

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS BIOACTIVAS DE
CELULOSA MICROBIANA EN UN SUSTRATO DE MORINGA (*Moringa oleífera*) Y
RECUBRIMIENTOS DE MUCÍLAGO DE LINAZA (*Linum usitatissimum*)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN: INGENIERÍA EN BIOSISTEMAS**

PRESENTA

JUAN PABLO HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

General Escobedo, N.L.

Agosto del 2022

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS BIOACTIVAS DE
CELULOSA MICROBIANA EN UN SUSTRATO DE MORINGA (*Moringa oleífera*) Y
RECUBRIMIENTAS DE MUCÍLAGO DE LINAZA (*Linum usitatissimum*)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN: INGENIERÍA EN BIOSISTEMAS**

PRESENTA

JUAN PABLO HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

General Escobedo, N.L.

Agosto del 2022

**ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL
COMITÉ PARTICULAR COMO REQUISITO PARCIAL**

PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN: INGENIERÍA EN
BIOSISTEMAS**

COMITÉ PARTICULAR

Dra. Julia Mariana Márquez Reyes
Director

Dra. Mayra Zulema Treviño Garza
Asesor Auxiliar Co-Director

Dr. Celestino García Gómez
Asesor

Dr. Edgar Vladimir Gutiérrez Castorena
Asesor

Dra. Juanita Guadalupe Gutiérrez Soto
Subdirector de Estudios de Posgrado

DEDICATORIA

A mi familia, madre, padre, hermana y mis sobrinos

A mi mentora la doctora Julia Mariana Márquez

A aquellas personas que conocí en el camino y aportaron algo en mi vida para ser quien soy ahora

A mis amigas Ingrid que fueron importantes en la decisión de mi Maestría y me alentaron a continuar mis estudios

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradecer a mi familia por apoyarme en la realización de un posgrado, con su ánimo y buenos consejos para seguir adelante con mi formación académica.

A la doctora Mariana por creer en mi y apoyarme en la realización de mi maestría. Alentarme a ser autosuficiente en el laboratorio, aprender nuevas técnicas y querer saber más. Además de ser mi mentora en el área científica.

Amigas que conocí en el camino de la maestría que hicieron muy amena la maestría, aunque estuvimos en pandemia hubo solidaridad y buenos momentos.

A todo mi comité de tesis que me apoyaron con su ayuda en el proceso, aportando material, instalaciones y sobre todo su conocimiento.

A CONCAYT por la beca otorgada para seguir avanzando en mi formación profesional.

“Al menos que alguien como tú se
interese de verdad nuestro mundo no
va a cambiar”

-Dr. Seuss, The Lorax

INDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|-----|
| INDICE DE TABLAS..... | I |
| INDICE DE FIGURAS..... | II |
| INDICE DE ABREVIATURAS | III |
| RESUMEN..... | IV |
| ABSTRACT | VI |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. HIPOTESIS..... | 4 |
| 3. OBJETIVOS | 5 |
| 4. MARCO TEORICO..... | 6 |
| 4.1 Kombucha..... | 6 |
| 4.2 Fermentación | 7 |
| 4.2.1 Condiciones de fermentación..... | 7 |
| 4.2.2 Sustratos para la fermentación..... | 10 |
| 4.3 Componentes químicos producidos por kombucha..... | 12 |
| 4.3.1 Beneficios a la salud humana..... | 14 |
| 4.4 Diversidad microbiana | 15 |
| 4.4.1 Aislamiento de microorganismos en kombucha..... | 15 |
| 4.4.2 Identificación molecular | 15 |
| 4.4.3 Fuentes de carbono | 16 |
| 4.5 Celulosa bacteriana | 17 |
| 4.5.1 SCOBY..... | 18 |
| 4.5.2 Aplicaciones de la celulosa | 20 |
| 4.6 Moringa | 21 |
| 4.7 Linaza | 22 |
| 4.7.1 Mucílago de linaza | 23 |
| 4.8 Aditivos | 23 |
| 4.8.1 Alcohol polivinílico..... | 23 |
| 4.8.2 Glicerol..... | 24 |
| 4.8.3 Quitosano | 25 |
| 5. METODOLOGÍA | 26 |
| 5.1 Localización del experimento..... | 27 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 5.2 | Fase experimental 1: Obtención de los inóculos de trabajo | 27 |
| 5.2.1 | Consortrios de trabajo | 27 |
| 5.2.2 | Identificación molecular de los consorcios | 28 |
| 5.3 | Fase Experimental 2. Fermentación..... | 29 |
| 5.3.1 | Preparación del fermentado de moringa..... | 29 |
| 5.3.2 | Caracterización del fermentado de moringa..... | 30 |
| 5.4. | Fase Experimental 3. Biopelícula bioactiva | 36 |
| 5.4.1. | Extracción de mucílago de linaza | 36 |
| 5.4.2. | Elaboración de la biopelícula bioactiva: celulosa microbiana y mucílago de linaza 37 | |
| 5.4.3. | Caracterización de películas recubiertas con mucílago de linaza..... | 38 |
| 5.4.4. | Extracción y análisis de compuestos fenólicos de películas..... | 38 |
| 5.4.5. | Actividad antimicrobiana | 38 |
| 5.5. | Análisis estadístico..... | 39 |
| 6. | RESULTADOS Y DISCUSION..... | 40 |
| 6.1. | Fase 1. Identificación de consorcios y efecto de un fermentado de TM en cinco consorcios de kombucha | 40 |
| 6.1.1. | Identificación metagenómica | 40 |
| 6.1.2. | Caracterización de la fermentación y películas de kombucha en un medio de TM43 | |
| 6.2. | Fase 2. Comparación del efecto de la concentración de TM en dos consorcios | 53 |
| 6.2.1. | Caracterización del fermentado de dos consorcios de kombucha | 53 |
| 6.3. | Fase 3. Recubrimiento de películas con mucílago de linaza y análisis fisicoquímicos ... | 63 |
| 6.3.1. | Compuestos fenólicos y actividad antioxidante..... | 63 |
| 6.3.2. | Actividad antimicrobiana | 66 |
| 7. | CONCLUSIONES..... | 70 |
| 8. | RECOMENDACIONES | 72 |
| 9. | BIBLIOGRAFÍA..... | 73 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----------|
| Tabla 1. Sustratos utilizados para la producción de kombucha..... | 10 |
| Tabla 2. Composición química de kombucha | 12 |
| Tabla 3. Diferencias entre celulosa de SCOBY y celulosa bacteriana | 19 |
| Tabla 4. Grupos bacterianos asociados a la producción de biopolímeros | 43 |
| Tabla 5. Análisis fisicoquímicos y antioxidantes de un fermentado de kombucha en té verde (control) | 47 |
| Tabla 6. Características físicas de la celulosa bacteriana producida en un fermentado de TM | 51 |
| Tabla 7. Coordenadas CIE-L*a*b* de la celulosa producida en medio TM en los cinco consorcios de kombucha..... | 52 |
| Tabla 8. Opacidad de las películas de kombucha para los cinco consorcios | 53 |
| Tabla 9. Parámetros físicos de celulosa bacteriana en ambos consorcios en tres concentraciones de TM | 57 |
| Tabla 10. Coordenadas CIE-L*a*b* en celulosa bacteriana de dos consorcios de kombucha | 61 |
| Tabla 11. Valores de opacidad de la celulosa bacteriana de dos consorcios de kombucha | 62 |
| Tabla 12. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante en celulosa bacteriana recubierta con mucílago de linaza | 64 |
| Tabla 13. Actividad antimicrobiana de celulosa bacteriana recubierta con mucílago de linaza | 67 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| Figura 1. Material de Kombucha..... | 5 |
| Figura 2. Ruta metabólica en kombucha para la producción de celulosa bacteriana | 20 |
| Figura 3. Diagrama de la metodología empleada en la presente tesis | 26 |
| Figura 4. Consorcios de kombucha. De izquierda a derecha; CFM (a), CPN (b), CUV (c), CFR (d) y COR (e) | 28 |
| Figura 5. Infusión de tallo de moringa | 30 |
| Figura 6. Mucílago de linaza en húmedo (a) y seco (b) | 37 |
| Figura 7. Cepas de microorganismos patógenos. De izquierda a derecha Control, <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> y <i>Salmonella sp.</i> | 39 |
| Figura 8. Abundancia relativa de familias y géneros, detectada para los cinco consorcios analizados | 40 |
| Figura 9. Representación gráfica de los grupos taxonómicos más abundantes en los consorcios analizados. Los resultados corresponden a la abundancia relativa de los grupos, con respecto al grupo Bacteria. | 42 |
| Figura 10. Consorcios de kombucha en fermentación de TM | 44 |
| Figura 11. Caracterización del medio TM en los cinco consorcios, para la concentración de proteínas (a), concentración de azúcar en el medio (b), cambios de pH (c) y porcentaje de acidez en el medio (d). | 46 |
| Figura 12. Celulosa microbiana húmeda de los consorcios CFM, COR y CFR respectivamente (izquierda a derecha) | 48 |
| Figura 13. . Contenido de compuestos fenólicos (b) y actividad antioxidante (a) en fermentado de TM. | 50 |
| Figura 14. . Consorcio COR expuesto a diferentes concentraciones de TM en un tiempo de fermentación de 12 días | 55 |
| Figura 15. Caracterización de parámetros fisicoquímicos de la comparación de dos consorcios de kombucha. Cuantificación de proteínas (a), azúcares totales (b), pH (c) y acidez (c). | 56 |
| Figura 16. Consorcio CPN expuesto a diferentes concentraciones de TM en un tiempo de fermentación de 12 días | 58 |
| Figura 17. Contenido de compuestos fenólicos (a) y actividad antioxidante por DPPH (b), ABTS (c) y FRAP (d) en fermentado de TM a diferentes concentraciones..... | 59 |
| Figura 18. Películas de celulosa microbiana producidas en diferentes concentraciones de TM con dos consorcios..... | 62 |
| Figura 19. Películas de celulosa microbiana recubiertas con ML (a) y sin recubrir (b)..... | 65 |
| Figura 20. Ensayo antimicrobiano contra bacterias patógenas | 68 |

INDICE DE ABREVIATURAS

| | |
|------|---|
| A.A. | Actividad antioxidante |
| ABTS | Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico |
| AICC | Agar infusión corazón |
| CFM | Celulosa frambuesa |
| CFR | Celulosa frutos rojos |
| CM | Celulosa microbiana |
| CNS | Consortios |
| COR | Celulosa original |
| CPN | Celulosa piña |
| CUV | Celulosa uva |
| DPPH | 2,2-difenil-1-picrilhidrazil |
| FRAP | Ensayo de poder antioxidante reductor férrico |
| GAE | Equivalentes de ácido gálico |
| h | Horas |
| mg | Miligramos |
| ML | Mucílago de linaza |
| mL | Mililitros |
| RPH | Rendimiento peso húmedo |
| RPS | Rendimiento peso seco |
| TE | Equivalentes de Trolox |
| TM | Tallo de moringa |
| TPC | Contenido de fenoles totales |
| µg | Microgramos |
| µM | Micromolar |
| °C | Grados centígrados |

RESUMEN

La bebida kombucha es un producto de una fermentación realizada por un consorcio de microorganismos en una relación simbiótica, dentro de los cuales hay bacterias y levaduras, además de una fuente de carbono (sacarosa) y sustrato (té negro y té verde). En el presente proyecto se aislaron cinco consorcios microbianos provenientes de kombucha tanto comerciales como artesanales, las cuales se analizaron por metagenómica para obtener los géneros y abundancias relativas de las bacterias que conformaron los consorcios de trabajo. Las fermentaciones se realizaron utilizando el tallo de moringa (TM) para generar la infusión del fermentado, el cual fue caracterizado químicamente. La celulosa microbiana generada durante la fermentación fue caracterizada fisicoquímica y microbiológicamente. Los análisis metagenómicos identificaron una mayor prevalencia de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*.

En la primera fase experimental se realizó la comparación de los cinco consorcios y se obtuvo una relación directa en el crecimiento microbiano con respecto al consumo de azúcares, y aumento de acidez en el fermentado, lo cual se relaciona con la producción de ácidos orgánicos. Mientras que la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales fueron mayor en los consorcios COR y CPN y la mayor producción de celulosa microbiana fue para COR.

En la segunda fase del experimento se utilizaron los dos consorcios con mejores cualidades fisicoquímicas y de producción de celulosa, variando la concentración de tallo de moringa. Los resultados obtenidos no difieren entre ellos en los análisis de proteínas, pH, acidez y consumo de azúcares. En el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante difieren entre los consorcios, teniendo en CPN 266.45 ± 14.28 mg GAE/mL aumentando considerablemente

conforme hay un mayor contenido de tallo de moringa, siendo superior a COR. Para la actividad antioxidante son variables los valores respecto al análisis realizado, siendo más constante en ABTS en relación con lo obtenido en fenoles. La producción de celulosa se incrementó a mayor concentración de tallo de moringa (6 g), el cual puede contribuir a un aporte extra de azúcares al medio y en combinación con la diversidad microbiana del consorcio COR, lo hicieron idóneo para ser utilizado en la última fase experimental.

En la tercera fase experimental se evaluó el efecto de la celulosa microbiana generada, recubierta y no recubierta con mucílago de linaza contra microorganismos patógenos (*E. coli*, *S. aureus* y *Salmonella* sp.) y su actividad antioxidante. Se empleó etanol y metanol como medio de extracción de compuestos bioactivos de las películas. El contenido de fenoles totales tuvo un aumento en las películas con recubrimiento, la actividad antioxidante cuantificable varía dependiendo el disolvente a utilizar para la extracción de los compuestos. En FRAP la mayor actividad se cuantificó en las películas recubiertas. Por último, la actividad antimicrobiana demuestra que no hay efecto significativo en recubrir las películas con mucílago de linaza, teniendo mayores halos de inhibición en películas no recubiertas por los compuestos bioactivos que son adheridos debido al sustrato de tallo de moringa.

ABSTRACT

The kombucha beverage is a fermentation process carried out by a consortium of microorganisms in a symbiotic relationship, within which there are bacteria and yeasts in addition to a carbon source (sucrose) and substrate (black tea and green tea). In the present project, five microbial consortia were isolated from commercial and artisanal kombucha, which were analyzed by metagenomics to obtain the genera and relative abundances of the bacteria that formed the working consortia. The fermentations were carried out using the moringa stem to generate the fermented infusion, which was chemically characterized. The microbial cellulose generated during fermentation was chemically, microbially and physically characterized and coated with linseed mucilage. Metagenomic analyses identified a higher prevalence of the genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*.

In the first experimental phase, a comparison of the five consortia was made and a direct relationship was obtained in the microbial growth with respect to sugar consumption and increased acidity in the fermented product, which is related to the production of organic acids. The antioxidant activity and total phenol content were higher in the COR and CPN consortia, and the highest microbial cellulose production was for COR.

In the second phase of the experiment, the two consortia with the best physicochemical and cellulose production qualities were used, varying the concentration of moringa stem. The results obtained did not differ between them in the analysis of protein, pH, acidity and sugar consumption. In the content of total phenols and antioxidant activity differ between the consortia having in CPN 266.45 ± 14.28 mg GAE/mL increasing considerably as there is a higher content of moringa stem being superior to COR. For the antioxidant activity, the values are variable

with respect to the analysis performed, but being more constant in ABTS in relation to that obtained in phenols. Cellulose production increased at a higher concentration of moringa stalk (6 g), which can contribute an extra contribution of sugars to the medium and in combination with the microbial diversity of the COR consortium, made it suitable for use in the last experimental phase.

In the third experimental phase, the effect of microbial cellulose generated coated and uncoated with linseed mucilage against pathogenic microorganisms and its antioxidant activity was evaluated. Ethanol and methanol were used to extract bioactive compounds from the films. The content of total phenols increased in the coated films; the quantifiable antioxidant activity varied depending on the solvent used for the extraction of the compounds. In FRAP the highest activity was quantified in the coated films. Finally, the antimicrobial activity shows that there is no significant effect in coating the films with flaxseed mucilage having higher inhibition halos in uncoated films by the bioactive compounds that are attached due to the moringa stem substrate.

1. INTRODUCCIÓN

La necesidad de proveer nuevos materiales y tecnologías que no tengan un efecto negativo con el medio ambiente, además de ser económicas y mejorar las actuales, ha hecho que la celulosa microbiana sea investigada (Emiljanowicz & Malinowska-Pańczyk, 2019). Los residuos agroindustriales son un problema al generarse en grandes cantidades cada año, aunque se han implementado diferentes estrategias para disminuir su volumen, los procesos no aprovechan las propiedades de los residuos. El sustrato en kombucha es una variable que se estudia debido a su amplia adaptación y además los residuos vegetales pueden ser un buen candidato a utilizar por contener biomoléculas necesarias para la fermentación.

La bebida de kombucha, tiene como origen en el noroeste de China donde se utilizaba con fines medicinales por sus propiedades desintoxicantes y por aportar energía, en la cual se llega a generar dos productos de interés de investigación como lo es el fermentado y una celulosa microbiana (Coelho et al., 2020). La elaboración de la bebida kombucha se realiza mediante un proceso de fermentación por un consorcio de microorganismos en una relación simbiótica, dentro de los cuales hay bacterias y levaduras (Teoh et al., 2004), los géneros más representativos en bacterias son *Acetobacter*, *Gluconobacter* y *Lactobacillus* (Marsh et al., 2014). En levaduras el género que predomina es el género *Zygosaccharomyces* (Coelho et al., 2020; Marsh et al., 2014). Kombucha contiene propiedades benéficas a la salud como antioxidante, antiinflamatorio, antitumoral, efecto hipocolesterolémico, antihipertensivo, hipoglucemiante, antimicrobiano, antiviral, desintoxicante, entre otros (Morales, 2020).

La celulosa microbiana es un polímero de características similares a las encontradas en la celulosa vegetal, difiriendo en fibras y pureza, destacando mayor resistencia mecánica,

cristalinidad e hidrofilia (Ramírez Tapias et al., 2020). El uso del biopolímero se ha investigado y se utiliza como material en el área de nanotecnología, biomedicina e industria alimentaria, cumpliendo su función como biomaterial (Neera et al., 2015).

La producción de kombucha se ha evaluado en diferentes sustratos con el propósito de mejorar la calidad y características al sustituir el sustrato tradicional, para lo cual se han utilizado sustratos tales como Coca-Cola, vino tinto, vino blanco, vinagre, extracto de alcachofa de Jerusalén, leche, suero dulce fresco, suero dulce reconstituido, suero ácido, equinácea, menta, entre otros (Jayabalan, et al., 2014).

La moringa se ha utilizado como sustrato para la producción de kombucha debido a que es una de las plantas medicinales con mayores atribuciones benéficas para la salud humana por su capacidad antiinflamatoria, reductor de niveles de colesterol, antioxidante, laxante, entre otros (Abdull, Ibrahim, & Kntayya, 2014). El uso de moringa se extiende a todas las partes que puede producir la planta como las hojas, raíz, corteza, frutos (vainas), flores, semillas y aceite de semillas, siendo las hojas las más investigadas como sustrato. Pero el tallo es otro material de la moringa considerado un residuo agroindustrial desaprovechado, aunque se han investigado su composición fisicoquímica como el contenido de azúcares, fenoles, actividad antioxidante y proteínas (Anwar et al., 2006).

La investigación de la celulosa bacteriana se orienta a mejorar sus características mediante el recubrimiento o combinación con otros aditivos. La combinación de las películas de kombucha con recubrimientos como el quitosano parecen mejorar las características físicas y antimicrobianas, además de ser un material con características eco-amigables (Ashrafi et al., 2018).

El mucílago de linaza (ML) es un disacárido compuesto de xilosa y ramnosa en disolución llega a formarse un coloidal soluble y es viscoso. En investigaciones se usa con el propósito de ser un material que provee características físicas de durabilidad y elasticidad a matrices químicas y biológicas (Rodrigues et al., 2018; Treviño-Garza et al., 2019).

2. HIPOTESIS

La celulosa bacteriana producida en un medio a base de tallo de moringa y recubierta con mucílago de linaza generará biopelículas con mayor actividad antioxidante y antimicrobiana.

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Obtener y caracterizar una película bioactiva de celulosa microbiana en un medio de fermentación con sustrato de tallo de moringa (*Moringa oleífera*) y recubiertas de mucílago de linaza (*Linum usitatissimum*).

Objetivos específicos

- Identificar los géneros predominantes de bacterias en los cinco consorcios microbianos de kombucha.
- Analizar las propiedades químicas de la fermentación de kombucha en los cinco consorcios microbianos.
- Evaluar el efecto de la concentración del tallo de moringa en la fermentación y su relación con la producción de antioxidantes y celulosa microbiana utilizando dos consorcios microbianos.
- Comparar el efecto antioxidante, antimicrobiano y las características fisicoquímicas en las películas de celulosa microbiana y recubiertas con mucílago de linaza.

4. MARCO TEORICO

4.1 Kombucha

La kombucha es una bebida fermentada popular debido a sus atribuciones saludables. Las bacterias y levaduras presentes en el medio crean una relación simbiótica, la fermentación se compone de dos fases: celulosa bacteriana y una fase líquida ácida. El ácido acético, el ácido glucónico y el etanol son los componentes principales del producto final de la fermentación, además de la película por sus características físico-mecánicas. En condiciones aeróbicas, el consorcio simbiótico de kombucha es capaz de convertir azúcar y té en un período de 7 a 10 días en una bebida, ligeramente ácida y carbonatada, que se compone de varios ácidos, 14 aminoácidos, vitaminas y algunas enzimas hidrolíticas (Villarreal-Soto et al., 2018).



