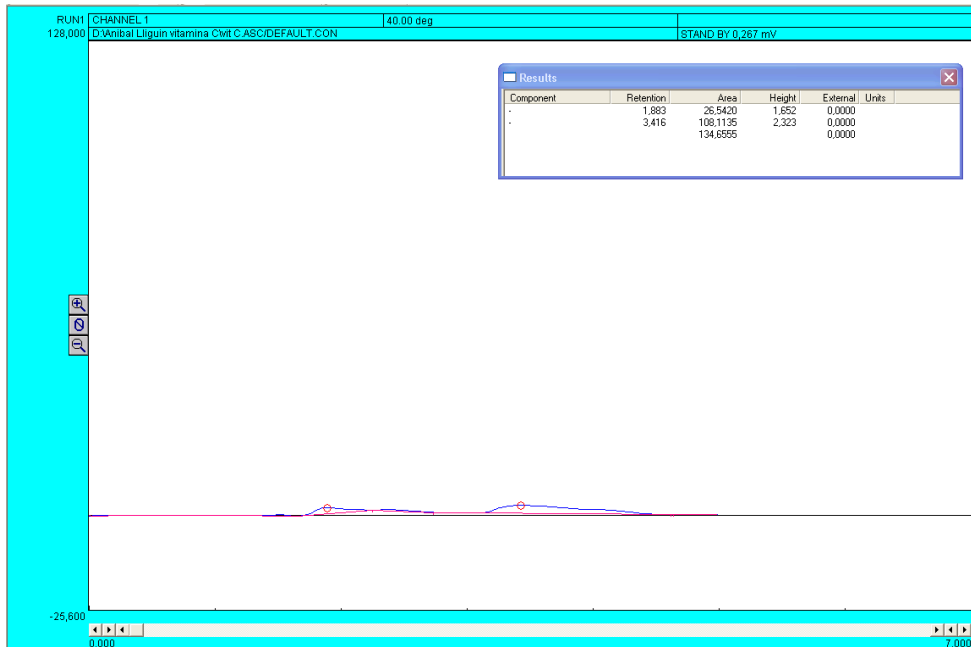
CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. MOHOS Y LEVADURAS VIABLES. RECuento EN PLACA POR SIEMBRA EN PROFUNDIDAD.