Figura 1. Material de Kombucha

El origen de kombucha se remonta desde el año 220 a. de C. en Manchuria durante la dinastía Tsin. Las primeras menciones de la kombucha como algún brebaje curativo fueron durante el año 414 A.C. puesto que durante ese año el Dr. Kombu llevo a Japón la bebida para tratar los problemas gastrointestinales del emperador Ingyō Tennō, e (Iliana, 2007). Se cree que la kombucha se hizo conocida por el mundo a través de los distintos viajeros realizados a Asia, y empezaron a esparcirla por Rusia y Europa. Durante la segunda guerra mundial la bebida se introdujo en Alemania y posteriormente llego a Francia en la década de 1950, pero debido a su popularidad disminuyo la cantidad de hojas de té por lo cual se dejó de consumir. El último hecho histórico que hizo resurgir y popularizar la kombucha fue por investigadores suizos, que comprobaron la presencia de bacterias benéficas para el intestino por el consumo de kombucha con yogur argumentando, posteriormente a esto la kombucha fue objetivo de diversas investigaciones con aumento en su popularidad alrededor del mundo (Coelho et al., 2020).

Estudios recientes han demostrado que la kombucha presenta propiedades que benefician a la salud y funge como antibiótico natural, mantiene el pH, así como su capacidad para reparar daños causados por el ambiente como el tricloroetileno que induce estrés oxidativo (Kiple & Ornelas, 2000).

4.2 Fermentación

4.2.1 Condiciones de fermentación

4.2.1.1 Temperatura

Uno de los principales factores a considerar en la fermentación de kombucha es la temperatura, el cual requiere mantener una temperatura óptima para el crecimiento microbiano, la actividad enzimática y la producción de celulosa bacteriana. (Villarreal-soto et al., 2018). La

constante búsqueda por una temperatura adecuada para el desarrollo del biopolímero ha generado diversas investigaciones, como lo mencionado por Carreño et al., (2012) que indican una temperatura óptima para la máxima producción de celulosa de 30 °C. En temperaturas de 25 °C y 35 °C existe producción de celulosa, pero en menor cantidad. Por último, a 40 °C se inhibe el crecimiento microbiano y por ende la producción de celulosa. En otro estudio se evaluaron temperaturas de 20 y 30 °C para aumentar el contenido de ácidos orgánicos, en el cual se encontró que este factor es importante para el crecimiento del microbiota seleccionado que promueve la producción de los ácidos orgánicos. Determinar la temperatura adecuada para la producción de metabolitos de interés en la salud pública es relevante debido a que gran cantidad de ellos son generados por la actividad de los microorganismos. (de Filippis et al., 2018).

4.2.1.2 pH

El pH en la fermentación de kombucha se relaciona estrechamente con la producción de ácidos orgánicos y el crecimiento microbiano. La presencia de bacterias ácido acéticas y otras en kombucha cambian el pH de la fermentación, su crecimiento se encuentra dentro del rango de 5 a 6.5 (Gomes et al., 2018). A pesar de esto, las bacterias ácido acéticas tienen la capacidad de crecer en condiciones de pH menores, en kombucha el pH llega a disminuir hasta 2 y es constante durante la fermentación (Jayabalan et al., 2014). Con el uso de diferentes sustratos de plantas medicinales, como la rósela, mangostino, guanábana y otros, se ha visto que el pH es difícil de controlar y por lo cual varía dependiendo del sustrato, y el aumento de este se atribuye a la producción de ácidos orgánicos, catequinas y proteínas producidas durante la fermentación (Primiani et al., 2018).

4.2.1.3 Tiempo de fermentación

El lapso de fermentación de kombucha en promedio es de 12 días, sin embargo, se ha observado que se puede prologarse hasta 40 días. Para la óptima producción de kombucha se mencionan 15 días (Chu & Chen, 2006), aunque se ha demostrado que en periodos cortos de tiempo se obtiene una bebida fermentada con mejor sabor, por lo contrario, al aumentar el tiempo se generan más ácidos orgánicos en el fermentado y se aumentan las propiedades antioxidantes (Villareal-Soto et al., 2018). Si se desea resaltar alguna propiedad específica de la bebida, es importante seleccionar adecuadamente el periodo de fermentación. En investigaciones donde se deseaba un incremento en la producción de polifenoles, los cuales están involucrados en la capacidad antioxidante, se han determinado en periodos entre 14 y 21 días e incluso hasta 28 días dependiendo del sustrato utilizado (Ziemlewska et al., 2021; Zofia et al., 2020).

4.2.1.4 Biorreactor

Dentro de la producción de celulosa bacteriana, las técnicas de fermentación más utilizadas son las conocidas como cultivos estáticos y en agitación; de las cuales se llegan a obtener celulosa con morfologías diferentes.

El cultivo estático se caracteriza por obtener celulosa en forma de gel. La fermentación de esta técnica comienza con el incremento de la población de microorganismos gracias al consumo de oxígeno disuelto que se encuentra en el medio de cultivo. Al paso del tiempo, los microorganismos comienzan a sintetizar celulosa, hasta que el espesor de la película se incrementa por la generación de diversas capas en la superficie. A pesar de ser una técnica

sencilla, su principal inconveniente es la necesidad de tiempos largos y una gran área superficial, haciéndola una técnica no recomendada para uso a gran escala.

El cultivo agitado se caracteriza por generar pellets de celulosa o aglomeraciones amorfas de las fibras; Esto depende del tipo de reactor y condiciones de operación utilizadas. La técnica tiene el mismo principio que el cultivo estático, sin embargo, suele realizarse de forma continua o por lotes en reactores de tanque agitado o airlift. En la actualidad, el método se investiga con miras de poder ser escalable, no obstante, existen diversos factores que impiden la baja productividad (debido a que la agitación favorece el crecimiento de células no productoras del polímero que compiten por el consumo de sustrato) y la habilidad de las células bacterianas para convertir la glucosa en ácidos glucónico y cetoglucónico (acción que llega a perjudicar el rendimiento de generación de celulosa) (Carreño et al., 2012).

Además, se ha encontrado que los parámetros del recipiente influyen en la producción de kombucha como lo menciona Villarreal-Soto et al., (2019), donde utilizaron dos recipientes con misma altura y diferente diámetro, observando el incremento de la producción de la celulosa bacteriana hasta 10% de las bacterias por acelerar la cinética de crecimiento y mejorando la producción de metabolitos implicados en la actividad antiinflamatoria y contra la proliferación de células cancerígenas.

4.2.2 Sustratos para la fermentación

El principal sustrato empleado en la fermentación de kombucha proviene de la planta del té (*Camellia sinensis*), siendo dos de sus derivados los más usados en este proceso es el caso del té negro y té verde (Battikh et al., 2012).

El té negro se produce al dejar expuestas al aire las hojas, posteriormente secar para inhibir reacciones enzimáticas. El contenido de polifenoles en este tipo de té es un factor que influye su uso en kombucha en conjunto a tener un sabor dulce (Greenwalt et al., 2000). Los componentes principales que se pueden encontrar en el té negro son los polifenoles, catequinas, teaflavinas, arubiginas, flavonoides, cafeína, ácidos fenólicos, aminoácidos, galatos de catequinas, metilxantinas, carbohidratos, proteínas, materia mineral y volátiles (Luczaj & Skrzydlewska, 2005).

El té verde se calienta para prevenir cualquier oxidación enzimática. Una ventaja en comparación al té negro es una mayor estimulación en la fermentación de la kombucha, acortando tiempos de fermentación (Greenwalt et al., 2000). En el té verde se pueden encontrar polifenoles (catequinas y ácido gálico), galatos de catequinas, carotenoides, tocoferoles, ácido ascórbico (vitamina C), minerales y ciertos compuestos fitoquímicos (Cabrera et al., 2006).

Sin embargo, existen estudios los cuales han investigado nuevos sustratos derivados de plantas medicinales y subproductos agroalimentarios para la producción de kombucha como los mencionados en la Tabla 1.

Tabla 1. Sustratos utilizados para la producción de kombucha

| Sustrato | Referencia |
|----------------------------|-------------------------|
| Rósela | Primiani et al., 2018 |
| Mangostino | Primiani et al., 2018 |
| Guanábana | Primiani et al., 2018 |
| Papaya | Sharifudin et al., 2021 |
| Yerba mate | Ziemlewska et al., 2021 |
| Hierba de trigo y té negro | Sun et al., 2015 |
| Milenrama | Vitas et al., 2018 |

4.3 Componentes químicos producidos por kombucha

Los componentes químicos que comprenden la kombucha son variables que dependen de los microorganismos utilizados en la fermentación, el tipo de sustrato, tiempo de fermentación, temperatura y fuente de carbono. Los principales metabolitos (Tabla 2) que se encuentran en su composición son los polifenoles, ácidos orgánicos en los cuales están el ácido acético, ácido glucónico, y ácido glucurónico, además de ácido cítrico, ácido láctico, ácido málico, ácido tartárico, ácido malónico, ácido oxálico, succinato, piruvato y ácido usnico, azúcar, vitaminas B₁, B₂, B₆, B₁₂ y C, aminoácidos como isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, valina y triptófano, purinas, pigmentos, lípidos, proteínas, enzimas hidrolíticas, etanol, CO₂, minerales como el manganeso, hierro, níquel y otros, aniones como sulfato, fosfato, fluoruro, cloruro, entre otros y por último metabolitos producto de las levaduras (Martínez et al., 2018).

Cada uno de los compuestos se ven involucrados en las propiedades benéficas de la kombucha por lo cual llega a variar su concentración dependiendo las bacterias involucradas y otros factores externos.

Tabla 2. Composición química de kombucha

| | Compuesto | Medida de composición | Sacarosa inicial | Periodo de fermentación | Referencia |
|-----------------------------|---|------------------------------------|------------------|-------------------------|---|
| Ácidos orgánicos | Ácido acético | 5.6 g/L | 70 g/L | 15 | Blanc, 1996 |
| | Ácido acético | 8.36 g/L | 100 g/L | 18 | Jayabalan et al., 2007 |
| | Ácido acético | 11 g/L | 100 g/L | 30 | Chen & Liu, 2000 |
| | Ácido glucónico | 39 g/L | 100 g/L | 60 | Chen & Liu, 2000 |
| | Ácido glucónico | 0.0160 g/L | 70 g/L | 21 | Lončar et al., 2006 |
| | Ácido láctico | 0.18 g/L | 100 g/L | 18 | Jayabalan et al., 2007 |
| Vitaminas | Vitamina B ₁ | 0.74 mg/L | 70 g/L | 15 | Bauer-Petrovska & Petrushevska-Tozi, 2000 |
| | Vitamina B ₂ | 8 mg/100 mL | 70 g/L | 10 | Malbaša et al., 2011 |
| | Vitamina B ₆ | 0.52 mg/L | 70 g/L | 15 | Bauer-Petrovska & Petrushevska-Tozi, 2000 |
| | Vitamina B ₁₂ | 0.84 mg/L | 70 g/L | 15 | Bauer-Petrovska & Petrushevska-Tozi, 2000 |
| | Vitamina C | 25 mg/L | | 10 | Malbaša et al., 2011 |
| Compuestos generales | Etanol | 5.5 g/L | 100 g/L | 20 | Chen & Liu, 2000 |
| | Proteínas | 3 mg/L | 100 g/L | 12 | Chu & Chen, 2006 |
| | Polifenoles | 7.8 mM (equivalentes ácido gálico) | 100 g/L | 15 | Jayabalan et al., 2007 |
| Minerales | Cu, Fe, Mn, Ni, Zn | 0.1 a 0.4 µg/mL | 70 g/L | 15 | Bauer-Petrovska & Petrushevska-Tozi, 2000 |
| Aniones | F ⁻ , Cl ⁻ , Br ⁻ , I ⁻ , NO ₃ ⁻ , HPO ₄ ⁻ , SO ₄ ⁻ | 0.04 a 3.20 mg/g | 100 g/L | 7 | Kumar & Joshi, 2016 |

Fuente: Tran et al., 2020

4.3.1 Beneficios a la salud humana

Los beneficios atribuidos a la bebida kombucha y por los cuales se ha convertido tan popular en los últimos tiempos, es por su actividad antimicrobiana, antioxidante, como agente hepatoprotector, que ayuda en el tratamiento del cáncer, propiedades antitumorales, por mencionar algunos.

La actividad microbiana se ha investigado y relacionado con los compuestos como el ácido acético (Battikh et al., 2012), debido a que es conocido que funciona como un inhibidor y destruye una gran cantidad de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Sreeramulu et al., 2000). Se ha reportado inhibición de los microorganismos *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* serotipo *Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Jayabalan et al., 2014) que han sido expuestos a kombucha.

Kombucha también ha sido asociado como antioxidante, los cuales se originan en las hojas del té, los compuestos involucrados principalmente son polifenoles (catequinas), metabolitos como la vitamina C, B₂, B₆ y catalasa, que pueden actuar en sinergia con antioxidantes como ácido cítrico (Malbaša et al., 2011). los compuestos antioxidantes presentes en kombucha promueven una prevención de cáncer (Jayabalan et al., 2008). Las moléculas más involucradas en la prevención son los polifenoles, los mecanismos que realizan estas moléculas contra el cáncer son: generar menor mutación genética, inhibición de células cancerosas y terminación de la metástasis (Jayabalan et al., 2014).

4.4 Diversidad microbiana

4.4.1 Aislamiento de microorganismos en kombucha

Kombucha es conformada por diversos microorganismos, bacterias y levaduras, que son aisladas e identificadas con la finalidad de mejorar el producto final. El aislamiento de los microorganismos se puede dividir en dos partes debido a los microorganismos relacionados con la fermentación (bacterias y levaduras), para aislar las bacterias se utiliza caldo de extracto de levadura con glucosa, con esto se separa las bacterias de las levaduras, y posteriormente se identifican las bacterias ácido-acéticas involucradas, en un medio selectivo (medio con glucosa-etanol). Por otro lado, las levaduras se aíslan usando un medio Sabouraud dextrosa (Mukadam et al., 2016).

Las principales cepas bacterianas identificadas en kombucha son *Acetobacter xylinoides*, *Komagataeibacter xylinus*, *Gluconacetobacter xylinus*, *Acetobacter aceti* y *Acetobacter pasteurianus*; y de levaduras, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces lambicus*, *Brettanomyces custersii*, *Candida* y *Pichia* (Dutta & Paul, 2019).

4.4.2 Identificación molecular

En kombucha al ser un consorcio de diversos microorganismos es difícil identificarlos por técnicas tradicionales, siendo conveniente utilizar la secuenciación de microorganismos conocidos mediante la técnica de metagenómica (Garlapati et al., 2019). Esta implica muestrear las secuencias del genoma de una comunidad de organismos que habitan un entorno común, con lo cual se pretende conocer que microorganismos hay en un consorcio comunidad.

Implementado a finales de 1970, la secuenciación de virus y microorganismos pretendía fuera un método para encontrar genes involucrados en características funcionales o evolutivas. Posteriormente, fue reemplazada por la técnica de secuenciación “shot gun” (Hugenholtz & Tyson, 2008).

En diversos estudios se utiliza este tipo de técnicas por sus ventajas al ser precisa en la identificación, reducción de costos y aumento del rendimiento (Arikan et al., 2020; Kaashyap et al., 2021; Góes-Neto et al., 2021; Villarreal-Soto et al., 2020). Usando cebadores que están dirigidos al gen de ARN ribosomal 16S y ADN fúngico de la región del rADN del espaciador transcrito interno variable (ITS)-1 (Marsh et al., 2014). Aunque la identificación de kombucha con técnicas de secuenciación de siguiente generación (NGS) son las más empleadas, esta no permite la caracterización funcional de los microorganismos, por lo cual se ha implementado la técnica “shotgun de genoma completo” (WMS) evitando errores como el sesgo en la PCR y recuperación de genomas microbianos. En conjunto con los avances en bioinformática se han implementado nuevos programas para analizar datos provenientes de WMS (Arikan et al., 2020).

4.4.3 Fuentes de carbono

La principal fuente de carbono en la fermentación de kombucha es la glucosa, que funciona como principal metabolito involucrado en la producción de celulosa bacteriana. Esta son biomoléculas formadas por aldehídos, cetonas y grupos hidroxilos, $(CH_2O)_n$ y se clasifican como monosacáridos, disacáridos y polisacáridos, siendo los primeros componentes básicos de la química de los carbohidratos. Teniendo como los azúcares comunes glucosa, fructosa,

galactosa, maltosa y lactosa. En kombucha se ha demostrado que la fuente de carbono influye en la formación en diferentes proporciones de etanol y ácido láctico, (Malbaša et al., 2008).

Las principales fuentes de carbono son (Zaitoun et al., 2018):

- **Glucosa:** es una aldohexosa ($C_6H_{12}O_6$) conteniendo un grupo aldehído y seis de carbono. La importancia de la glucosa reside en que es la principal fuente de energía para el metabolismo celular del cuerpo humano.
- **Fructuosa:** es una hexosa monosacárido que se compone de una forma de cadena lineal no cíclica y el compuesto tiene un grupo cetona en el carbono 2 de la cadena, por lo que hay dos enantiómeros de fructosa L- y D-formas, siendo la D-fructuosa la presente en la naturaleza.
- **Galactosa:** es una hexosa y es un componente importante en el disacárido de lactosa que se encuentra presente en la leche. Es la principal fuente de energía en el metabolismo celular.
- **Sacarosa:** disacárido simple formado por la adición de glucosa y fructosa. Es el azúcar más abundante encontrado en diferentes alimentos.

4.5 Celulosa bacteriana

La celulosa bacteriana es un polímero obtenido por fermentación con microorganismos de los géneros *Acetobacter*, *Rhizobium* y *Agrobacterium*, de las cuales la especie más eficiente es la *Acetobacter Xylinum* produciendo su máximo en el rango 25°C a 30°C y un pH de 4.5 a 7.5. Este polímero presenta la misma estructura química de la celulosa de origen vegetal, pero se diferencia en su conformación y propiedades fisicoquímicas. La celulosa se produce a partir de fuentes de carbono como glucosa, sacarosa, glicerol, manitol o arabitol (Suhas et al., 2016).

La celulosa bacteriana posee propiedades físicas y mecánicas inherentes, superiores a la celulosa vegetal como transparencia, flexibilidad, alta capacidad de retención de agua, pureza, permeabilidad de gases y líquida, alta en nonoporos, biodegradable, alta fuerza mecánica, moldeabilidad y estabilidad termoquímica, alta cristalinidad, hidrofiliidad, entre otras (Hussain et al, 2019).

La celulosa es un homopolímero con fórmula molecular $(C_6H_{10}O_5)_n$ compuesto por unidades de glucosa. Las cuales se combinan mediante enlaces β -(1-4)-glucosídicos para formar un dímero conocido como celobiosa, que es una unidad fundamental de la celulosa, unidos por enlaces glucosídicos. Las unidades de glucosa se combinan por enlaces covalentes entre el grupo OH ecuatorial de C-4 de una unidad de glucosa y el átomo de carbono C-1 de la siguiente unidad de glucosa para formar celulosa que se caracterizan por sus propiedades como biodegradabilidad, quiralidad y amplia capacidad de modificación química (Pichet et al., 2017; Hussain et al, 2019).

4.5.1 SCOBY

El SCOBY (Consorcio simbiótico de bacterias y levaduras, por sus siglas en inglés) dentro de kombucha es un sistema microecológico compuesto de bacterias del ácido acético, levadura, bacterias ácido-lácticas y muchos ingredientes activos funcionales, incluidos el ácido fenólico, las vitaminas y metabolitos secundarios, que se producen con base a los sustratos aditivos (Zhang et al., 2020).

El SCOBY es un producto secundario en la fermentación de kombucha también llamado celulosa bacteriana, producida principalmente por bacterias *Acetobacter* (Tabla 3). En diversos

estudios se ha buscado una aplicación para el SCOBY tratándolo como material en diferentes campos de tecnología como preparación de biomateriales, industria textil, biotecnología ambiental y en la industria alimentaria por mencionar algunas. Aunque la producción industrial del SCOBY aún se continúa investigado para optimizar las variables a considerar y explorar el potencial que podría ofrecer como un biomaterial (Laavanya et al., 2021).

Tabla 3. Diferencias entre celulosa de SCOBY y celulosa bacteriana.

| No. | Variable | Celulosa bacteriana | SCOBY |
|-----|----------------------|--|---|
| 1 | Población microbiana | Producida por un microorganismo o un consorcio | Producida por un consorcio de bacterias y levaduras (SCOBY). |
| 2 | Costo | Costosa de producir por los medios de cultivo | Costo moderado |
| 3 | Medio de cultivo | Medio Hestrin-Schramm y algunos otros componentes para eficientizar la producción. | Mezcla de té endulzado Plantas medicinales Residuos alimentarios |
| 4 | Fuente de carbono | Glucosa | Principalmente sacarosa, pero puede convertir cualquier fuente de carbono debido a las bacterias y levaduras. |
| 5 | Biorreactores | Reactores airlift de circuito interno Reactores giratorios para | Recipientes de plástico o vidrio. |

Fuente: Laavanya et al., 2021

La producción de SCOBY se debe a la síntesis de celulosa por parte de las bacterias involucradas que se realiza en dos etapas: la conversión de azúcares y la polimerización (Figura 2). Dentro de la primera etapa, las bacterias convierten la fuente de carbono, que funge como sustrato, en glucosa-6-fosfato por la enzima glucoquinasa. Después esta molécula es transformada en glucosa-1-fosfato por la acción de la fosfoglucomutasa. Seguido de esto, la glucosa-1-fosfato pasara a UDP-glucosa, transformación realizada por la enzima UDPG pirofosforilasa; la obtención de esta molécula es de suma importancia debido a que es el

precursor de la segunda etapa de la síntesis. Una vez obtenida la UDP-glucosa se da comienzo al proceso de polimerización, donde la enzima celulosa sintasa la transforma en celulosa. A pesar de ya tener la celulosa, aquí no termina el proceso ya que aún es necesaria su excreción al medio de cultivo (Laureys et al., 2020).

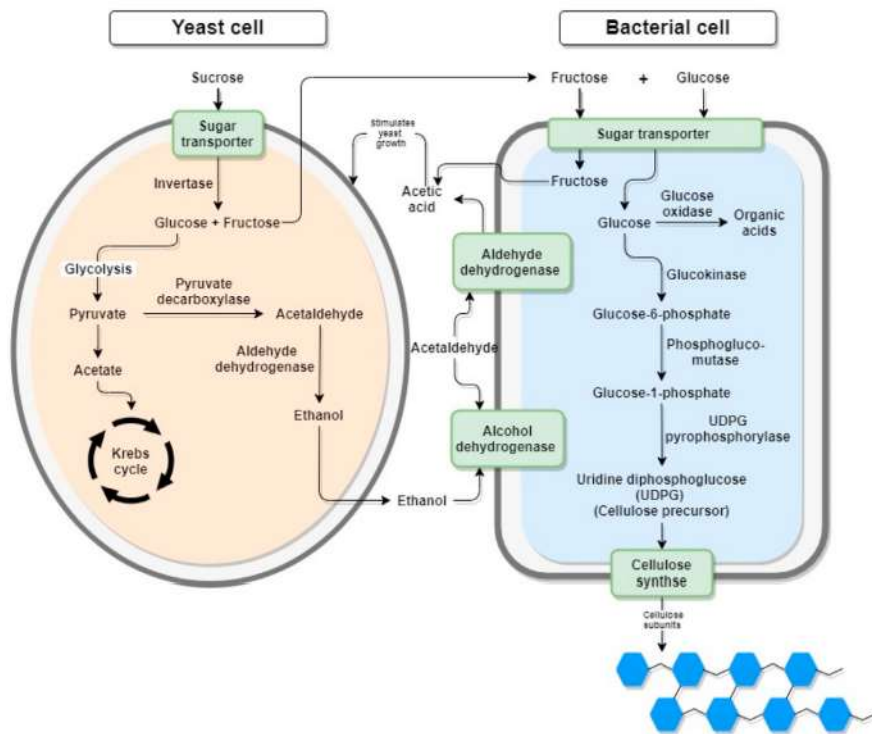


Figura 2. Ruta metabólica en kombucha para la producción de celulosa bacteriana (Laavanya et al., 2021).

4.5.2 Aplicaciones de la celulosa

La celulosa bacteriana se ha utilizado en diversas áreas en las cuales destaca la electrónica (batería de flujo redox y para conductividad eléctrica), biomedicina (nanofilm, en ingeniería de tejido de hueso, apósito antimicrobiano, otros) y la alimenticia (empaques para preservar comida) (Esa et al., 2014).

En la industria de la moda se ha investigado el uso del SCOBY como sustituto de materiales textiles, por las características del material como alta elasticidad en húmedo y un color agradable para esta industria. Los factores más importantes para generar este producto de manera homogénea y regular es el control de la temperatura y la fuente de carbono, y al no tener un control en ellos es difícil que se conserven las características físicas similares de estructura uniforme, espesor constante, porosidad y otros parámetros mecánicos (Domskiene et al., 2019).

Otra de las aplicaciones que se le han encontrado al SCOBY es como material biodegradable de empaque de alimentos, principalmente frutas o vegetales, colocándolos en bolsas elaboradas con SCOBY la cual evitó la contaminación y el degradado de los vegetales, además de la degradación fácil del biomaterial, mostrando su potencial uso como sustituto a las bolsas de plástico. El biomaterial aún tiene algunas desventajas como la capacidad de absorber humedad y su drástico cambio al ser secado, las cuales se encuentran investigando para ampliar sus aplicaciones (Aduri et al., 2019).

Por último, en el área biomédica se emplea en la ingeniería de tejidos, en vendajes de heridas, cartílago artificial, regeneración ósea, injertos vasculares o implementados en la formación de conductos nerviosos, obteniendo resultados positivos por su compatibilidad con el receptor y nula presencia de toxicidad en los parámetros histológicos y hematológicos (Zhu et al., 2013).

4.6 Moringa

Moringa oleifera es un árbol que crece en países tropicales y subtropicales. Se cultiva comercialmente en India, África, América del Sur y Central, México, Hawai y en toda Asia y el

sudeste asiático. La moringa se ha utilizado ampliamente por sus propiedades benéficas a la salud, cada parte de la moringa (semillas, hojas, aceite, savia, corteza, raíces y flores) es utilizada para un fin específico. Además, se llega a consumir por su alto contenido nutricional, que contiene vitaminas, minerales, aminoácidos y ácidos grasos (Stohs & Hartman, 2015).

Tiene compuestos antioxidantes como ácido ascórbico, flavonoides, fenólicos y carotenoides. También se le asocia con propiedades antiinflamatorias, antihipertensivas, diuréticas, antimicrobianas, antioxidantes, antidiabéticas, antineoplásicas, actividades antipiréticas, antiulcerosas, cardioprotectoras y hepatoprotectoras (Abd et al., 2018).

4.7 Linaza

La linaza o lino (*Linum usitatissimum* L.) se considera como una planta de cultivo de doble propósito debido a sus principales productos, la fibra y la semilla. Desde hace muchos años, la fibra se ha convertido en hilo, que sirvió como una fuente importante para la fabricación de textiles, la pulpa es utilizada para la elaboración de papel y plástico, mientras que las semillas han sido prensadas para obtener aceite extraíble con diferentes usos incluidos la producción de biodiesel y consumo humano. Además de ser utilizadas en la construcción como aislante térmico La planta de linaza se ha utilizado en su totalidad aprovechando sus propiedades (Zuk et al., 2015).

La linaza está constituida por ocho aminoácidos esenciales (isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina), carbohidratos, vitaminas, minerales, fibra cruda y ácidos grasos omega-3 y omega-6.

4.7.1 Mucílago de linaza

El mucílago de linaza, que reside en la cubierta de la semilla, se obtiene mediante un proceso de precipitación a partir del extracto acuoso de la semilla y da una solución de alta viscosidad, esta es una masa fibrosa blanca y friable cuando está completamente seca y da una solución de alta viscosidad cuando se disuelve en agua. Es una mezcla heterogénea de polisacáridos formada por xilosa, glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa y ácido galacturónico. (Dash et al., 2017).

El mucílago está compuesto por dos polisacáridos, uno neutro (aproximadamente 75%) y otro ácido. El componente principal del polímero neutro es la xilosa (62,8%) y el del polímero ácido es la ramnosa (54,5%), por lo que la relación ramnosa/xilosa se usa frecuentemente para estimar la relación entre polisacáridos ácidos/neutros. Los estudios realizados acerca de la composición del mucílago de linaza indican que la composición de monosacáridos del mucílago varía significativamente entre diferentes cultivares de linaza (Figuerola et al., 2008).

4.8 Aditivos

4.8.1 Alcohol polivinílico

El alcohol polivinílico (PVA) es un polímero sintético utilizado en una amplia gama de aplicaciones industriales, comerciales, médicas y alimentarias, incluidas resinas, lacas, hilos quirúrgicos y aplicaciones de contacto con alimentos. Las características físicas del PVA dependen de su preparación a partir de hidrólisis o hidrólisis parcial, siendo clasificado en dos grupos: parcialmente hidrolizado y completamente hidrolizado. Propiedades que se caracterizan del PVA son pH, viscosidad, pérdida por secado, punto de fusión, índice de refracción, metales

pesados y residuos por ignición. Puede variar según el peso molecular y el porcentaje de hidrólisis (DeMerlis & Schoneker, 2003).

El PVA se ha llegado a utilizar ampliamente en la industria del papel, textil (proporcionando rigidez), agente espesante en pintura de látex y pegamento blanco, industria de empaquetado de comida y diversas aplicaciones médicas. Además, se usa como producto comercial e industrial por su bajo impacto ambiental (Baker et al., 2012).

4.8.2 Glicerol

El glicerol está compuesto por 1, 2,3 propanotriol, 1, 2,3 trihidroxipropano, glicerol o glicerina ($C_3H_8O_3$) es un alcohol con tres grupos hidroxilos ($-OH$), es un material plastificante que se utiliza como aditivo comúnmente en las películas de celulosa por ser económico, ecológico y no tóxico. En películas de celulosa proporciona mayor flexibilidad, permeabilidad, la resistencia a la tracción y una clarificación. Las cualidades incorporadas en la celulosa son debido a disminuir la fuerza de atracción de los enlaces de hidrogeno intramoleculares (Cielecka et al., 2019).

La combinación con celulosa se ha realizado en diversas investigaciones como Zhu y colaboradores (2014) utilizando un tratamiento con glutaraldehído usando ácido clorhídrico como catalizador para obtener papel de nanocelulosa con mayor estabilidad dimensional en agua. El uso de un tratamiento con celulosa microfibrilada y glicerol con una compresa caliente donde se mejoró la elasticidad para su aplicación en materiales electrónicos y biosensores (Van Nguyen et al. 2021)

4.8.3. Quitosano

El quitosano es un producto de la quitina, uno de los más abundantes polisacáridos en la naturaleza, encontrado en la composición de los caparazones de los crustáceos y la pared celular de los hongos, siendo un material de interés científico por las únicas propiedades que posee como biocompatibilidad, seguro, biodegradable, absorción de metales pesados y radionucleidos (Gutiérrez, 2017).

El uso del quitosano se centra en el área de alimentos como aditivo, incrementando el tiempo de vida de los alimentos por su actividad antimicrobiana, antioxidante y excelentes propiedades emulsificantes. Además, se puede utilizar como ingrediente contra hipercolesterolemia, hipertensión e inflamaciones y para encapsulamiento de nutrientes. En el área de alimentos es donde más se pueden aprovechar las cualidades del quitosano, los recubrimientos son los empaques esenciales para proteger los alimentos contra factores externos, también se puede usar con el propósito de contener ingredientes activos para conservadores, sabores y colorantes (Kabanov & Novinyuk, 2020).

5. METODOLOGÍA

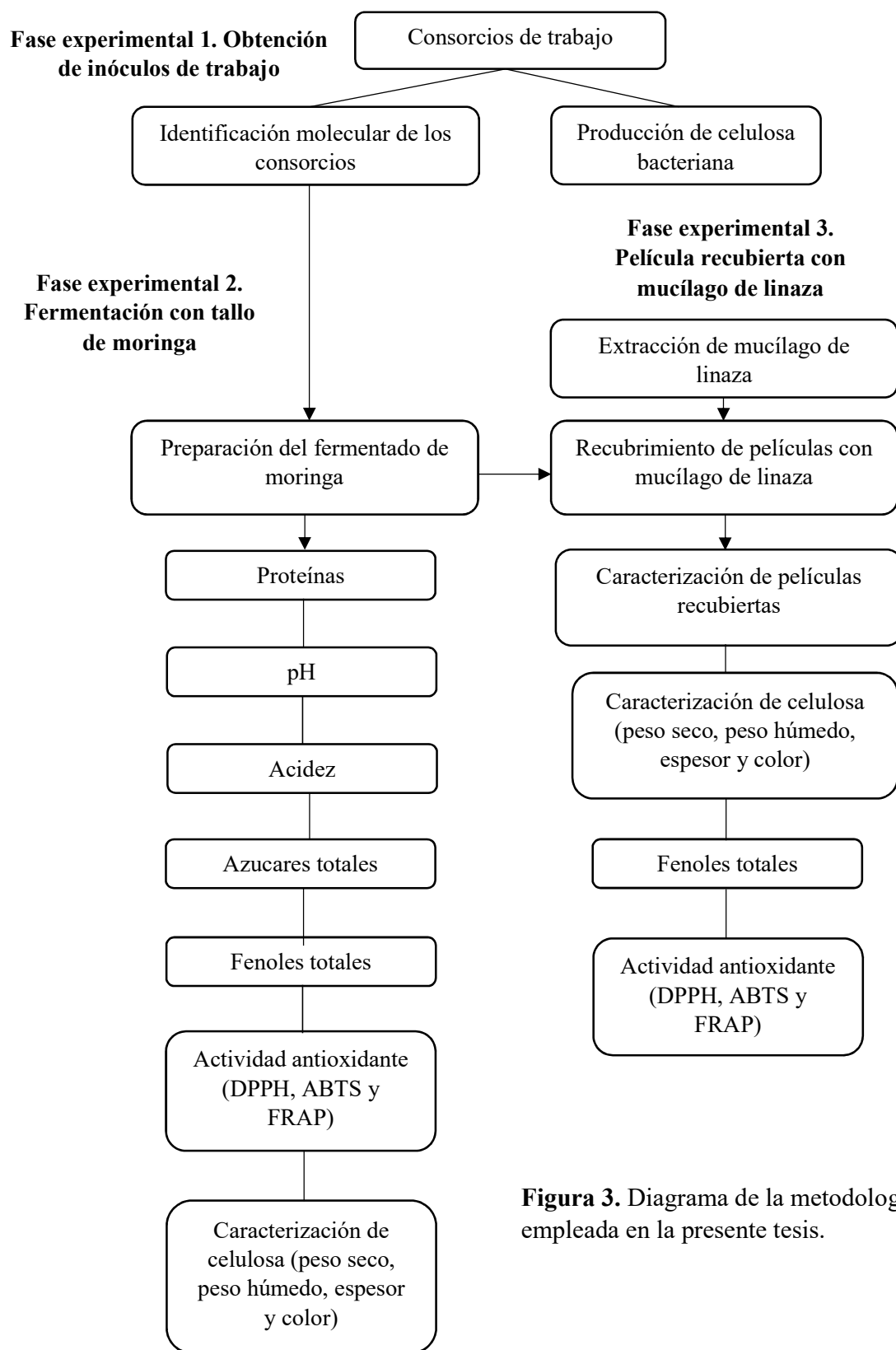


Figura 3. Diagrama de la metodología empleada en la presente tesis.

5.1 Localización del experimento

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Remediación Ambiental y Análisis de Suelos, Aguas y Plantas además del Laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Facultad de Agronomía, de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Localizada en General Escobedo, Nuevo León. La metodología abordada en el presente trabajo se encuentra esquematizada en la Figura 3.

5.2 Fase experimental 1: Obtención de los inóculos de trabajo

5.2.1 Consorcios de trabajo

La nomenclatura de los inóculos que se utilizaron en el presente trabajo es el siguiente: frambuesa (CFM), original (COR), frutos rojos (CFR), piña (CPN) y uva (CUV).

Los consorcios de trabajo fueron aislados de diferentes orígenes, la kombucha denominada COR fue aislada de una bebida de un mercado local de productos orgánicos localizada en San Nicolás de los Garza, Nuevo León. Los consorcios CFR, CFM, CPN y CUV fueron aislados de productos comerciales. Para el establecimiento de los consorcios aislados se tuvieron en mantenimiento utilizando como medio de fermentación té verde con 55 g de sacarosa como fuente de carbono y con recambios periódicos de medio para lograr el establecimiento de un hotel de SCOBY para cada aislamiento, tal como se muestra en la Figura 4.

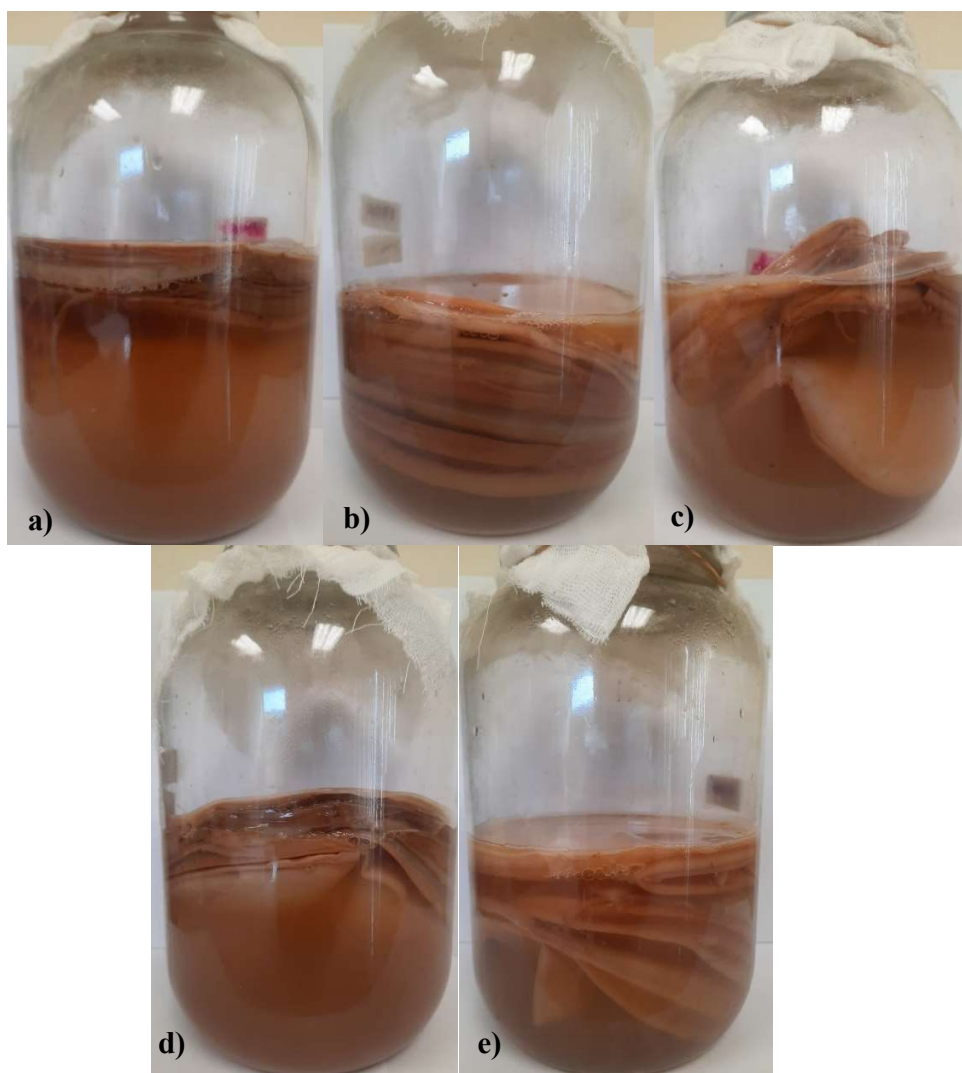


Figura 4. Consorcios de kombucha. De izquierda a derecha; CFM (a), CPN (b), CUV (c), CFR (d) y COR (e).

5.2.2 Identificación molecular de los consorcios

Para obtener la biomasa que se usó en la secuenciación se tomaron 100 mL de cada consorcio de kombucha y fueron centrifugados a 3000 rpm a 4 °C. Las muestras fueron guardadas en refrigeración hasta su análisis en Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CISECE). Las muestras fueron secuenciadas

mediante metagenómica por el 16S rRNA, con tecnología Ion-Torrent (modelo PGM), la metodología y procesamiento se desarrolló de acuerdo con lo descrito en el manual (MAN001799) del kit de secuenciación para 16S A26216 (ThermoFisher, Scientific), el cual está estandarizado para la amplificación y secuenciación de 7 regiones variables (2-4 y 6-9).

El análisis de las secuencias obtenidas se realizó mediante la implementación de un protocolo bioinformático estandarizado, a partir del cual se generan modelos específicos para el estudio de la comunidad microbiana que permiten determinar de manera gráfica y cuantitativa, la abundancia y diversidad relativa de los grupos bacterianos encontrados en las muestras. Los análisis de abundancia, diversidad alfa y beta, análisis estadísticos y representaciones gráficas se realizaron empleando el programa QIIME (Caporaso et al., 2010), mediante el modelo “close reference” y utilizando la base de datos de Green Genes a una similitud del 97%.

5.3 Fase Experimental 2. Fermentación

5.3.1 Preparación del fermentado de moringa

La elaboración de una infusión de tallo de moringa se realizó al calentar agua destilada, y agregar 4 g de tallo de moringa (TM) triturado, obtenido de podas de árbol que tenía aproximadamente 3 meses de confinamiento del Centro de Agricultura Protegida (CAP), UANL, con el propósito de hacer más accesibles los metabolitos y agregar sacarosa como fuente de carbono, la mezcla se dejó a temperatura ambiente antes de ser utilizada (Figura 5). Después en frascos de vidrio se agregó la cantidad de 80 mL y un 10% (v/v) de inóculo, después se cubrieron con gasa y se resguardan en oscuridad a temperatura ambiente por un periodo de 13 días. El experimento se realizó con 6 réplicas para cada consorcio con toma de muestra en tres tiempos distintos de la fermentación.

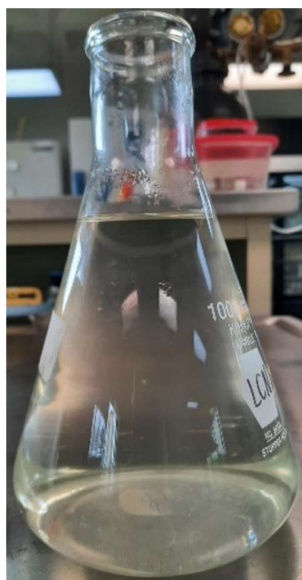


Figura 5. Infusión de tallo de moringa

5.3.2 Caracterización del fermentado de moringa

5.3.2.1 Determinación de proteínas

La solución Bradford fue elaborada en un vaso precipitado de 500 mL recubierto con aluminio en el cual se agregó 5 mL de etanol al 95% con 0.01 g de azul brillante y 85 mL de agua destilada y se dejó agitar por 30 min, posteriormente se agregaron 10 mL de ácido fosfórico al 85% y se agitó la mezcla por otros 30 min obteniendo una coloración verde militar. Finalmente se filtró, utilizando un filtro de poro abierto y un filtro Whatman N°1, para luego ser almacenado en un recipiente de cristal ámbar a 4°C.

Para realizar la cuantificación se mezcló en un tubo de ensaye, 200 µl de la muestra de kombucha y 800 µl de solución Bradford. Después de 5 minutos resguardadas de la luz, se tomó una lectura a 595 nm en el espectrofotómetro- UV-vis. Utilizando como blanco agua y la

solución Bradford (Bradford, 1976). El ensayo se preparó en tubos de ensaye totalmente libres de proteínas para evitar contaminación, con una solución de ácido nítrico al 5%.

Para la cuantificación de proteína se realizó una curva de calibración a partir de 6 puntos con concentraciones de albumina bovina pura [200 µl/mL, 100 µl/mL, 50 µl/mL, 25 µl/mL, 12.5 µl/mL y 6.25 mg/mL].