ANEXO 13.DETERMINACIÓN DE VITAMINA C POR HPLC

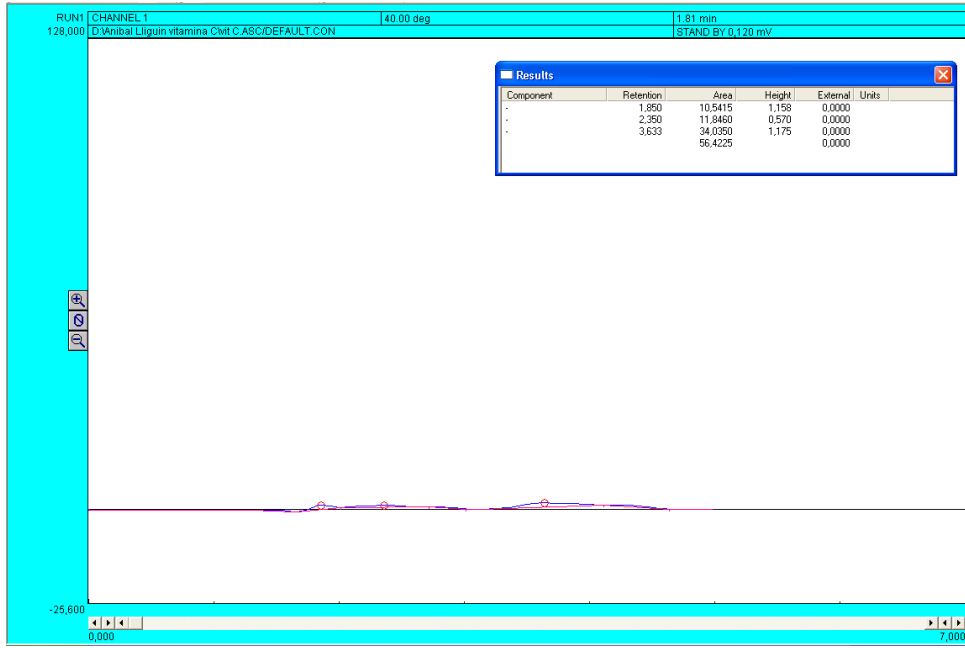
Lectura del Estándar de Vitamina C



VITAMINA C, MUESTRA 8



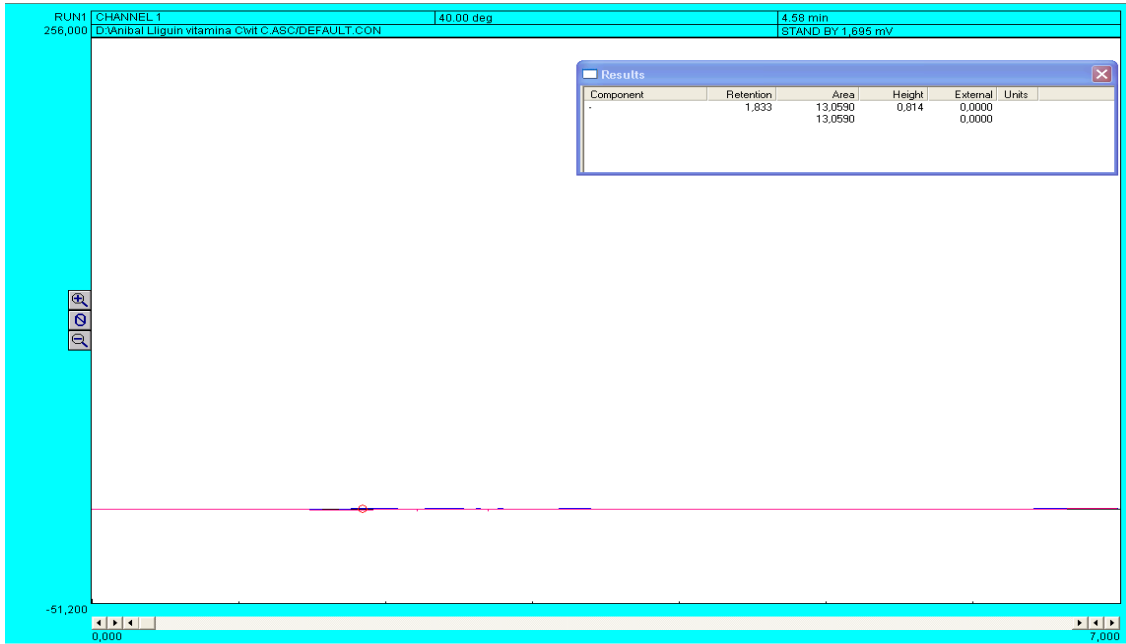
VITAMINA C, MUESTRA 2



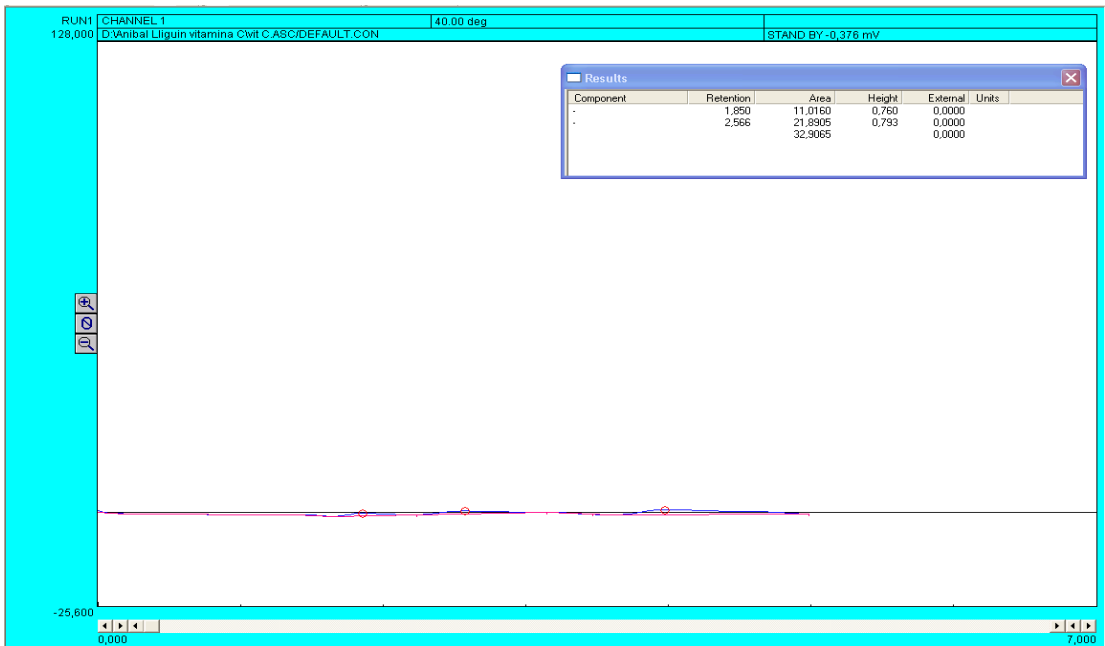