5.3.2.2 Determinación de acidez

La acidez en el medio se evaluó por valoración volumétrica. En 10 mL de muestra se adicionaron dos gotas de fenolftaleína al 0.1% y se valoró con una solución de NaOH (1N) hasta virar una tonalidad rosa (Vitas et al., 2020). La acidez se determina a partir de los mL de NaOH usados con la siguiente ecuación (1):

$$\% \text{ Acidez} = \frac{[(\text{mL NaOH})(N \text{ NaOH})(0.06)]}{\text{mL M}} \times 100 \text{ Ecuación (1)}$$

5.3.2.3 Determinación de pH

El valor de pH se cuantificó con un medidor multiparamétrico de pH (Thermo Scientific™ Medidor de pH de sobremesa Orion Star™ A211).

5.3.2.4 Determinación de azúcares totales

La prueba de azúcares ácido sulfúrico (López-Legarda et al., 2017) fue usada para determinar la concentración de azúcares totales de los tratamientos. Primero, se agregó 1 mL de muestra diluida (1:10000) con 1 mL de fenol al 5% en tubos de ensaye; en el caso del control se agregará 1 mL de agua destilada y el fenol. A estas mezclas se les adicionan 5 mL de ácido sulfúrico concentrado y se agitaron levemente. Las soluciones se dejaron reposar por 10 minutos

a temperatura ambiente, antes de realizar la lectura en el espectrofotómetro UV/Vis a 490 nm, las muestras se agitan por 30 segundos en el vortex y se colocan en baño de agua fría.

Para la cuantificación de azúcares totales se realizó una curva de calibración a partir de 5 puntos, con concentraciones de glucosa [5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 80 mg/L, y 100 mg/L].

5.3.2.5 Contenido de fenoles totales (TPC)

Con el método de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999) modificado se realizó la cuantificación de componentes fenólicos en kombucha. Las soluciones que se utilizaron son Na_2CO_3 al 7.5% elaborada con 7.5 g de Na_2CO_3 en 100 mL de agua destilada en un matraz aforado. El Folin se requiere al 1N (los reactivos comerciales comúnmente tienen la presentación 2N) por lo cual se hace una relación 1:1 con agua destilada. La mezcla de soluciones para el análisis consistió en mezclar 250 μL de muestra diluida (1:3), 800 μL de agua destilada, 50 μL de Folin 1N y 800 μL de Na_2CO_3 al 7.5%. Posteriormente se resguardan por 30 minutos en la oscuridad y al finalizar el tiempo se realiza la lectura en un espectrofotómetro de UV/Vis a 750 nm.

Para la cuantificación del contenido de fenoles se realizó una curva de calibración a partir de 6 puntos, utilizando como estándar concentraciones de ácido gálico [20 μg GAE/mL, 40 μg GAE/mL, 60 μg GAE/mL, 80 μg GAE/mL, 100 μg GAE/mL, 120 μg GAE/mL]. Los resultados se expresaron en μg GAE/mL.

5.3.2.6 Actividad antioxidante

5.3.2.6.1 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

La técnica de DPPH se empleó con el método de preparación descrito por Vohra et al. (2019) con algunas modificaciones. Para la elaboración del reactivo DPPH se pesaron 0.006 g en 100 mL de metanol al 85 %, para disolver el reactivo en la solución se colocó en sonicación durante 15 minutos. El recipiente con la solución debe no estar expuesto a la luz. Posteriormente se verificará que la absorbancia del reactivo se encuentre entre el rango de 0.7 a 1, utilizando un espectrofotómetro de UV/Vis, en el caso que rebase la absorbancia que se requiere se añadirá metanol al 85 % y volverá a realizar la lectura hasta que se obtenga la absorbancia deseada. Para el análisis de las muestras se añaden 50 µL de muestra diluida (1:3) más un mililitro del reactivo DPPH, se agitan y luego se resguardan en la oscuridad por 30 minutos. Para el control negativo se añaden un mililitro de reactivo DPPH con 50 µL de metanol al 85 %. El blanco es metanol al 85 %. Las lecturas de las muestras fueron en un espectrofotómetro de UV/Vis a 517 nm. Los resultados se registraron como porcentaje de inhibición por lo cual se utilizará la ecuación 2, donde A1 es la absorbancia de la muestra y A es la absorbancia del reactivo DPPH.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A-A1}{A} \times 100 \quad \text{Ecuación (2)}$$

5.3.2.6.2 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS)

La técnica de ABTS se realizó como lo indica Tanticharakunsiri y colaboradores (2020) con modificaciones. Para la preparación del reactivo ABTS se preparará una solución 7mM de ABTS (0.0192 g) y de persulfato de potasio al 140 mM (0.0189 g) ambas se aforaron en 5 mL con agua destilada. Posteriormente se mezclaron, agregando 88 µL de la solución de persulfato de potasio en 5 mL de ABTS, se agitan y se llevan a calentar en un microondas por 10 segundos.

La solución obtenida se mezcló con 15 mL de metanol puro. La reacción debe de tener una absorbancia entre 0.7 a 1, la longitud de onda utilizada fue 734 nm y se determinó usando un espectrofotómetro de UV/Vis. Para las muestras se mezclan 25 μ L de muestra, 1 mL de reactivo ABTS se agito y mantuvo en oscuridad por 45 minutos. El blanco fue etanol puro. Se usa la ecuación 2 para la obtención del porcentaje de inhibición.

5.3.2.6.3 FRAP

La técnica de FRAP como menciona Aung y Eun (2021), fue la utilizada. Las soluciones que se usaron fueron ácido clorhídrico a 40 mM, en donde se añadieron 170 μ L en 50 mL de agua destilada. Una solución de buffer de acetato de sodio que se preparó mezclando 0.683 g de este con 4 mL de ácido acético glacial y aforado a 250 mL, el pH debe estar en 3.6 (ajustar con ácido acético glacial). Una solución de cloruro férrico, en la cual se tomaron en 0.54 g y se aforo a 10 mL de agua destilada. Por último, una solución de 2,4,6-Tris-(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) donde se agregó 0.156 g en 5 mL de ácido clorhídrico al 40 mM previamente preparado. Para la preparación del reactivo FRAP se colocaron 10 mL de buffer, 10 mL de cloruro férrico y 5 mL de reactivo TPTZ en un baño seco a 45 °C hasta que las soluciones alcancen una temperatura de 37 °C, posteriormente mezclar 10 mL de buffer, 1 mL de cloruro férrico y 1 mL de TPTZ, todo en un recipiente recubierto de la luz, al final observar la coloración de la mezcla que obtenga una coloración morada translúcida. La lectura de muestras se realizó mezclando 25 μ L de muestra, 1 mL de reactivo FRAP y se resguarda en oscuridad por una hora y media. El blanco que se utilizo es metanol puro. La lectura se realizó en un espectrofotómetro de UV/Vis a 595 nm expresando los resultados en μ M de Trolox.

Para la cuantificación de la actividad antioxidante en FRAP se realizó una curva de calibración a partir de 6 puntos, con concentraciones de Trolox [50 µM TE/mL, 100 µM TE/mL, 200 µM TE/mL, 300 µM TE/mL, 400 µM TE/mL, 500 µM TE/mL, 600 µM TE/mL, 700 µM TE/mL y 800 µM TE/mL]. Los resultados se expresaron en µM de TE/mL.

5.3.2.7 Caracterización de celulosa microbiana

5.3.2.7.1 Rendimiento del peso seco y húmedo

La cuantificación del peso y el rendimiento de la celulosa producida se realizó colocando en una caja Petri la celulosa generada y se llevó a una balanza analítica para determinar el peso en fresco, luego se colocaron en una incubadora a 30 °C para secar la celulosa por 48 horas, al final se pesa la celulosa en seco. Para la obtención del rendimiento se sigue la formula en la ecuación 3 para obtener el rendimiento de la materia en seco y húmedo.

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Peso seco de CM (g/L)}}{\text{Concentración de fuente de carbono (g/L)}} \times 100 \quad \text{Ecuación (3)}$$

5.3.2.7.2 Espesor

El espesor de la película se midió con un Vernier digital en cinco puntos diferentes (Caamal et al 2011).

5.3.2.7.3 Determinación de color

El color se analizó mediante las coordenadas CIE-L*a*b* de la celulosa microbiana con un colorímetro (CHIN Spec) en tres puntos de cada película en seco utilizando un fondo blanco y negro (AL-Kalifawi & Hassan, 2014).

5.3.2.7.4 Opacidad

Con la obtención de los datos en la determinación de color se utiliza la coordenada c^* en ambos fondos y se utilizó la fórmula de la ecuación 4 para obtener la opacidad (Fakhouri et al., 2015).

$$Opacidad = \left[\frac{Coordenada\ c\ en\ fondo\ negro}{Coordenada\ c\ en\ fondo\ blanco} \right] \times 100 \quad \text{Ecuación (4)}$$

5.4.Fase Experimental 3. Biopelícula bioactiva

5.4.1. Extracción de mucílago de linaza

Para la extracción del mucílago se hizo una relación 20 % p/v de mucílago en agua destilada, se dejó remojar por 24 horas en constante agitación (250 rpm) y posteriormente en un vaso de precipitado de un litro se coló la solución separando la fase líquida de la sólida (semillas de linaza), una vez obtenida se agregó en una relación 1:1 de etanol puro, y se dejó reposar por 20 minutos. Posteriormente se extrajo el mucílago que estaba en la parte superior de la mezcla y se repiten los pasos mezclando las soluciones hasta que la solución presente un color uniforme.

El mucílago extraído se extendió en charolas de aluminio para llevarlos a la estufa a 60 °C por 12 horas para secarlo, posteriormente se trituro hasta hacerse polvo y se resguardo en recipientes plásticos hasta su posterior uso (Figura 6).

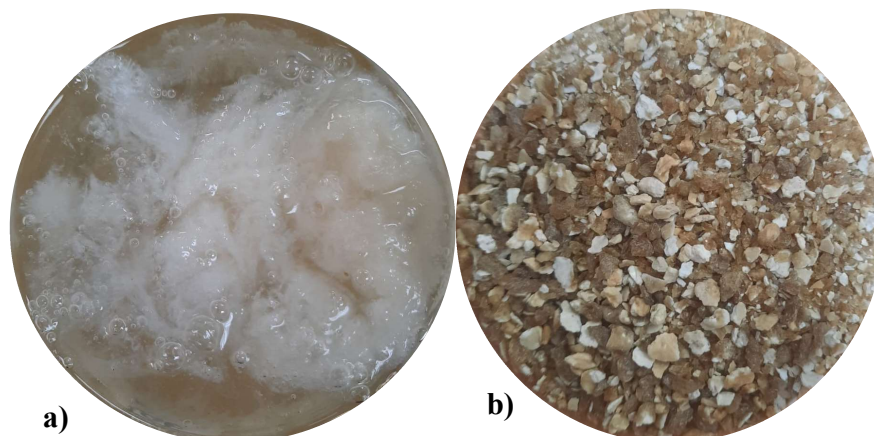


Figura 6. Mucílago de linaza en húmedo (a) y seco (b)

5.4.2. Elaboración de la biopelícula bioactiva: celulosa microbiana y mucílago de linaza

El recubrimiento de la celulosa microbiana de kombucha con mucílago se hizo colocando en un vaso de precipitado de 250 mL un 3 % de mucílago de linaza (ML) en polvo en 100 mL de agua destilada en agitación constante a velocidad media, agregando en pocas cantidades el polvo del ML hasta que se disuelva por completo, al final se adiciona el glicerol hasta que se disuelva y se obtenga la consistencia. Al final se colocaron las películas en cajas Petri y se agregó el ML esparciéndolo por toda la película en ambos lados y retirando el exceso, al final se llevan a la incubadora a 30 °C para que se seque el ML y se adhiera a la película.

5.4.3. Caracterización de películas recubiertas con mucílago de linaza

Para la caracterización de las películas recubiertas se realizan los análisis de peso seco, húmedo, rendimiento de la masa, espesor, color y opacidad como se mencionaron anteriormente (sección 5.3.2.7).

5.4.4. Extracción y análisis de compuestos fenólicos de películas

La extracción de los compuestos de interés se realizó mediante la adición de 20 mL de disolvente (etanol, metanol y cloroformo), en cada caso en recipientes diferentes y agregar 1 g de película recubierta. Posteriormente se macero hasta que quedo en partículas más pequeñas. Por último, se resguardaron en frascos de vidrio cubiertos de los rayos de luz directa por 24 horas.

Los extractos obtenidos fueron analizados para cuantificar fenoles y actividad antioxidante con las técnicas DPPH, ABTS y FRAP como se describieron anteriormente.

5.4.5. Actividad antimicrobiana

La evaluación se lleva a cabo mediante la técnica difusión en agar frente a bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) y Gram negativas (*Salmonella* sp. y *Escherichia coli*). Primeramente, los microorganismos se activan en 7 mL de caldo infusión cerebro corazón (CICC) y se incuban a 37 °C por 16 hrs (Figura 7). Transcurrido el tiempo de incubación, el inóculo se mide a 625 nm en un espectrofotómetro y se ajusta a la escala de Mc Farland (3×10^8 cel/mL). Posteriormente, se inoculan por dispersión 0.1 mL de cada microorganismo en caja Petri estériles con agar infusión cerebro corazón (AICC) y se colocan las películas previamente cortadas en discos de 10 mm de diámetro. Por último, las placas se incuban a 37 °C por 24 hrs

y se les mide el diámetro del halo de inhibición, cada experimento se realizará por cuadruplicado (Rojas et al., 2005). Para el control negativo se colocarán discos estériles de papel filtro (n=4) con 5 μ L de antibiótico (ampicilina) a una concentración de 0.05%.



Figura 7. Cepas de microorganismos patógenos. De izquierda a derecha Control, *E. coli*, *S. aureus* y *Salmonella sp.*

5.5. Análisis estadístico

Los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), utilizando el paquete estadístico Minitab 17.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1.Fase 1. Identificación de consorcios y efecto de un fermentado de TM en cinco consorcios de kombucha

6.1.1. Identificación metagenómica

El análisis metagenómico que se realizó a los cinco consorcios de kombucha (Figura 8 y 9), indican que los principales grupos taxonómicos de acuerdo con el filo son Proteobacteria y clase Alphaproteobacteria, investigaciones similares sobre consorcios de kombucha muestran concordancia con los datos mencionados en los cuales hay un 65.7% de proteobacterias (Chakravorty et al., 2016), un 90% de proteobacterias (Marsh et al., 2014) y en otros estudios su presencia es absoluta en el fermentado (Menezes et al 2020; Arikan et al., 2020).

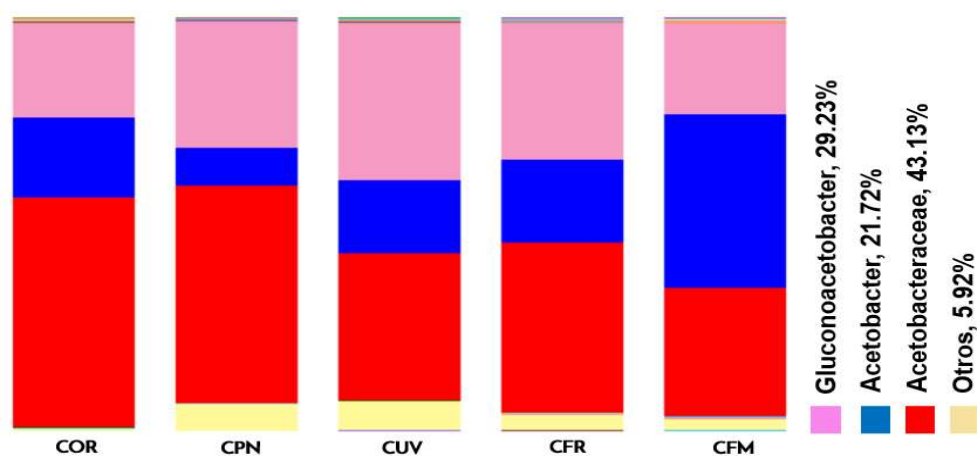


Figura 8. Abundancia relativa de familias y géneros, detectada para los cinco consorcios analizados

La presencia de bacterias asociadas a la producción de biopolímeros se comparó con las secuencias de bacterias reportadas con esta característica (Tabla 4), tales como *Acetobacter* y *Gluconobacter*, los géneros de bacterias más representativos en los cinco consorcios. Las cuales

fueron las más abundantes encontradas en kombucha (Jayabalan et al., 2014), que utilizan como fuente de carbono glucosa para producir ácido glucónico y etanol con la finalidad de obtener ácido acético, debido a la producción de los ácidos orgánicos generados inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas (Teyssier & Hamdouche, 2016). Siendo la principal bacteria encargada de la síntesis de celulosa *Acetobacter xylinum* (Martinez et al., 2018). El propósito de las bacterias *Gluconobacter* en el medio de kombucha es producir ácido glucónico y glucurónico (Kerstens et al., 2006).

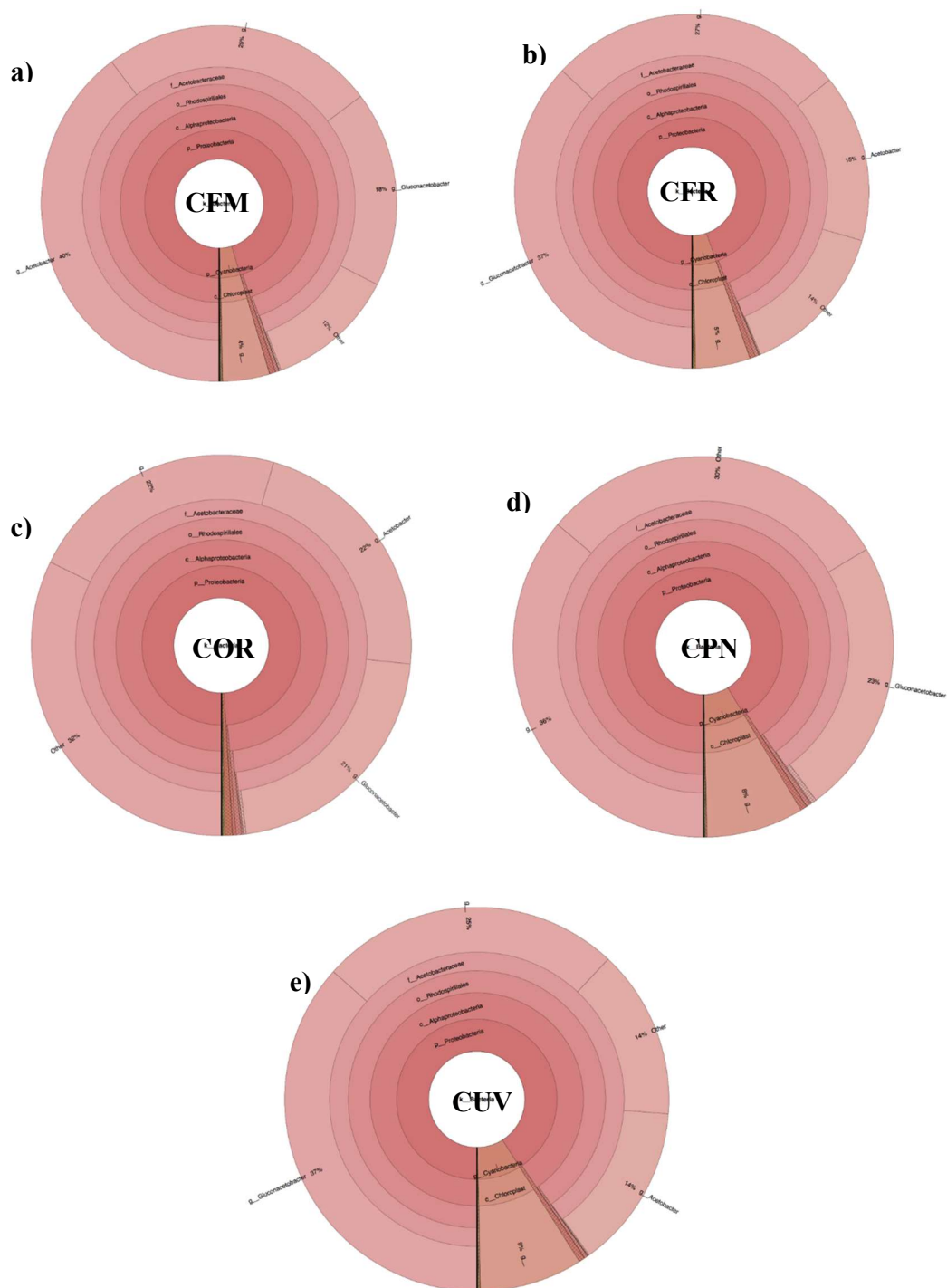


Figura 9. Representación gráfica de los grupos taxonómicos más abundantes en los consorcios analizados. Los resultados corresponden a la abundancia relativa de los grupos, con respecto al grupo Bacteria. COR (a), CFR (b), COR (c), CPN (d) y CUV (e).

Tabla 4. Grupos bacterianos asociados a la producción de biopolímeros

| Grupo | CFM (%) | CFR (%) | COR (%) | CPN (%) | CUV (%) |
|--------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| <i>Acetobacter</i> | 40 | 15 | 22 | 0,4 | 14 |
| <i>Gluconobacter</i> | 18 | 37 | 21 | 23 | 37 |
| <i>Lactobacillus</i> | 0.003 | 0.005 | 0.002 | 0.01 | 0.007 |
| <i>Lactococcus</i> | 0.006 | 0.009 | 0.001 | 0.007 | 0.01 |
| <i>Leuconostoc</i> | 0.002 | 0.002 | 0.0004 | - | 0.002 |
| <i>Ruminococcaceae</i> | 0.0005 | 0.0009 | 0.001 | 0.001 | 0.0005 |
| <i>Propionibacterium</i> | 0.003 | 0.0009 | 0.002 | 0.006 | 0.002 |

Debido a que las levaduras no son las principales productoras de celulosa no se identificaron, pero contribuyen al proceso fermentativo de kombucha haciendo disponible la sacarosa para las bacterias ácido acéticas, por la acción de enzimas que secretan, liberando grandes cantidades de polisacáridos, con eficiencia con respecto a la utilización de las fuentes de nitrógeno disponibles y alto nivel de resistencia al estrés osmótico y etanólico, entre los géneros relacionados con kombucha se encuentran *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces* y *Pichia* (Villarreal-Soto et al., 2020) por mencionar algunos.

6.1.2. Caracterización de la fermentación y películas de kombucha en un medio de TM

Los consorcios utilizados para la elaboración de la kombucha presentaron en su mayoría una tonalidad blanca amarilla con formación de celulosa microbiana, la cual flotaba en el medio de fermentación a base de tallo de moringa (Figura 10). La cuantificación de proteínas se realizó con el propósito de brindar un aproximado indirecto sobre el crecimiento de microorganismos en consorcios de kombucha.



Figura 10. Consorcios de kombucha en fermentación de TM

El crecimiento de los cinco consorcios es variable en los primeros días de fermentación (Figura 11a), habiendo un descenso al final con excepción del consorcio CFM. La presencia de proteínas depende de diversos factores como la liberación de proteínas extracelulares de bacterias y levaduras a lo largo del proceso de fermentación, además del crecimiento de los microorganismos (Sreeramulu et al., 2000; Ahmed et al., 2020). El descenso de las proteínas reside en la unión de bacterias, levaduras y moléculas producidas durante el proceso fermentativo del SCOBY, disminuyendo la cantidad de estas partículas en el fermentado (Martínez et al., 2018).

El contenido de dextrosa (Figura 11b) en el medio fue descendiendo conforme aumentaban los días de fermentación y por el consumo de las bacterias para la producción de ácido acético, no encontrando diferencia significativa ($p>0.05$) entre los consorcios, indicando el crecimiento de los microorganismos al aumentar los días de fermentación por el consumo del azúcar. En estudios similares de kombucha en medios con té negro indican un suceso similar con el descenso en el contenido de su fuente de carbono cuando se usa sacarosa (Ivanišová et al., 2019), además en fermentados con diferentes fuentes de carbono hay una preferencia por el

consumo de sacarosa de los microorganismos encontrados en kombucha, aumentando la velocidad de consumo de azúcar en fermentados donde la sacarosa es pura, lo cual repercute en la producción de ácidos orgánicos y celulosa microbiana (Malbaša et al., 2008).

El pH y la acidez es una variable importante en el proceso fermentativo de la kombucha debido a su conocido sabor ácido, generado principalmente por las bacterias acéticas y el aporte que brindan a la bebida como la cualidad antimicrobiana y antifúngica además de la disminución de los niveles de azúcar contemplando solo un ácido de la diversidad encontrada y que proveen estas condiciones acidas. El pH al inicio de la fermentación fue de 5.28 ± 0.26 , con un descenso al cuarto día (Figura 11c) con diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los consorcios COR, CFR, CFM contra los consorcios CPN y CUV los cuales presentan un pH menor, en el último día de fermentación todos los consorcios presentan valores de pH similares, tal es el caso del consorcio CUV con un valor de 2.29 ± 0.015

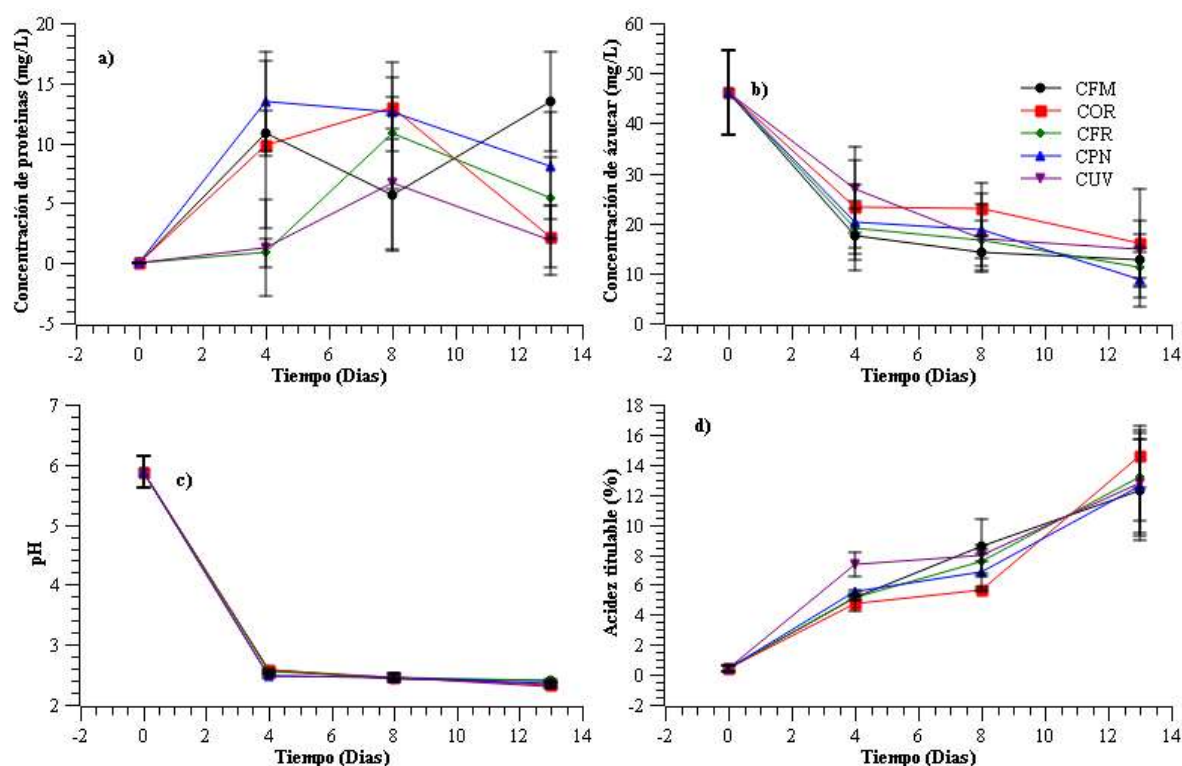


Figura 11. Caracterización del medio TM en los cinco consorcios, para la concentración de proteínas (a), concentración de azúcar en el medio (b), cambios de pH (c) y el porcentaje de acidez en el medio (d).

La acidez del medio presenta un aumento exponencial en todos los consorcios siendo CUV el más ácido al cuarto día posteriormente los valores de cada consorcio no presentan diferencia significativa ($p > 0.05$) en el último día de incubación (Figura 11d). El porcentaje de acidez más alto fue 14.55 ± 2.07 % correspondiendo al consorcio COR. El cambio en el fermentado de kombucha es generado por las bacterias ácido acéticas que son las principales productoras de ácido acético, además de otras bacterias que excretan otros ácidos orgánicos como ácido glucónico y glucurónico (Jayabalan et al., 2014). En una investigación similar en la

cual se utilizó las hojas de moringa como sustrato presentaron valores de pH de 2.61 en un periodo de 8 días de fermentación indicando el potencial que tiene la moringa como sustrato para la producción de los ácidos orgánicos, aunque estos componentes llegan a disminuir en el tallo (Primiani et al., 2018). Siendo superior el pH promedio en TM a los 4 días de fermentación, generando mayor acidez por presencia de ácidos orgánicos en menor tiempo.

A la celulosa microbiana generada en cada consorcio se le determinó el espesor de las películas en seco, rendimiento de peso seco (RPS) y húmedo (RPH), con el propósito de evaluar la producción en cada consorcio (Figura 12). En el RPS y RPH hay una diferencia significativa ($p<0.05$) entre cada película generada, con una comparación de medias se demostró que en RPH los consorcios con mayor generación de biomasa son COR y CPN, para el RPS existe diferencia significativa siendo COR la que presenta mayor celulosa producida (Tabla 5).

Tabla 5. Características físicas de la celulosa bacteriana producida en un fermentado de TM

| CNS | RPS (%) | RPH (%) | E (mm) |
|---|-------------------|----------------------|---------------------|
| CFM | 1.94 ± 0.38^b | 53.6 ± 53.61^b | 0.097 ± 0.021^b |
| CFR | 3.76 ± 2.06^b | 49.62 ± 17.04^b | 0.100 ± 0.016^b |
| COR | 7.3 ± 1.63^a | 186.87 ± 35.76^a | 0.188 ± 0.022^a |
| CPN | 2.94 ± 0.81^b | 69.74 ± 24.47^a | 0.108 ± 0.013^b |
| CUV | 2.82 ± 0.68^b | 69.9 ± 17.31^b | 0.099 ± 0.019^b |
| Nota. Media \pm Desviación estándar. Las letras indican diferencia entre tratamientos RPS=Rendimiento peso seco; RPH=Rendimiento peso húmedo; E=Espesor | | | |

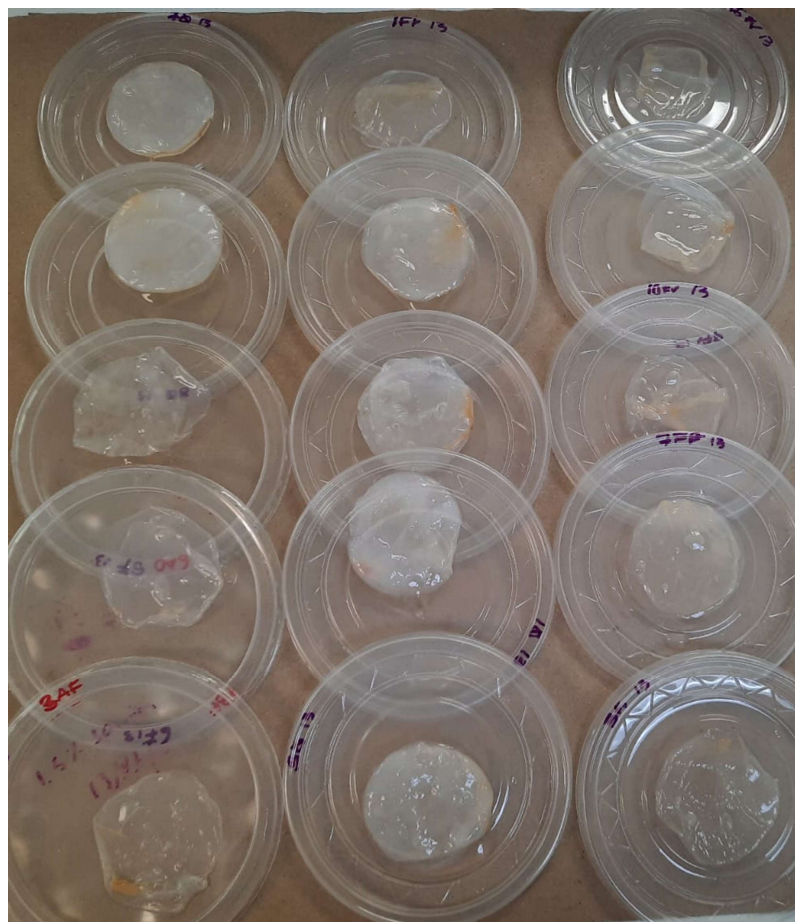


Figura 12. Celulosa microbiana húmeda de los consorcios CFM, COR y CFR respectivamente (izquierda a derecha)

El incremento de la biomasa se debe a la cantidad de microorganismos productores de la celulosa microbiana, en el caso de COR tiene una presencia más alta de *Acetobacter* (ver tabla 4) siendo los principales productores de celulosa en kombucha (Martínez et al., 2018). Se ha observado el mayor desarrollo de la biomasa a los 14 días siendo directamente proporcional a la cantidad de días de fermentación (Kellel et al., 2012). El espesor se ve relacionado con el peso donde se observa que COR tiene mayor rendimiento en RPH, RPS y espesor, caso contrario a lo cuantificado en CFM.

El contenido de fenoles totales (TPC) en los cinco consorcios de kombucha (Figura 13a) presentan un ascenso hasta el cuarto día de fermentación y posteriormente a ello hay dos patrones marcados para los consorcios uno de ellos es el descenso al octavo día y un ascenso hasta el último día de fermentación (CFR, COR y CFM). Mientras que los consorcios CPN y CUV mantienen un ascenso constante en el contenido de fenoles. Este comportamiento pudiera ser debido al origen y diversidad de los consorcios microbianos, tiempo de fermentación o descomposición de compuestos polifenólicos. Al aumentar el tiempo de incubación de la kombucha hay un aumento de los TPC por consecuencia de los microorganismos ejercen su capacidad para degradar compuestos complejos en moléculas menores (Sarkaya et al., 2021) explicando lo ocurrido en CPN y CUV. En fermentados tradicionales de té negro y verde se han cuantificado 1090 μg GAE/mL y 700 μg GAE/mL respectivamente (Cardoso et al., 2019), encontrándose los consorcios COR y CPN por debajo de los valores antes reportados. El aumento en el contenido de fenoles está relacionado a la actividad antioxidante, esto se debe a los compuestos bioactivos y su relación con los átomos de hidrogeno del grupo hidroxilo aromático (OH) (Zubaidah et al., 2019).

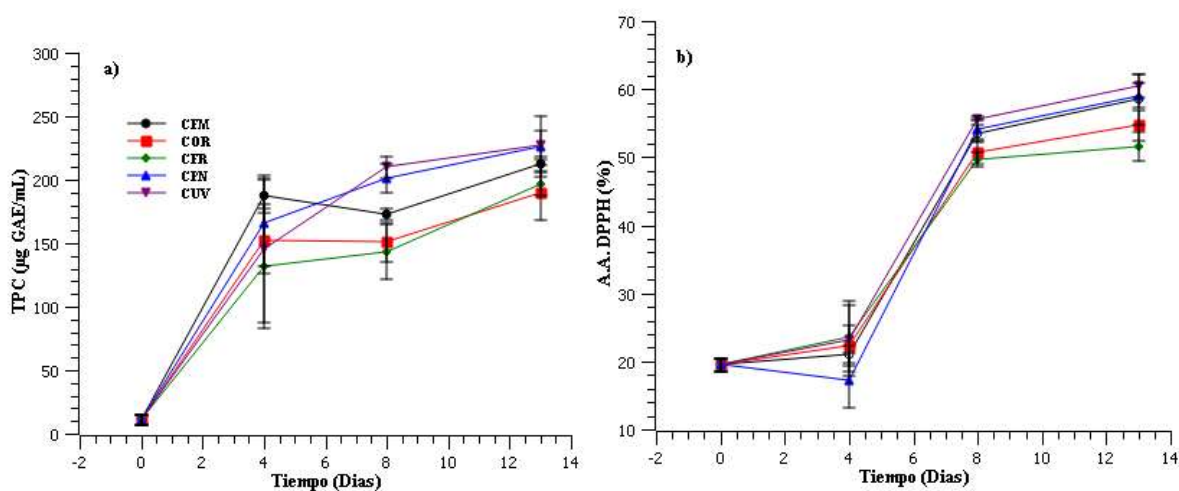


Figura 13. Contenido de compuestos fenólicos (a) y actividad antioxidante (b) en fermentado de TM.

La actividad antioxidante (Figura 13b) representada por el radical DPPH, presenta un aumento significativo en el cuarto día de fermentación en todos los consorcios, a partir del octavo día hasta el término del experimento no hubo cambios y no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$). Este comportamiento se puede observar en otros estudios donde se han analizado otras plantas medicinales como sustrato (Sarkaya et al., 2021). Pero en comparación con kombucha tradicional, en té negro contiene 55% de actividad antioxidante en DPPH en un periodo de 14 días, pero observamos una mayor diferencia significativa en contra del fermentado de té verde, donde existe un 75% de actividad antioxidante que se atribuye al contenido elevado de catequinas en el mismo (Vohra et al., 2019).

En comparación a lo encontrado en los cinco consorcios con TM hay una actividad que oscila entre 51 a 60 % y esto dependerá del consorcio que se esté utilizando, siendo algo inferior a lo antes mencionado reportado en la literatura con té negro. La actividad antioxidante en kombucha ocurre por las bacterias y levaduras que liberan enzimas encargadas de degradar los

polifenoles en moléculas más pequeñas con una mayor capacidad antioxidante, además de la presencia de moléculas con la capacidad de generar hidroxilo como las catequinas (Abuduaibifu & Tamer, 2019). El tiempo de incubación de la fermentación es crucial debido a que se ha demostrado que en periodos largos hay una disminución de la actividad antioxidante y se ha reportado que a partir de 14 días de fermentación se reduce dicha actividad en la kombucha (Tanticharakunsiri et al., 2020).

En la Tabla 6 se observan los análisis fisicoquímicos de una kombucha en condiciones tradicionales (control) comparando con lo antes mencionado son niveles superiores de proteínas, contenido de fenoles y actividad antioxidante, pero siendo equiparables y sin mostrar algún cambio significativo en los parámetros de consumo de azúcares, pH y acidez titulable. El parámetro del contenido de fenoles depende del sustrato que se utiliza, esto a su vez repercute en la actividad antioxidante, el té verde contiene una gran cantidad de fenoles y compuestos bioactivos que promueven una mayor capacidad antioxidante (Kaewkod et al., 2019).

Tabla 6. Análisis fisicoquímicos y antioxidantes de un fermentado de kombucha en té verde (control).

| Análisis | Inicial | Día 6 | Día 12 |
|---|-------------|---------------|----------------|
| Proteínas (mg/mL) | 100.17±8.36 | 119.00±10.15 | 98.39±7.85 |
| Azúcares totales (g/mL) | 60.75±3.32 | 24.00±0.85 | 10.69±6.01 |
| pH | 5.72±0.04 | 2.34±0.03 | 2.26±0.02 |
| Acidez titulable (%) | 0.06±0.00 | 0.17±0.17 | 1.49±0.23 |
| Fenoles totales (mg GAE/mL) | 645.82±7.68 | 1022.27±30.01 | 1477.64±186.86 |
| DPPH (mg TE/mL) | 2.64±0.30 | 4.51±0.15 | 12.55±0.28 |
| ABTS (mg TE/mL) | 2.57±0.10 | 2.89±0.12 | 4.18±0.40 |
| FRAP(mg GAE/mL) | 4.54±0.03 | 5.58±0.07 | 3.79±0.20 |
| Nota. Media ± Desviación estándar. | | | |

Con respecto al color de la celulosa microbiana se obtuvieron las coordenadas CIE- $L^*a^*b^*$, con respecto al color de cada película se encontraron diferencias significativas ($p<0.05$) entre cada una de ellas donde la luminosidad se encuentra en un 40.6 – 44.16, en coordenadas rojo/verde 0.74 – 2.13, coordenadas-amarillo/azul 4.55 – 6.92, cromaticidad 4.94 – 7.57 y el ángulo de tonalidad se encuentra en 5.26 a 6.71 en promedio. Con las coordenadas nos indica una tendencia al color “Double spanish White” según la aplicación Color Grab con las coordenadas obtenidas. El color del SCOBY puede cambiar con el paso de los días por acción de partículas antioxidantes que oscurecen la misma, además se ha reportado la influencia del color del fermentado en el aspecto del SCOBY final. (AL-Kalifawi y Hassan, 2014).

Tabla 7. Coordenadas CIE- $L^*a^*b^*$ de la celulosa producida en medio TM en los cinco consorcios de kombucha.

| CNS | L* | a* | b* | c* | H* |
|------------|------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| CFM | 75.2±2.8 ^a | 3.7±1.2 ^b | 18.9±4.6 ^{ab} | 19.3±7.4 ^{ab} | 78.9±2.3 ^a |
| CFR | 80.6±1.7 ^a | 1.9±0.6 ^{ab} | 13.6±1.5 ^b | 14.0±1.5 ^b | 83.1±1.9 ^{ab} |
| COR | 79.7±0.6 ^b | 0.9±1.9 ^a | 15.2±3.1 ^a | 15.2±3.4 ^a | 86.7±6.4 ^b |
| CPN | 81.3±0.8 ^a | 0.8±0.8 ^b | 13.4±1.6 ^b | 13.4±6.3 ^b | 86.4±1.6 ^a |
| CUV | 78.4±2.4 ^{ab} | 1.8±2.4 ^{ab} | 16.2±2.0 ^{ab} | 16.4±2.0 ^{ab} | 83.7±2.6 ^{ab} |

Nota. Media ± Desviación estándar. Las letras indican diferencia entre tratamientos

L = luminosidad; a = coordenadas rojo/verde; b = coordenadas amarillo/azul; c = cromaticidad; H = ángulo de tonalidad.

La opacidad es un parámetro que se debe de considerar cuando la película generada se requiera usar como material de empaque u otros usos (Tabla 8). En el caso de las obtenidas de los cinco consorcios hay una opacidad sin diferencias significativas ($p>0.05$) entrando en el rango de 38.01 a 41.17 %. De esta manera se obtiene un porcentaje de opacidad mayor (28.67%)

a los reportados en películas generadas en fermentaciones de té negro (Sharma et al., 2021), aunque esto indicaría menor transparencia en la CM, afectando su uso como material de empaque o plástico translucido.

Tabla 8. Opacidad de las películas de kombucha para los cinco consorcios

| Consorcio | Opacidad |
|--|-------------------------|
| CFM | 38.75±7.39 ^a |
| CFR | 38.91±8.15 ^a |
| COR | 38.01±8.48 ^a |
| CPN | 36.49±6.30 ^a |
| CUV | 41.17±2.62 ^a |
| Nota. Media ± desviaciones estándar. Las letras indican diferencias entre los tratamientos | |

Habiendo terminado la comparación de los cinco consorcios de trabajo originales se prosiguió a elegir solo dos de ellos, basándose en los mejores resultados obtenidos de rendimiento de CM, concentración de fenoles, capacidad antioxidante, proteína y menor concentración de azúcares en el fermentado. Por lo anterior los siguientes experimentos y resultados son utilizando como consorcios de trabajo COR y CPN.

6.2. Fase 2. Comparación del efecto de la concentración de TM en dos consorcios

6.2.1. Caracterización del fermentado de dos consorcios de kombucha

La producción de CM para consorcios COR y CPN por medio de fermentación de TM (Figura 14) a distintas concentraciones 2, 4 y 6 g/L. El parámetro de las proteínas (Figura 15a) nos indicara el crecimiento de los microorganismos, tal como lo sugiere Niño y Torres, (2010). En el consorcio COR presentó un menor contenido de proteínas en comparación a consorcio

CPN, en el cual se cuantificó una mayor producción de proteínas en los tratamientos con 4 y 6 gramos por litro. Es importante resaltar que los consorcios están compuestos de bacterias y levaduras que interactúan para producir kombucha y SCOBY. Sin embargo, en el consorcio CPN donde existe mayor contenido de proteínas y por ende microorganismo, no solamente está conformado por bacterias de interés como *Acetobacter*, sino también se encuentran bacterias ácido lácticas que pudieran interferir con la cuantificación de proteínas, generando mayor cantidad de proteínas que no necesariamente están involucradas directamente en los procesos naturales de producción de kombucha (Lee et al., 2021).