VITAMINA C, MUESTRA 3



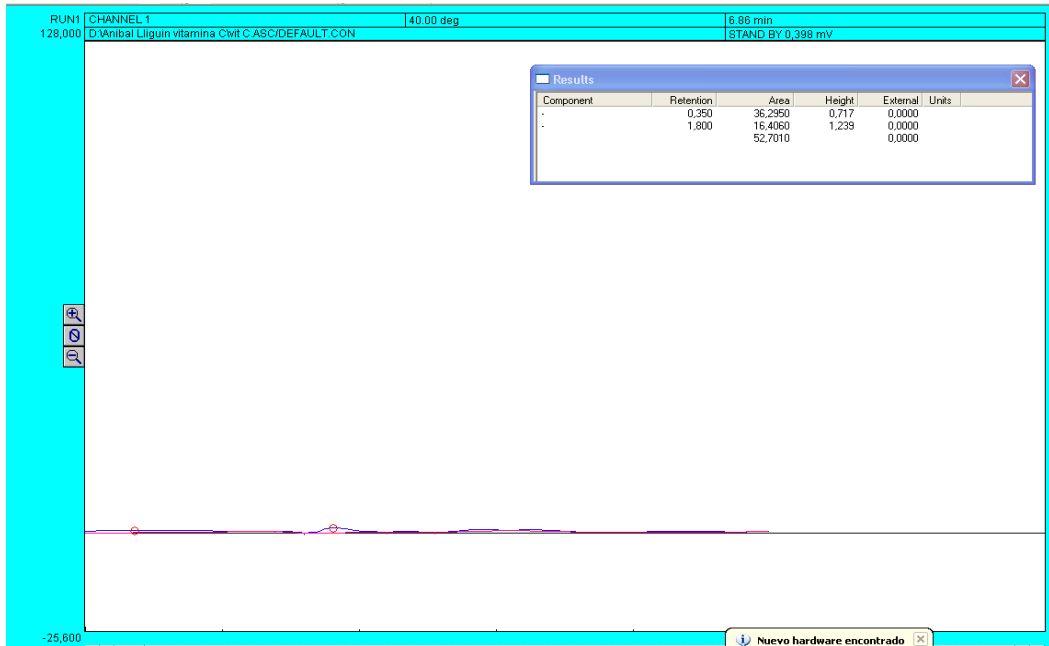
VITAMINA C, MUESTRA 4



VITAMINA C, MUESTRA 5



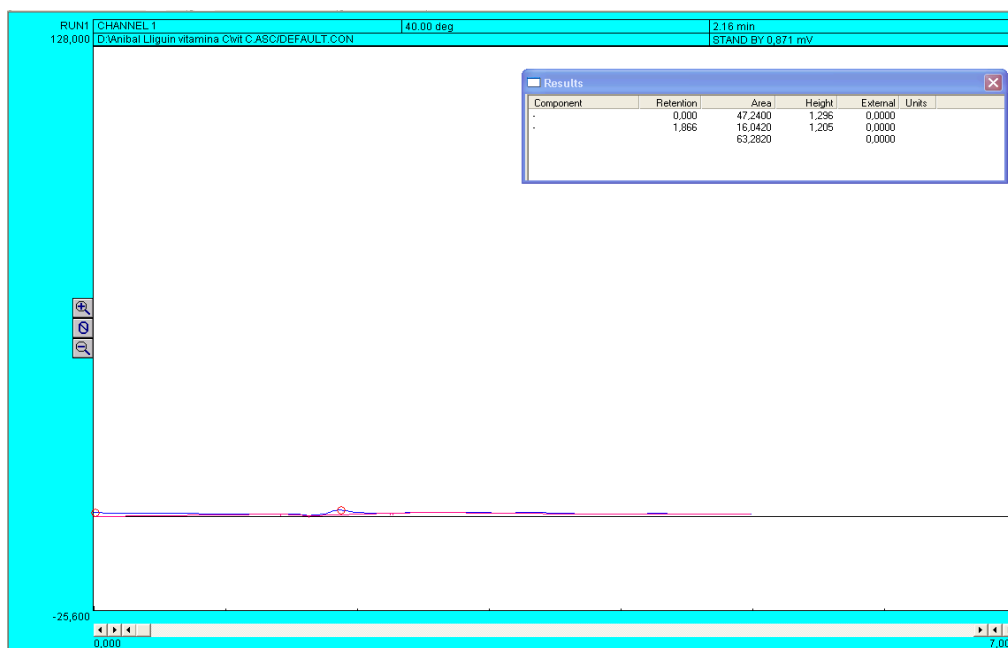
VITAMINA C, MUESTRA 6



VITAMINA C, MUESTRA 7



VITAMINA C, MUESTRA 8



ANEXO 13. ETIQUETA DEL PRODUCTO