Los azúcares totales (Figura 15b) representan el crecimiento de los microorganismos al descender el contenido de la fuente de carbono en el fermentado en ambos consorcios evaluados. En cada uno de los consorcios no se encontró diferencia significativa entre tratamientos ($p>0.05$). Para facilitar el consumo del azúcar de interés, las levaduras hidrolizan la sacarosa en glucosa y fructuosa proporcionando formas más asimilables para las bacterias productoras de celulosa (Chakravorty et al., 2016). Comportamientos similares se han reportado en diversas investigaciones donde se utilizó sacarosa, glucosa, y melazas como fuentes de carbono (Ivanišová et al., 2019; Malbaša et al., 2008).

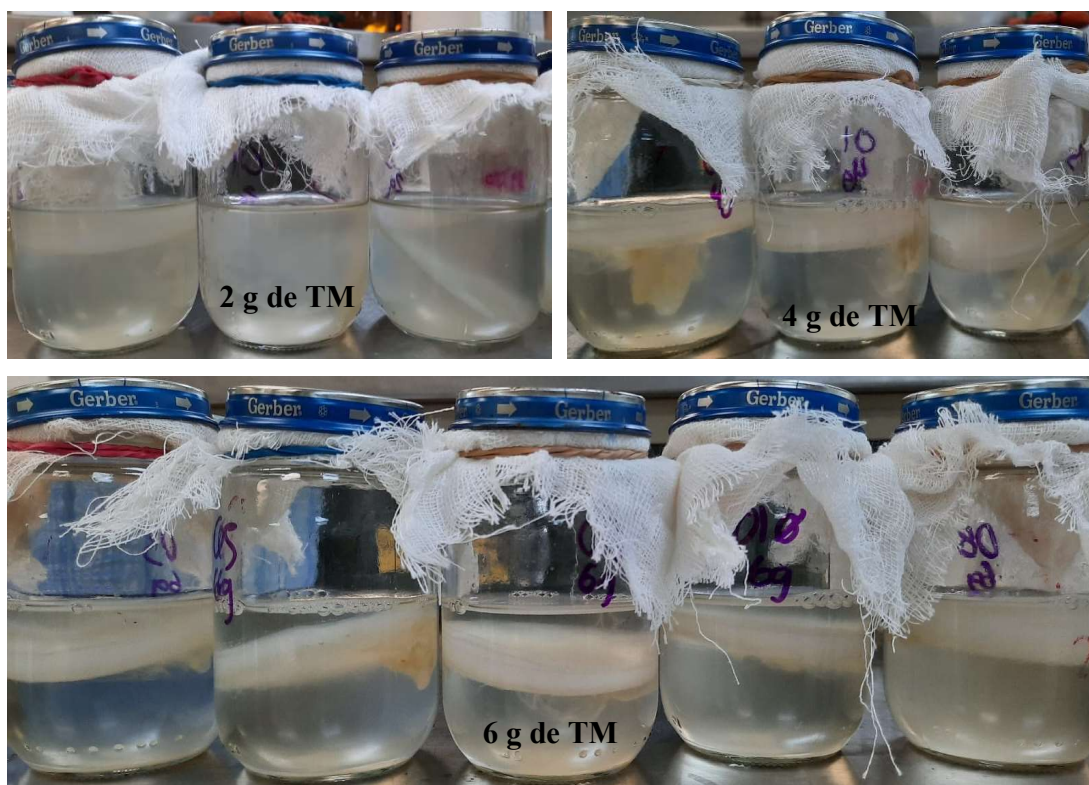


Figura 14. Consorcio COR expuesto a diferentes concentraciones de TM en un tiempo de fermentación de 12 días.

El descenso en los valores del pH y acidez (Figura 15c, d) muestran diferencias significativas ($p < 0.05$), teniendo para ambos consorcios en presencia de 6 g/L de TM un pH de 2.07 ± 0.0047 en COR y en CPN acidez en 1.476 ± 0.32 %. A mayor cantidad de TM aumentó la acidez del fermentado debido a las principalmente moléculas ácidas generadas durante el crecimiento microbiano. La producción de ácidos orgánicos son los principales encargados de que se obtengan condiciones de pH inferiores generados por las bacterias ácido acéticas (Nurikasari et al., 2020).

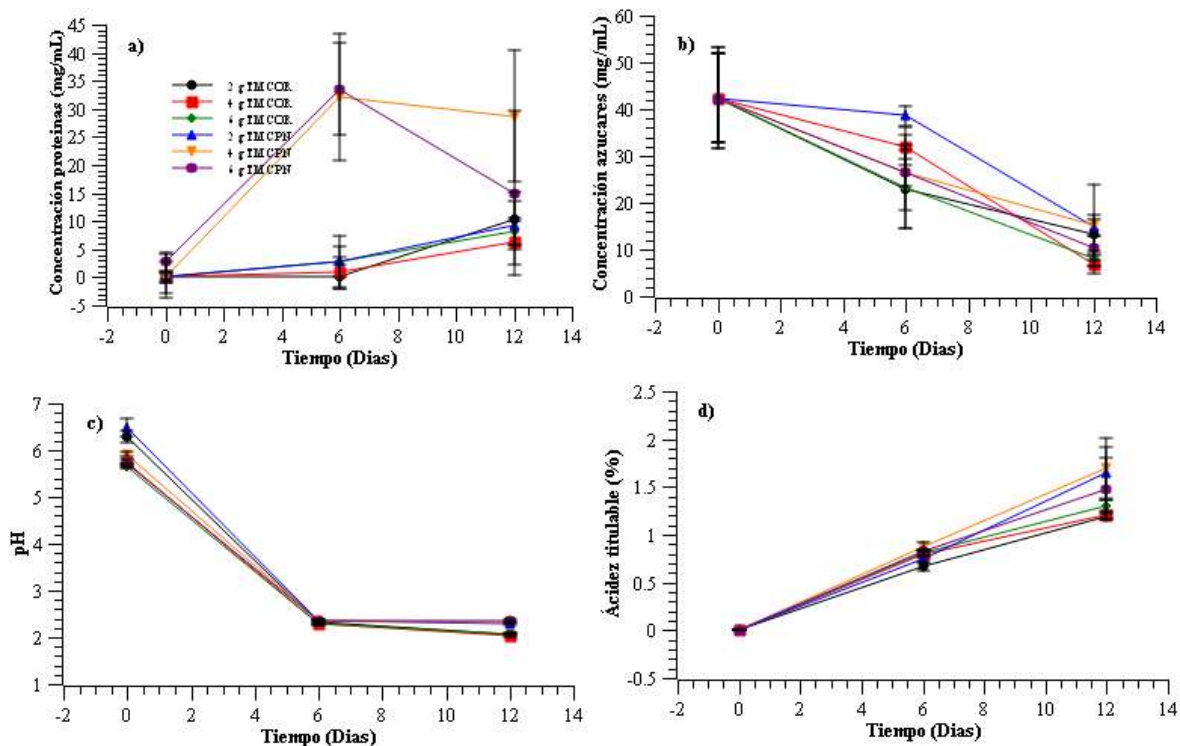


Figura 15. Caracterización de parámetros fisicoquímicos de la comparación de dos consorcios de kombucha. Cuantificación de proteínas (a), azúcares totales (b), pH (c) y acidez (d).

La producción de CM en ambos consorcios aumenta conforme la concentración de TM esto se puede relacionar con el contenido de azúcares en el TM como lo indica Márquez y colaboradores (2017) señalando la presencia de L-arabinosa, galactosa, ácido glucurónico, y L-ramnosa, manosa, xilosa y otros polisacáridos. Debido a lo anterior, se puede inferir una relación directa en el aumento de TM y mayor producción de CM por las bacterias ácido acéticas y las levaduras encargadas de mejorar la accesibilidad al azúcar de interés (Gupte et al., 2021). El consorcio COR (Figura 16) produce una mayor cantidad de CM en el mismo periodo de tiempo que CPN donde existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) generando en un periodo de 12 días

un rendimiento de 13.92 % en PS y 369.49 % en PH en comparación con el consorcio CPN en tratamientos con mayor cantidad de TM (Tabla 9).

Tabla 9. Parámetros físicos de celulosa bacteriana en ambos consorcios en tres concentraciones de TM.

| Contenido | RPS (%) | RPH (%) | E (mm) |
|-----------|---------------------------|-------------------------------|------------------------|
| COR | | | |
| 2g TM | 7.287 ± 6.44 ^a | 132.375 ± 99.82 ^b | 0.18±0.11 ^a |
| 4g TM | 14.2 ± 2.41 ^a | 337.994 ± 58.63 ^{ab} | 0.28±0.05 ^a |
| 6g TM | 13.92 ± 1.54 ^a | 369.49 ± 26.12 ^b | 0.31±0.05 ^a |
| CPN | | | |
| 2g TM | 2.42 ± 1.38 ^b | 15.22 ± 7.59 ^b | 0.06±0.01 ^b |
| 4g TM | 10.41 ± 1.12 ^a | 232.54 ± 26.00 ^a | 0.16±0.02 ^a |
| 6g TM | 11.35 ± 1.22 ^a | 276.72 ± 29.21 ^a | 0.18±0.03 ^a |

Nota. Media ± desviaciones estándar. Las letras indican la diferencia entre los tratamientos. RPS= rendimiento peso seco; RPH= rendimiento peso húmedo; E= espesor.

En TPC hay mayor cantidad de fenoles en el consorcio CPN a mayor concentración de TM (266.45±14.28 µg GAE/mL), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los consorcios (p>0.05). El consorcio COR conserva niveles altos solo en la concentración de 4g de TM (225.27±34.02 µg GAE/mL), en comparación con el fermentado control de té verde (Tabla 6) que tiene valores de 1477.64±186.86 µg GAE/mL, implicando el bajo nivel de fenoles presentes en TM. En la literatura se han reportado valores en té negro de 137.5±10.7 µg GAE/mL (La Torre et al., 2021) hasta 23.59 mg GAE/mL (Değirmencioğlu et al., 2020), equiparándose al primer valor reportado. En té de oolong un derivado de la planta *C. sinensis* se duplica la concentración hasta 485.18 µg GAE/mL (Tanticharakunsiri et al., 2020).

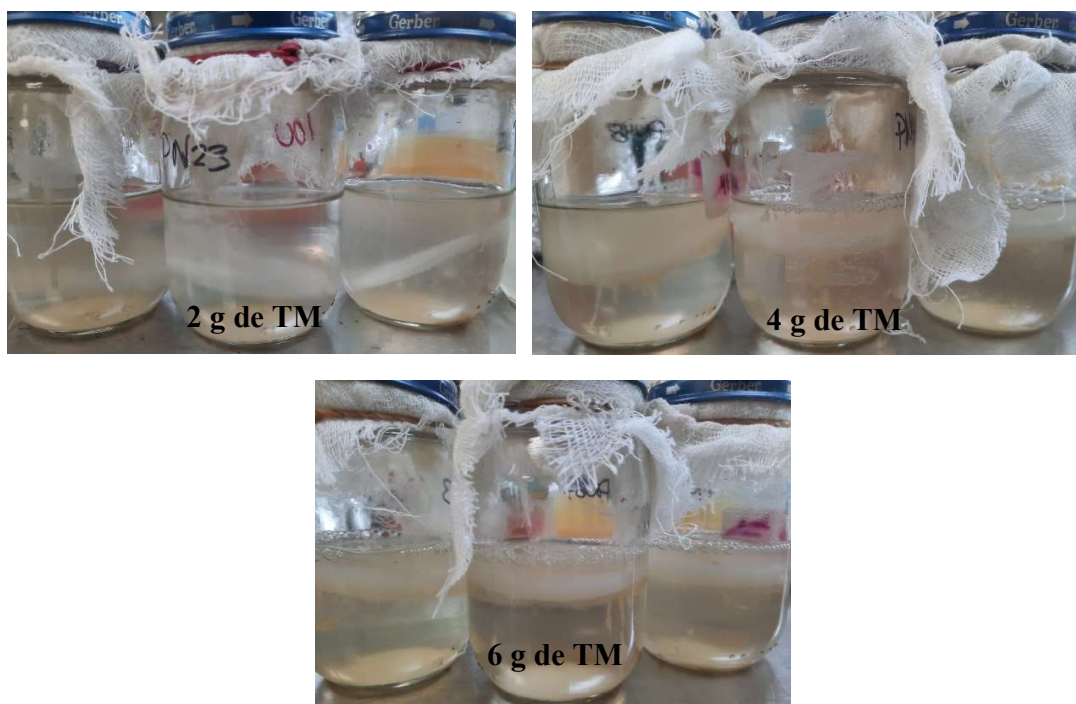


Figura 16. Consorcio CPN expuesto a diferentes concentraciones de TM en un tiempo de fermentación de 12 días.

En el consorcio CPN hay una relación en el aumento de concentración de fenoles con respecto a la concentración de TM (Figura 17a). El contenido de fenoles reside inicialmente en el sustrato con el cual se realice la fermentación, en hojas de moringa se han encontrado la presencia de compuestos fenólicos como cumarinas, triterpenos, esteroides, flavonoides, taninos, catequinas, entre otros, variando su contenido en las partes de la planta (Linares et al., 2018). También el aumento es debido a la acción de los microorganismos de kombucha encargados de hidrolizar polifenoles complejos para transformarlos en fenoles de menor peso molecular, aumentando el contenido final (La Torre et al., 2021).

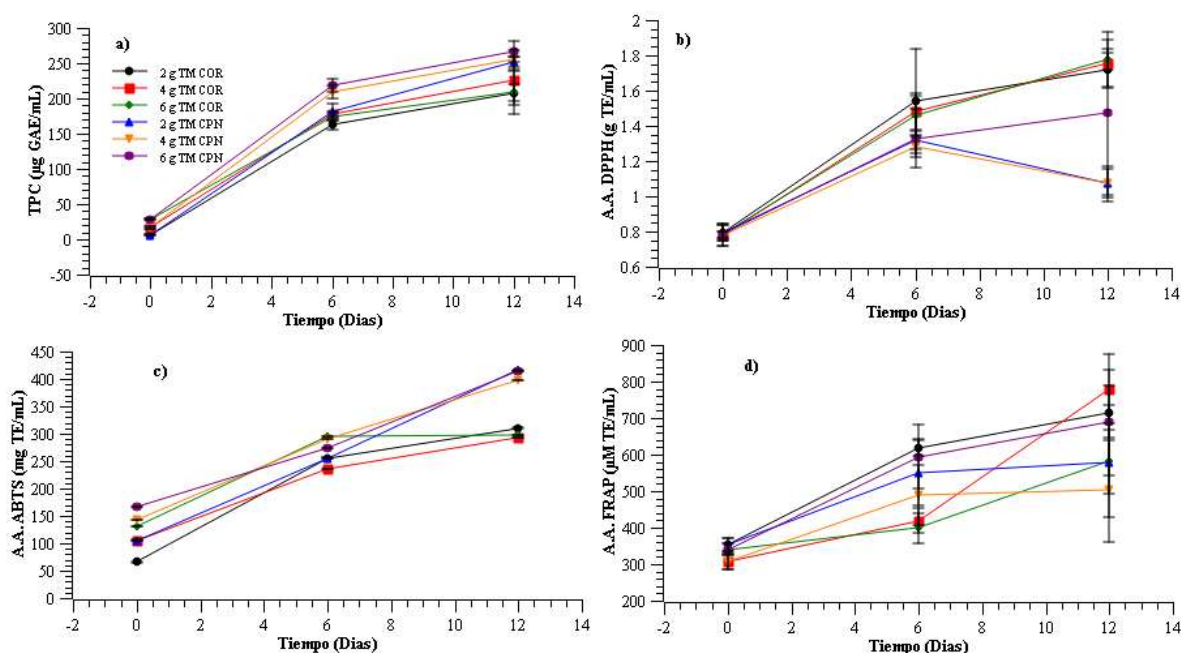


Figura 17. Contenido de compuestos fenólicos (a) y actividad antioxidante por DPPH (b), ABTS (c) y FRAP (d) en fermentado de TM a diferentes concentraciones.

La actividad antioxidante proveniente de la técnica DPPH que alcanzó su nivel más alto al finalizar la fermentación en COR 3.88 ± 0.06 mg TE/mL y CPN 3.25 ± 0.46 mg TE/mL, comparando con el control de té verde 12.55 ± 0.28 mg TE/mL (Figura 6), siendo mayor la capacidad antioxidante en el control en comparación de ambos consorcios. Teniendo un mayor contenido de actividad antioxidante (DPPH) en el consorcio COR en la concentración de 6 g TM /L (Figura 17b). En té negro se ha cuantificado 0.0026 mg TE/mL en un fermentado en resguardo por un mes (La Torre et al., 2021).

En ABTS hay una diferencia significativa en los tratamientos con el inóculo CPN en el cual prevalece con mayor contenido de actividad antioxidante (4.94 ± 0.15 mg TE/mL) y en COR

solo aumenta hasta 3.80 ± 0.59 mg TE/mL. En presencia de té negro se 0.0048 mg TE/mL para un fermentado en refrigeración (La Torre et al., 2021).

Por último, en FRAP hay diferencia significativa en todos los tratamientos obteniendo en COR 779.27 ± 75.41 μ M TE/mL y en CPN 715.27 ± 86.80 μ M TE/mL (Figura 17c). En los cuales hay un mayor contenido de actividad antioxidante en el consorcio COR. Sin embargo, es inferior a los 5.26 mM TE/mL en té negro, 5.67 mM TE/mL en té verde y con infusión de alga 0.86 mM TE/mL (Aung et al., 2021). No obstante, otras investigaciones en té negro se reportan 93.99 μ M TE/mL en 48 horas (Abuduaibifu et al., 2019), sugiriendo el cambio de esta variable dependiendo del consorcio y las condiciones de fermentación.

La concentración de actividad antioxidante depende de diversos factores como el sustrato, inóculo, tiempo de fermentación y fuente de carbono. En kombucha el sustrato proviene de polifenoles además de diferentes biomoléculas como vitaminas, ácidos y flavonoides (Massoud et al., 2021). Como lo menciona Jakubczyk y colaboradores (2020), la diversidad microbiana en consorcios de kombucha es un variable importante en el incremento de propiedades antioxidantes, lo cual influye en los dos consorcios analizados en el presente trabajo para encontrar diferentes valores.

El color de la CM (Tabla 10) expuesta a diferentes concentraciones de TM se encuentra ascendente en el parámetro L^* , demostrando un efecto por la cantidad de sustrato y no hay diferencia significativa en estos parámetros. En comparación, los consorcios muestran mayor luminosidad en CPN, tendiendo a ser un material más claro. Los colores que corresponde a cada uno de los tratamientos son #BAA078 denominado “Fallow”, #B68F5B y #B78D58 corresponden a “Barley Corn” en COR y en CPN son “Barley Corn” con el código #B78D58, “Parchment” siendo #D1C7AE y “Double Spanish White” siendo #D0C4A7 respectivamente,

correspondiendo claridad en CPN. Un factor que pudo influir en el color de la CM en seco es el tiempo y las partículas antioxidantes que se encuentran unidas (AL-Kalifawi y Hassan, 2014).

Tabla 10. Coordenadas CIE-L*a*b* en CM de dos consorcios de kombucha.

| | L* | a* | b* | c* | H* |
|--|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | COR | | | | |
| TM2 | 67.65±3.43 ^a | 5.50±2.85 ^b | 24.58±5.89 ^b | 25.25±6.36 ^b | 77.93±3.26 ^a |
| TM4 | 62.34±2.07 ^a | 10.05±2.25 ^a | 33.33±1.97 ^a | 34.89±2.48 ^a | 72.88±2.39 ^b |
| TM6 | 61.76±4.24 ^a | 11.83±1.60 ^a | 34.36±1.77 ^a | 36.39±1.89 ^a | 70.97±2.25 ^b |
| | CPN | | | | |
| TM2 | 81.15±3.57 ^a | 1.59±2.09 ^a | 11.63±2.96 ^b | 11.90±3.26 ^b | 84.44±7.92 ^a |
| TM4 | 80.51±0.94 ^a | 0.49±0.51 ^a | 13.78±0.23 ^{ab} | 13.81±0.26 ^{ab} | 87.93±2.14 ^a |
| TM6 | 79.61±0.61 ^a | 1.03±0.12 ^a | 16.14±0.58 ^a | 16.24±0.60 ^a | 86.25±0.72 ^a |
| Nota. Media ± desviaciones estándar. Las letras indican la diferencia entre los tratamientos. | | | | | |
| L = luminosidad; a = coordenadas rojo/verde; b = coordenadas amarillo/azul; c = cromaticidad; H = ángulo de tonalidad. | | | | | |

La opacidad determina el grado de transparencia de la CM, obteniendo valores que oscilan desde 36.01 a 37.91 % en COR, y en CPN entre 28.73 a 40.60 %, sin diferencia significativa ($p>0.05$) entre consorcios (Tabla 11). En comparación comparando con muestra de celulosa obtenida de la combinación de quitosano con SCOBY se obtiene un 28.67 % de opacidad (Sharma et al., 2021). Este es superior a porcentajes de opacidad en la mayoría de los tratamientos analizados a excepción de CPN en 4 g/L de TM. Los factores antes mencionados influirán como punto importante para el propósito del material.

Tabla 11. Valores de opacidad de la celulosa bacteriana de dos consorcios de kombucha

| | COR (%) | CPN (%) |
|--|-------------------------|--------------------------|
| TM2 | 37.91±3.76 ^a | 40.60±13.88 ^a |
| TM4 | 39.68±3.98 ^a | 24.85±6.36 ^a |
| TM6 | 36.01±4.69 ^a | 28.73±3.67 ^a |
| Nota. Media ± desviaciones estándar. Las letras indican diferencia entre los tratamientos | | |

La comparación de los dos consorcios y los tres tratamientos de concentración proporcionan información determinante para seleccionar un consorcio y una concentración de TM para la generación de celulosa bacteriana para el recubrimiento con mucílago de linaza. En la Figura 18 se observan los discos de CM obtenidos a diferentes concentraciones de TM.

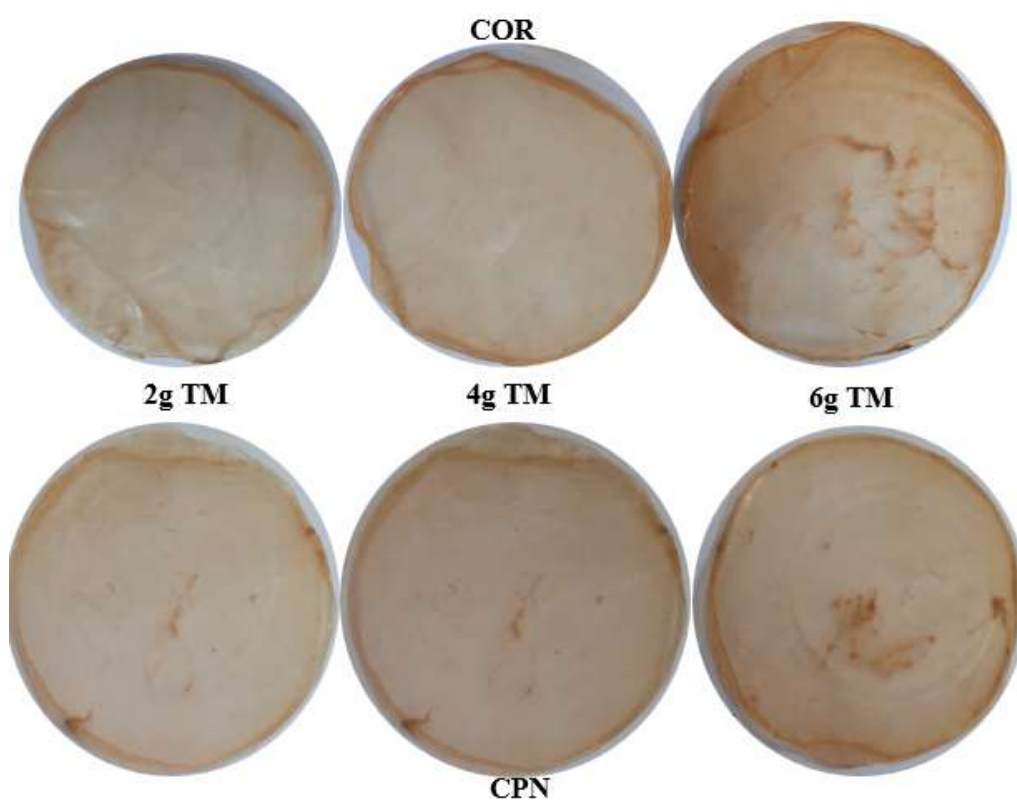


Figura 18. Películas de celulosa microbiana producidas en diferentes concentraciones de TM los consorcios COR y CPN.

6.3. Fase 3. Recubrimiento de películas con mucílago de linaza y análisis fisicoquímicos

6.3.1. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante

La extracción de compuestos fenólicos relacionados con la actividad antioxidante se realizó con tres disolventes, pero solo dos son los que obtuvieron los mejores resultados en conjunto con su facilidad de uso. El metanol y el etanol se utilizaron para extraer los compuestos de interés en las películas de kombucha recubiertas y no recubiertas con el mucílago de linaza (Tabla 12). Al ser expuestos a estos alcoholes, las películas lograron ser parcialmente disueltas para el análisis. En el TPC hay diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los disolventes, así como las películas, siendo las películas recubiertas extraídas con metanol (MR) el tratamiento con mayor contenido de fenoles. La concentración de fenoles en las películas asciende a $112.30 \mu\text{g GAE/mL}$. Siendo un valor inferior a $1477 \mu\text{g GAE/mL}$ en el fermentado de TM con el consorcio COR, lo cual es debido a la dispersión de los componentes fenólicos en el medio, y solo cierta cantidad de ellos se adhieren o son atrapados en la celulosa (Laavanya et al., 2021). Además, las películas recubiertas obtuvieron un aumento en la concentración de fenoles debido al mucílago de linaza. Ya que este contiene fenoles y flavonoides en abundancia (Anwar y Przybylski, 2012), el principal compuesto polifenólico es lignanos, compuestos polifenólicos tales como secoisolaciresinol, isolariciresinol, pinioresinol y mataresinol, entre otros (Figuerola et al., 2008).

Tabla 12. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante en celulosa microbiana recubierta con mucílago de linaza

| Tratamientos | Fenoles (μg GAE/mL) | DPPH (%) | ABTS (%) | FRAP (μg TE/mL) |
|--|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| MR | 112.30 \pm 5.38 ^b | 39.69 \pm 9.16 ^a | 77.24 \pm 2.39 ^{ab} | 582.86 \pm 2.68 ^a |
| MNR | 103.89 \pm 7.02 ^a | 41.67 \pm 0.77 ^a | 68.40 \pm 13.51 ^{ab} | 526.05 \pm 18.66 ^b |
| ER | 97.48 \pm 8.30 ^a | 45.48 \pm 14.14 ^a | 52.99 \pm 5.57 ^a | 169.23 \pm 10.17 ^d |
| ENR | 86.73 \pm 5.70 ^a | 31.68 \pm 1.53 ^a | 80.36 \pm 12.44 ^b | 226.05 \pm 21.28 ^c |
| Nota. Media \pm desviaciones estándar. Las letras indican la diferencia entre los tratamientos. | | | | |
| MR=Metanol recubiertas; MNR=Metanol no recubiertas; ER= Etanol recubiertas; ENR= Etanol no recubiertas. | | | | |

La mayor actividad antioxidante encontrada en las películas de CM entre los tratamientos fue con la combinación de etanol recubiertas (ER), etanol no recubiertas (ENR) y metanol recubiertas (MR), para todas las cuantificaciones, siendo ER el que obtuvo las mayores concentraciones, pero sin diferencia significativa ($p>0.05$) (Tabla 12). En DPPH podemos encontrar valores que oscilan en 31.68 \pm 1.53 a 45.48 \pm 14.14 % en películas recubiertas donde existe mayor cantidad de actividad. En comparación con películas utilizadas como sustitutos de materiales plásticos y conformados con celulosa bacteriana, donde se estimó un 21.19 % en películas de celulosa bacteriana con catequinas (Srikandace et al., 2018). Usando celulosa bacteriana sin aditivos se obtuvo un 10 % y con aditivos vegetales hasta un 50 % (Sukhtezari et al., 2017). En formulaciones que incluyen curcumina se cuantificó un 65.13 % (Ma et al., 2020). El aumento de las propiedades antioxidantes de las películas depende de la adición de aditivos que aporten moléculas con actividad antioxidante.

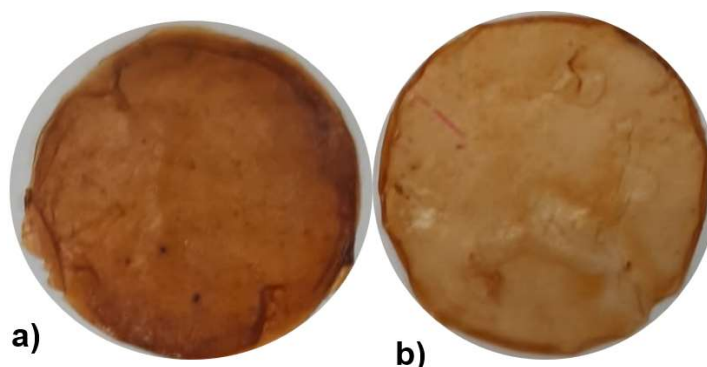


Figura 19. Películas de celulosa microbiana recubiertas con ML (a) y sin recubrir (b).

En ABTS se obtuvieron valores que ascienden a 80.36 ± 12.44 en ER y con diferencia significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos siendo las películas recubiertas con mayor actividad antioxidante en contra las no recubiertas (Tabla 12). En otras investigaciones han reportado un 30 % en celulosa bacteriana y 60 % en películas de celulosa recubiertas con quitosano (Cabañas-Romero et al., 2020), 5 % en solo celulosa bacteriana y 22 % en una película compuesta de curcumina y quitosano (Xu et al., 2021), la celulosa bacteriana en comparación con la generada en kombucha no contiene compuestos bioactivos debido a que se produce en medios de cultivo y no en sustratos vegetales o derivados, que proveen en su composición polifenoles, vitaminas y ácidos orgánicos los cuales son adheridos a la celulosa (Laavanya et al., 2021). Primeramente, hay un aumento en la actividad antioxidante en la celulosa, duplicando valores descritos, indicando la aportación del TM en compuestos de acción antioxidante y contra formulaciones de otros aditivos, la linaza proporciona mayores biocompuestos activos.

La técnica de FRAP es contundente con sus resultados con una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos siendo MR y MNR los que contienen altos niveles antioxidantes de 582.86 ± 2.68 $\mu\text{g TE/mL}$ y 526.05 ± 18.66 $\mu\text{g TE/mL}$ respectivamente. En el fermentado de

TM hay un aumento considerable siendo seis veces mayor con 3787.64 ± 3.79 $\mu\text{g TE/mL}$ en comparación a lo extraído de las películas recubiertas y sin recubrir.

La mayor obtención de compuestos fenólicos y actividad antioxidante con FRAP y ABTS fue con películas tratadas con metanol. Esto indica que el metanol es un disolvente con la capacidad de extraer la mayoría de los compuestos fenólicos y antioxidantes. Massoud y colaboradores (2021) reportan que la celulosa, al ser una capa compleja de biopolímeros, la solubilidad es limitada a algunos disolventes como pueden ser etanol, metanol y acetona, pero obteniendo mejores resultados en metanol debido a que este alcohol pueden romper los enlaces de hidrógeno intramoleculares e intermoleculares de la celulosa.

6.3.2. Actividad antimicrobiana

Las películas expuestas a diversas bacterias patógenas obtuvieron resultados positivos al generar halos de inhibición en todos los tratamientos expuestos, para el cual se evaluaron las películas recubiertas (PR) y no recubiertas (PNR), además de un antibiótico como control (Figura 20). En *E. coli* hay diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos con PNR generando un halo de 16.43 ± 3.00 mm de diámetro (Tabla 13), en literatura se reportan halos de 15.33 mm para películas compuestas de quitosano y kombucha (Ashrafi et al., 2018). En celulosa producida por *A. xylinum* hay diámetros de 8 mm y con aditivos a altas concentraciones de propóleo de 11 mm (Mocanu et al., 2019). Al igual en películas de *A. xylinum* recubiertas con quitosano hay 7.9 mm de halo (Pasaribu et al., 2019). Con lo antes mencionado podemos indicar la influencia de kombucha al ser añadida o mezclada con otros aditivos en comparación con las películas producidas solo con la principal bacteria generadora de celulosa bacteriana en

la cual, aunque sea modificada con algún recubrimiento o formulación no excede lo reportado en esta investigación.

Tabla 13. Actividad antimicrobiana de celulosa microbiana recubierta con mucílago de linaza

| | <i>E. coli</i> | <i>Salmonella sp.</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
|--|-------------------------|-------------------------|------------------------------|
| C (mm) | 16.55±2.29 ^a | 4.2±0.01 ^b | 4.2±0.01 ^c |
| PR (mm) | 10.85±1.82 ^b | 12.50±2.21 ^a | 5.8±0.40 ^b |
| PNR (mm) | 16.43±3.00 ^a | 6.15±0.43 ^b | 11.35±0.59 ^a |
| Nota. Media ± desviaciones estándar. Las letras indican la diferencia entre los tratamientos. | | | |
| C=Control; PR=películas recubiertas; PNR=películas no recubiertas. | | | |

En el caso de *Salmonella sp.* los halos de inhibición fueron diferentes significativamente entre los tratamientos ($p<0.05$). En PR se obtuvo el mayor diámetro con 12.50±2.21 mm. Entre PNR y el control (C) no hubo diferencia entre los tratamientos, difiriendo ampliamente de PR. En comparación con películas que se les añade aceite esencial de *Cinnamomum cassia* hay un halo de 15 mm (Srikadance et al., 2019) y no hay halo de inhibición cuando se utiliza celulosa bacteriana sin aditivos (Sajjad et al., 2019).

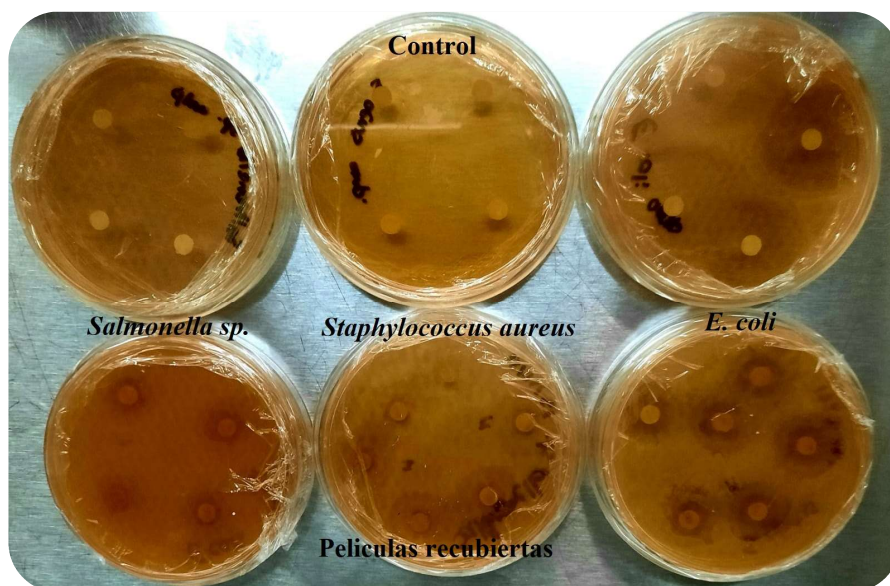


Figura 20. Ensayo antimicrobiano contra bacterias patógenas.

Para las bacterias Gram positivas se utilizó una cepa de *Staphylococcus aureus* con halos de inhibición de 11.35 ± 0.59 mm en PNR difiriendo significativamente ($p < 0.05$). En literatura la celulosa bacteriana no posee actividad antimicrobiana sin añadirle algún aditivo, por lo que se ha mezclado el quitosano con kombucha y se han obtenido 13.20 mm de halo de inhibición (Ashrafi et al., 2018). En otro estudio donde se añade quitosano y colágeno, disminuye la efectividad en 7.9 mm (Pasaribu et al., 2019). Con valores que rebasan lo obtenido podemos indicar la efectividad que contiene una película producida en TM.

La acidez que se genera en el fermentado por los niveles altos de ácido acético en conjunto a otros ácidos orgánicos producidos por kombucha producen inhibición del crecimiento de bacterias patógenas haciendo que la celulosa sea antimicrobiana en comparación a la celulosa producida exclusivamente en medio de cultivo por *A. xylinum* (Ivanišová et al., 2019; Coelho et al., 2020). La combinación de los compuestos antes mencionados contiene actividad antifúngica y contra patógenos relacionados a enfermedades en humanos (Mousavi et al., 2020). Un factor

importante es la disminución del pH el cual inhibe microorganismos acidificando el citoplasma y acumulando aniones ácidos en niveles tóxicos (Soares et al., 2021). Al cambiar el sustrato del fermentado cambian las moléculas que tienen potencial antimicrobiano, en moringa se han reportado compuestos fenólicos con esta cualidad como ácidos hidroxibenzoico, hidroxicinámicos, criptoclorogénico, isoquercetina, rutina, catequina, vainillina, resveratrol y naringenina (Prabakaran et al., 2018). Por lo anterior, se observa un poder antimicrobiano importante de CM generada en una fermentación con TM, la cual puede incrementarse con la adición de otros compuestos como lo es el mucílago de linaza.

7. CONCLUSIONES

- La presencia del género *Acetobacter* en los cinco consorcios de kombucha es el principal productor de CM y debido a que el contenido de estos microorganismos es mayor en COR este genera mayor producción de CM.
- El medio a base de TM funciona como sustrato para la fermentación de kombucha, además de contener compuestos bioactivos que generan contenido de fenoles y actividad antioxidante equiparable con otras plantas medicinales.
- Las variables de proteínas, azúcar, pH y acidez demuestran el crecimiento de los microorganismos.
- El rendimiento de la biomasa generada en los cinco consorcios es mayor con la CM húmeda, pero en seco disminuye considerablemente. El consorcio con mayor rendimiento de CM es el consorcio COR además de producir en menor tiempo la celulosa en comparación con los otros consorcios.
- El contenido de fenoles y actividad antioxidante en los cinco consorcios es menor a la producida en té verde y negro. Los consorcios con mejores resultados de producción de celulosa y capacidad antioxidante son CPN y COR.
- La producción de CM es directamente proporcional a la concentración de TM en el fermentado debido a su contenido de azúcares que aporta el TM, siendo el consorcio COR el mayor productor de masa en un periodo de 12 días en comparación a CPN.
- La relación del TPC y la actividad antioxidante se observa en CPN que posee valores más altos en ambos análisis, siendo el consorcio con mayor actividad antioxidante y por ende en TPC. Aunque los valores obtenidos son inferiores a los fermentados de té negro y té verde, indicando el bajo contenido que posee el TM. En el caso de

COR hay una actividad antioxidante alta en FRAP, pero es menor en todos los demás análisis en comparación con CPN haciéndolo un consorcio con alta producción de CM, pero baja actividad antioxidante.

- Las películas recubiertas contienen mayor concentración de compuestos fenólicos por el ML que aporta un amplio número de fenoles a las películas recubiertas.
- Las películas recubiertas y sin recubrir tienen efectividad contra bacterias Gram negativas y positivas, pero las películas sin recubrir tienen mayor actividad antimicrobiana con halos superiores a las recubiertas contra bacterias *E. coli* y *S. aureus* debido a que el recubrimiento interfiere la actividad.
- La actividad antimicrobiana en las películas se debe a los compuestos bioactivos provenientes del TM que se adhieren a la capa de celulosa formada.

8. RECOMENDACIONES

- La optimización de la concentración del sustrato a utilizar es fundamental debido a que puede afectar la producción de diferentes compuestos de interés.
- El biorreactor, una variable que limita la cantidad y tamaño de la película generada en los frascos utilizados, para cambiar el tamaño y forma de la celulosa se deben de buscar diferentes reactores con diversas capacidades porque esto influye en la producción de la celulosa y de la cantidad de ácidos orgánicos.
- Para conocer todos los microorganismos involucrados en la producción de kombucha se necesita un análisis metagenómico extenso para conocer a bacterias y levaduras presentes en los consorcios hasta nivel de especie.
- Un análisis fisicoquímico de los ácidos orgánicos, fenoles y algunas otras biomoléculas presentes son importantes para adjudicar el efecto antioxidante y antimicrobiano, además de conocer los efectos generan y en concentraciones son expulsados en el medio de fermentación.
- Como biomaterial, aún se requieren realizar diferentes análisis para conocer las capacidades físicas y mecánicas y poder evaluar su capacidad contra los productos utilizados en el mercado.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abd Rani, N. Z., Husain, K., & Kumolosasi, E. (2018). Moringa Genus: A Review of Phytochemistry and Pharmacology. *Frontiers in Pharmacology*, 9.
- Abdull Razis, A. F., Ibrahim, M. D., & Kntayya, S. B. (2014). Health Benefits of *Moringa oleifera*. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(20), 8571-8576.
- Abuduaibifu, A., & Tamer, C. E. (2019). Evaluation of physicochemical and bioaccessibility properties of goji berry kombucha. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(9).
- Aduri, P., Rao, K.A., Fatima, A., Kaul, P., Shalini, A., 2019. Study of biodegradable packaging material produced from SCOBY. *Research journal of life sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences* 5 (3), 389
- Ahmed, R. F., Hikal, M. S., & Abou-Taleb, K. A. (2020). Biological, chemical and antioxidant activities of different types Kombucha. *Annals of Agricultural Sciences*, 65(1), 35–41.04.001
- AL-Kalifawi E.J., & Hassan I.A. (2014). Factors Influence on the yield of Bacterial Cellulose of Kombucha (Khubdat Humza). *Baghdad Science Journal*. 11(3), 1420-1428.
- Anwar, F., Latif, S., Ashraf, M., & Gilani, A. H. (2006). *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytotherapy Research*, 21(1), 17-25.
- Anwar F., & Przybylski R., (2012). Effect of solvents extraction on total phenolics and antioxidant activity of extracts from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 11(3), 293-301
- Arıkan, M., Mitchell, A. L., Finn, R. D., & Gürel, F. (2020). Microbial composition of Kombucha determined using amplicon sequencing and shotgun metagenomics. *Journal of Food Science*, 85(2), 455-464.
- Ashrafi, A., Jokar, M., & Mohammadi Nafchi, A. (2018). Preparation and characterization of biocomposite film based on chitosan and kombucha tea as active food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 444-454.

- Aung, T., & Eun, J. B. (2021). Production and characterization of a novel beverage from laver (*Porphyra dentata*) through fermentation with kombucha consortium. *Food Chemistry*, 350, 129274.
- Baker, M. I., Walsh, S. P., Schwartz, Z., & Boyan, B. D. (2012). A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 100B (5), 1451–1457.
- Battikh, H., Bakhrouf, A., & Ammar, E. (2012). Antimicrobial effect of Kombucha analogues. *LWT - Food Science and Technology*, 47(1), 71–77.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Caamal I., Pereira F., Madera T. (2011). Caracterización óptica y mecánica de películas comestibles a base de mezclas binarias de almidones de *Phaseolus lunatus* L, *Manihot esculenta* Crantz y *Zea mays* L. *Rev Iber Tecn Post*. 12, 101–109
- Cabañas-Romero, L. V., Valls, C., Valenzuela, S. V., Roncero, M. B., Pastor, F. I. J., Diaz, P., & Martínez, J. (2020). Bacterial Cellulose–Chitosan Paper with Antimicrobial and Antioxidant Activities. *Biomacromolecules*, 21(4), 1568–1577.
- Cabrera, C., Artacho, R., & Giménez, R. (2006). Beneficial Effects of Green Tea—A Review. *Journal of the American College of Nutrition*, 25(2), 79–99.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Peña, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., ... Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5), 335-336.
- Cardoso, R. R., Neto, R. O., dos Santos D’Almeida, C. T., do Nascimento, T. P., Pressete, C. G., Azevedo, L., Martino, H. S. D., Cameron, L. C., Ferreira, M. S. L., & Barros, F. A. R. D. (2020). Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which

- impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food Research International*, 128, 108782.
- Carreño, L.D., Caicedo, L.A. & Martínez, C.A. (2012). Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: Una revisión. *Ing. Cienc*, 8, 307–335.
- Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D., & Gachhui, R. (2016). Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology*, 220, 63–72.
- Chu, S. C., & Chen, C. (2006). Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chemistry*, 98(3), 502–507.
- Cielecka, I., Szustak, M., Kalinowska, H., Gendaszewska-Darmach, E., Ryngajłło, M., Maniukiewicz, W., & Bielecki, S. (2019). Glycerol-plasticized bacterial nanocellulose-based composites with enhanced flexibility and liquid sorption capacity. *Cellulose*, 26(9), 5409–5426.
- Coelho, R. M. D., Almeida, A. L., Amaral, R. Q. G., Mota, R. N., & Sousa, P. H. M. (2020). Kombucha: Review. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 22, 100272.
- Dash, P. K., Rai, R., Mahato, A. K., Gaikwad, K., & Singh, N. K. (2017). Transcriptome Landscape at Different Developmental Stages of a Drought Tolerant Cultivar of Flax (*Linum usitatissimum*). *Frontiers in Chemistry*, 5, 1–6.
- de Filippis, F., Troise, A. D., Vitaglione, P., & Ercolini, D. (2018). Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. *Food Microbiology*, 73, 11–16.
- Değirmencioğlu, N., Yıldız, E., Sahan, Y., Güldas, M., & Gürbüz, O. (2020). Impact of tea leaves types on antioxidant properties and bioaccessibility of kombucha. *Journal of Food Science and Technology*, 58(6), 2304–2312.
- DeMerlis, C., & Schoneker, D. (2003). Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food and Chemical Toxicology*, 41(3), 319–326.

- Domskiene, J., Sederaviciute, F., & Simonaityte, J. (2019). Kombucha bacterial cellulose for sustainable fashion. *International Journal of Clothing Science and Technology*, 31(5), 644–652.
- Dutta, H., & Paul, S. K. (2019). Kombucha Drink: Production, Quality, and Safety Aspects. *Production and Management of Beverages*, 259-288.
- Emiljanowicz, K. E., & Malinowska-Pańczyk, E. (2019). Kombucha from alternative raw materials – The review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(19), 3185-3194.
- Esa, F., Tasirin, S. M., & Rahman, N. A. (2014). Overview of Bacterial Cellulose Production and Application. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 113-119.
- Fakhouri, F. M., Martelli, S. M., Caon, T., Velasco, J. I., & Mei, L. H. I. (2015). Edible films and coatings based on starch/gelatin: Film properties and effect of coatings on quality of refrigerated Red Crimson grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 109, 57-64.
- Figuerola, F., Muñoz, O., & Estévez, A. M. (2008). La linaza como fuente de compuestos bioactivos para la elaboración de alimentos. *Agro Sur*, 36 (2), 49-58.
- Garlapati, D., Charankumar, B., Ramu, K., Madeswaran, P., & Ramana Murthy, M. V. (2019). A review on the applications and recent advances in environmental DNA (eDNA) metagenomics. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 18(3), 389-411.
- Gomes, R. J., Borges, M. D. F., Rosa, M. D. F., Castro-Gómez, R. J. H., & Spinosa, W. A. (2018). Acetic Acid Bacteria in the Food Industry: Systematics, Characteristics and Applications. *Food Technology and Biotechnology*, 56(2).
- Góes-Neto, A., Kukhareno, O., Orlovska, I., Podolich, O., Imchen, M., Kumavath, R., Kato, R. B., Carvalho, D. S., Tiwari, S., Brenig, B., Azevedo, V., Reva, O., Vera, J. P., Kozyrovska, N., & Barh, D. (2021). Shotgun metagenomic analysis of kombucha mutualistic community exposed to Mars-like environment outside the International Space Station. *Environmental Microbiology*, 23(7), 3727–3742.

- Greenwalt, C. J., Steinkraus, K. H., & Ledford, R. A. (2000). Kombucha, the Fermented Tea: Microbiology, Composition, and Claimed Health Effects. *Journal of Food Protection*, 63(7), 976–981.
- Gupte, Y., Kulkarni, A., Raut, B., Sarkar, P., Choudhury, R., Chawande, A., Kumar, G. R. K., Bhadra, B., Satapathy, A., Das, G., Vishnupriya, B., & Dasgupta, S. (2021). Characterization of nanocellulose production by strains of *Komagataeibacter* sp. isolated from organic waste and Kombucha. *Carbohydrate Polymers*, 266, 118176.
- Gutiérrez, T. J. (2017). Chitosan Applications for the Food Industry. *Chitosan*, 183–232.
- Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2008). Metagenomics. *Nature*, 455(7212), 481-483.
- Hussain, Z., Sajjad, W., Khan, T., & Wahid, F. (2019). Production of bacterial cellulose from industrial wastes: a review. *Cellulose*, 26(5), 2895-2911.
- Illana, C. (2007). The fungi Kombucha. *Bol. Soc. Micol. Madrid* 31: 269-272.
- Ivanišová, E., Meňhartová, K., Terentjeva, M., Harangozo, U., Kántor, A., & Kačániová, M. (2019). The evaluation of chemical, antioxidant, antimicrobial and sensory properties of kombucha tea beverage. *Journal of Food Science and Technology*, 57(5), 1840–1846.
- Jakubczyk, K., Kałduńska, J., Kochman, J., & Janda, K. (2020b). Chemical Profile and Antioxidant Activity of the Kombucha Beverage Derived from White, Green, Black and Red Tea. *Antioxidants*, 9(5), 447.
- Jayabalan, R., Subathradevi, P., Marimuthu, S., Sathishkumar, M., & Swaminathan, K. (2008). Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food Chemistry*, 109(1), 227–234.
- Jayabalan, R., Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., & Sathishkumar, M. (2014). A Review on Kombucha Tea-Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 538-550.

- Kaashyap, M., Cohen, M., & Mantri, N. (2021). Microbial Diversity and Characteristics of Kombucha as Revealed by Metagenomic and Physicochemical Analysis. *Nutrients*, 13(12), 4446.
- Kabanov, V. L., & Novinyuk, L. V. (2020). Chitosan application in food technology: a review of recent advances. *Food systems*, 3(1), 10–15.
- Kaewkod, T., Bovonsombut, S., & Tragoolpua, Y. (2019). Efficacy of Kombucha Obtained from Green, Oolong, and Black Teas on Inhibition of Pathogenic Bacteria, Antioxidation, and Toxicity on Colorectal Cancer Cell Line. *Microorganisms*, 7(12), 700.
- Kallel, L., Desseaux, V., Hamdi, M., Stocker, P., & Ajandouz, E. H. (2012). Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. *Food Research International*, 49(1), 226–232.
- Kerstens, K., Lisdiyanti, P., Komagata, K., & Swings, J. (2006). The Family Acetobacteraceae: The Genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, and *Kozakia*. *The Prokaryotes*, 163–200.
- Kiple, K.F. & K.C. Ornelas (2000). *The Cambridge world history of food*. Cambridge University Press. Vol. I, 1120.
- La Torre, C., Fazio, A., Caputo, P., Plastina, P., Caroleo, M. C., Cannataro, R., & Cione, E. (2021). Effects of Long-Term Storage on Radical Scavenging Properties and Phenolic Content of Kombucha from Black Tea. *Molecules*, 26(18), 5474.
- Laavanya, D., Shirkole, S., & Balasubramanian, P. (2021). Current challenges, applications and future perspectives of SCOBY cellulose of Kombucha fermentation. *Journal of Cleaner Production*, 295, 126454.
- Laureys, D., Britton, S. J., & de Clippeleer, J. (2020). Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 78(3), 165–174.
- Lee, K. R., Jo, K., Ra, K. S., Suh, H. J., & Hong, K. B. (2021). Kombucha fermentation using commercial kombucha pellicle and culture broth as starter. *Food Science and Technology*. Published.

- Linares, C., Quiñonez-Gálvez, J., Pérez, A. T., Carvajal, C. C., Rivas, M., Cid, G. A., Pérez, L., La Rosa, S., & Capdesuñer, Y. K. (2018). Obtención de extractos fenólicos foliares de *Moringa oleífera* Lam mediante el uso de diferentes métodos de extracción. *Biotecnología vegetal*, 18 (1), 47-56.
- López-Legarda, X., Taramuel-Gallardo, A., Arboleda-Echavarría, C., Segura-Sánchez, F., & Restrepo-Bentacur, L.F. (2017). Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales. *Revista Cubana de Química*, 29(2), 180–198.
- Luczaj, W., & Skrzydlewska, E. (2005). Antioxidative properties of black tea. *Preventive Medicine*, 40(6), 910–918.
- Ma, X., Chen, Y., Huang, J., Lv, P., Hussain, T., & Wei, Q. (2020). In situ formed active and intelligent bacterial cellulose/cotton fiber composite containing curcumin. *Cellulose*, 27(16), 9371–9382.
- Malbaša, R., Lončar, E., & Djurić, M. (2008). Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. *Food Chemistry*, 106(3), 1039-1045.
- Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., & Čanadanović-Brunet, J. M. (2011). Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food Chemistry*, 127(4), 1727-1731.
- Marquez, I., Bastidas, T., Fernández, G.K., Campo, M., Jaramillo, G.G. & Rojas, L. (2017). Estudio farmacognóstico preliminar de tallo y raíz de la especie *Moringa Oleífera* lam cosechada en Machala. *Revista cubana de plantas medicinales*, 22(1).
- Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2014). Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiology*, 38, 171–178.
- Martínez, J., Valenzuela, L., Jayabalan, R., Huerta, J., & Escalante-Aburto, A. (2018). A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CyTA - Journal of Food*, 16(1), 390–399.

- Massoud, R., Jafari-Dastjerdeh, R., Naghavi, N., & Khosravi-Darani, K. (2021). All Aspects of Antioxidant Properties of Kombucha Drink. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 12(3), 4018–4027. <https://doi.org/10.33263/briac123.40184027>
- Menezes, L., Sardaro, M. S., Duarte, R., Mazzon, R., Neviani, E., Gatti, M., & De Dea Lindner, J. (2020). Sourdough bacterial dynamics revealed by metagenomic analysis in Brazil. *Food Microbiology*, 85, 103302.
- Mocanu, A., Isopencu, G., Busuioc, C., Popa, O. M., Dietrich, P., & Socaciu-Siebert, L. (2019). Bacterial cellulose films with ZnO nanoparticles and propolis extracts: Synergistic antimicrobial effect. *Scientific Reports*, 9(1).
- Morales, D. (2020). Biological activities of kombucha beverages: The need of clinical evidence. *Trends in Food Science & Technology*, 105, 323-333.
- Mousavi, S. M., Hashemi, S. A., Zarei, M., Gholami, A., Lai, C. W., Chiang, W. H., Omidifar, N., Bahrani, S., & Mazraedoost, S. (2020). Recent Progress in Chemical Composition, Production, and Pharmaceutical Effects of Kombucha Beverage: A Complementary and Alternative Medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020, 1–14.
- Mukadam, T. A., Punjabi, K., Deshpande, S. D., Vaidya, S. P., & Chowdhary, A. S. (2016). Isolation and Characterization of Bacteria and Yeast from Kombucha Tea. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(6), 32-41.
- Neera, Ramana, K. V., & Batra, H. V. (2015). Occurrence of Cellulose-Producing *Gluconacetobacter* spp. in Fruit Samples and Kombucha Tea, and Production of the Biopolymer. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(4), 1162-1173.
- Niño, L. & Torres, R. (2010). Implementación de diferentes técnicas analíticas para la determinación de biomasa bacteriana de cepas *Pseudomonas putida* biodegradadoras de fenol. *Revista ION*. 23(1), 41-46.
- Nurikasari, M., Puspitasari, Y., & Siwi, R. P. Y. (2020). Characterization and Analysis Kombucha Tea Antioxidant Activity Based On Long Fermentation as a Beverage Functional. *Journal of Global Research in Public Health*, 2(2), 90-96.

- Pasaribu, K. M., Gea, S., Ilyas, S., & Tamrin. (2019). The Effectiveness of Chitosan as an Antimicrobial on Bacterial Cellulose-based Scaffold Skin Tissue Engineering. Proceedings of the 1st International Conference on Chemical Science and Technology Innovation, ISBN 978-989-758-415-2, 178-181.
- Picheth, G. F., Pirich, C. L., Sierakowski, M. R., Woehl, M. A., Sakakibara, C. N., de Souza, C. F., Martin, A. A., da Silva, R., & de Freitas, R. A. (2017). Bacterial cellulose in biomedical applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 97-106.
- Prabakaran, M., Kim, S. H., Sasireka, A., Chandrasekaran, M., & Chung, I. M. (2018). Polyphenol composition and antimicrobial activity of various solvent extracts from different plant parts of *Moringa oleifera*. *Food Bioscience*, 26, 23–29.
- Primiani, C. N., Pujiati, Mumtahanah, M., & Ardhi, W. (2018). Kombucha fermentation test used for various types of herbal teas. *Journal of Physics: Conference Series*, 1025, 012073.
- Ramírez-Tapias, Y. A., Peltzer, M. A., Delgado, J. F., & Salvay, A. G. (2020). Kombucha Tea By-product as Source of Novel Materials: Formulation and Characterization of Films. *Food and Bioprocess Technology*, 13(7), 1166-1180.
- Rodrigues, F. J., Cedran, M. F., & Garcia, S. (2018). Influence of Linseed Mucilage Incorporated into an Alginate-Base Edible Coating Containing Probiotic Bacteria on Shelf-Life of Fresh-Cut Yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Food and Bioprocess Technology*, 11(8), 1605–1614.
- Rojas, J. J., García, A. M., & López, A. J. (2005). Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 4(2), 28-32.
- Sajjad, W., Khan, T., Ul-Islam, M., Khan, R., Hussain, Z., Khalid, A., & Wahid, F. (2019). Development of modified montmorillonite-bacterial cellulose nanocomposites as a novel substitute for burn skin and tissue regeneration. *Carbohydrate Polymers*, 206, 548–556.
- Sarkaya, P., Akan, E., & Kinik, O. (2021). Use of kombucha culture in the production of fermented dairy beverages. *LWT*, 137, 110326.

- Sharifudin, S. A., Ho, W. Y., Yeap, S. K., Abdullah, R., & Koh, S. P. (2021). Fermentation and characterisation of potential kombucha cultures on papaya-based substrates. *LWT*, 151, 112060.
- Sharma, C., Bhardwaj, N. K., & Pathak, P. (2021). Static intermittent fed-batch production of bacterial nanocellulose from black tea and its modification using chitosan to develop antibacterial green packaging material. *Journal of Cleaner Production*, 279, 123608.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Oxidants and Antioxidants Part A*, 152–178.
- Soares, M. G., de Lima, M., & Reolon Schmidt, V. C. (2021). Technological aspects of kombucha, its applications and the symbiotic culture (SCOBY), and extraction of compounds of interest: A literature review. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 539–550.
- Sreeramulu, G., Zhu, Y., & Knol, W. (2000). Kombucha Fermentation and Its Antimicrobial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2589–2594.
- Srikandace, Y., Sylviana, Artanti, N., Udin, Z., & Hanafi, M. (2018). Antioxidant Activity of Bacterial Cellulose Based Edible Films Incorporated with Catechin and *Citrus aurantium* L (Bergamot) Essential Oil. *Journal of Engineering and Science Research*, 2(6), 30–36.
- Srikandace, Y., Giovani, I., & Artanti, N. (2019). Bioactivity of Biocellulose Based Film Incorporated with *Cinnamomum cassia* and *Citrus maxima* Oils. *Advances in Natural and Applied Sciences*. 13(2), 31-35
- Stohs, S. J., & Hartman, M. J. (2015). Review of the Safety and Efficacy of *Moringa oleifera*. *Phytotherapy Research*, 29(6), 796–804.
- Suhas, Gupta, V. K., Carrott, P. J. M., Singh, R., Chaudhary, M., & Kushwaha, S. (2016). Cellulose: A review as natural, modified and activated carbon adsorbent. *Bioresource Technology*, 216, 1066-1076.

- Sukhtezari, S., Almasi, H., Pirsa, S., Zandi, M., & Pirouzifard, M. (2017). Development of bacterial cellulose based slow-release active films by incorporation of *Scrophularia striata* Boiss. extract. *Carbohydrate Polymers*, 156, 340–350.
- Sun, T. Y., Li, J. S., & Chen, C. (2015). Effects of blending wheatgrass juice on enhancing phenolic compounds and antioxidant activities of traditional kombucha beverage. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(4), 709–718.
- Tanticharakunsiri, W., Mangmool, S., Wongsariya, K., & Ochaikul, D. (2020). Characteristics and upregulation of antioxidant enzymes of kitchen mint and oolong tea kombucha beverages. *Journal of Food Biochemistry*, 45(1).
- Teoh, A. L., Heard, G., & Cox, J. (2004). Yeast ecology of Kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 95(2), 119-126.
- Teyssier, C., & Hamdouche, Y. (2016). *Acetic acid bacteria: Prospectives applications in food biotechnology*. Northwestern, FL: CRC Press.
- Tran, T., Grandvalet, C., Verdier, F., Martin, A., Alexandre, H., & Tourdot-Maréchal, R. (2020). Microbiological and technological parameters impacting the chemical composition and sensory quality of kombucha. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 2050–2070.
- Treviño-Garza, M. Z., Correa-Cerón, R. C., Ortiz-Lechuga, E. G., Solís-Arévalo, K. K., Castillo-Hernández, S. L., Gallardo-Rivera, C. T., & Arévalo Niño, K. (2019). Effect of Linseed (*Linum usitatissimum*) Mucilage and Chitosan Edible Coatings on Quality and Shelf-Life of Fresh-Cut Cantaloupe (*Cucumis melo*). *Coatings*, 9(6), 368.
- Van Nguyen, S., & Lee, B. K. (2021). Microfibrillated cellulose film with enhanced mechanical and water-resistant properties by glycerol and hot-pressing treatment. *Cellulose*.
- Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J. P., & Taillandier, P. (2018). Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of Food Science*, 83(3), 580–588.
- Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J. P., Renard, T., Rollan, S., & Taillandier, P. (2019). Impact of fermentation conditions on the production of bioactive

- compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. *Process Biochemistry*, 83, 44–54.
- Villarreal-Soto, S. A., Bouajila, J., Pace, M., Leech, J., Cotter, P. D., Souchard, J. P., Taillandier, P., & Beaufort, S. (2020). Metabolome-microbiome signatures in the fermented beverage, Kombucha. *International Journal of Food Microbiology*, 333, 108778.
- Vitas, J. S., Cvetanović, A. D., Mašković, P. Z., Švarc-Gajić, J. V., & Malbaša, R. V. (2018). Chemical composition and biological activity of novel types of kombucha beverages with yarrow. *Journal of Functional Foods*, 44, 95–102.
- Vitas, J., Vukmanovic, S., Cakarevic, J., Popovic, L., & Malbasa, R. (2020). Kombucha fermentation of six medicinal herbs: Chemical profile and biological activity. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 26(2), 157-170.
- Vohra, B. M., Fazry, S., Sairi, F., & Babul-Airianah, O. (2019). Effects of medium variation and fermentation time on the antioxidant and antimicrobial properties of Kombucha. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 15(2–1), 298–302.
- Xu, Y., Liu, X., Jiang, Q., Yu, D., Xu, Y., Wang, B., & Xia, W. (2021). Development and properties of bacterial cellulose, curcumin, and chitosan composite biodegradable films for active packaging materials. *Carbohydrate Polymers*, 260, 117778.
- Zaitoun, M., Ghanem, M. & Harphoush, S. (2018). Sugars: Types and Their Functional Properties in Food and Human Health. *International Journal of Public Health Research*. 6 (4), 93-99.
- Zhang, S., Cheng, M., Li, Z., Guan, S., Cai, B., Li, Q., & Rong, S. (2020). Composition and biological activity of rose and jujube kernel after fermentation with kombucha SCOBY. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(10).
- Zhu, C., Li, F., Zhou, X., Lin, L., & Zhang, T. (2013). Kombucha-synthesized bacterial cellulose: Preparation, characterization, and biocompatibility evaluation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102(5), 1548–1557.
- Zhu, H., Narakathu, B. B., Fang, Z., Tausif Aijazi, A., Joyce, M., Atashbar, M., & Hu, L. (2014). A gravure printed antenna on shape-stable transparent nanopaper. *Nanoscale*, 6(15), 9110.

- Ziemlewska, A., Nizioł-Lukaszewska, Z., Bujak, T., Zagórska-Dziok, M., Wójciak, M., & Sowa, I. (2021). Effect of fermentation time on the content of bioactive compounds with cosmetic and dermatological properties in Kombucha Yerba Mate extracts. *Scientific Reports*, 11(1).
- Zofia, N. U., Aleksandra, Z., Tomasz, B., Martyna, Z. D., Magdalena, Z., Zofia, H. B., & Tomasz, W. (2020). Effect of Fermentation Time on Antioxidant and Anti-Ageing Properties of Green Coffee Kombucha Ferments. *Molecules*, 25(22), 5394.
- Zubaidah, E., Ifadah, R. A., & Afgani, C. A. (2019). Changes in chemical characteristics of kombucha from various cultivars of snake fruit during fermentation. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 230, 012098.
- Zuk, M., Richter, D., Matuła, J., & Szopa, J. (2015). Linseed, the multipurpose plant. *Industrial Crops and Products*, 75, 165–177.