

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**Evaluación de las variables de fermentación para la obtención de kombucha a partir de *Cymbopogon citratus*, *Thymus vulgaris* y *Mentha spicata***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**PRESENTA:**

**DANTE DANIEL PEREZ PUENTE**

**GENERAL ESCOBEDO, N.L.**

**MARZO DE 2024**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**Evaluación de las variables de fermentación para la obtención de kombucha a partir de *Cymbopogon citratus*, *Thymus vulgaris* y *Mentha spicata***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**PRESENTA:**

**DANTE DANIEL PEREZ PUENTE**

**GENERAL ESCOBEDO, N.L.**

**MARZO DE 2024**

ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
INGENIERIA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

COMITÉ PARTICULAR



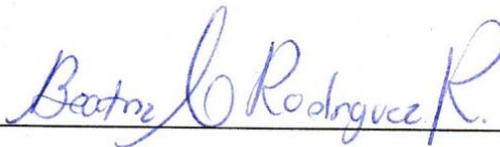
---

Dra. Julia Mariana Márquez Reyes  
Director(a) de Tesis



---

PhD. Gerardo Méndez Zamora  
Co-Director



---

Dra. Beatriz Adriana Rodríguez Romero  
Asesora



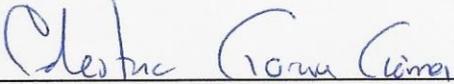
---

Dr. Humberto Rodríguez Fuentes  
Asesor

ESTA TESIS FUE APROBADA EN FORMATO, POR EL COMITÉ DE POSGRADO,  
ATENDIENDO A EL ARTÍCULO 123, DEL REGLAMENTO GENERAL DEL  
SISTEMA DE POSGRADO DE LA UANL.

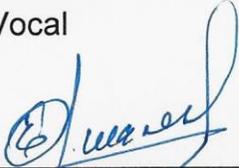
COMITÉ DE POSGRADO

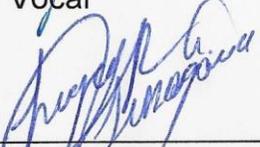
  
Dra. Juanita Guadalupe Gutiérrez Soto  
Presidenta

  
Dr. Celestino García Gómez  
Secretario

  
Dra. Lidia Rosaura Salas Cruz  
Vocal

  
Ph.D. Rigoberto Eustacio Vázquez Alvarado  
Vocal

  
Ph.D. Emilio Olivares Sáenz  
Vocal

  
Dra. Sughey Ramona Sinagawa García  
Vocal

  
Dr. Guillermo Niño Medina  
Vocal

## DEDICATORIA

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, por permitirme concluir mis estudios profesionales y al CONAHCYT por los apoyos brindados a los programas educativos.

Este trabajo y este proyecto está dedicado especialmente a aquellos quienes no podrán ver este logro. Estoy seguro de que con cada paso que doy me convierto en una mejor persona, así como ellos siempre lo esperaban de mí.

Además, lo dedico a todos aquellos que confiaron en mí, pues son y serán siempre la energía que necesité y necesitaré para seguir adelante.

*"Siempre quise tener una mascota, solo pensaba que sería un pez dorado, ¡O un dinosaurio!, pero el destino tenía otros planes para Steven Universe."*

*-Steven Universe, 2013.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León y al CONAHCYT por la oportunidad de poder realizar este posgrado, ha sido una experiencia que atesoraré toda la vida.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a los doctores Gerardo Méndez, Beatriz Rodríguez y Humberto Rodríguez por formar parte del Comité de Tesis, así como por sus valiosas sugerencias e interés en la revisión del presente trabajo.

A todo el equipo del laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Facultad de Agronomía de la UANL. A la Dra. Mariana Márquez, quien me dio la oportunidad de trabajar con ellos y a mis compañeros quienes son parte importante de mi día a día en este camino.

A Cristian Arias, pues siempre ha sido el encargado de darme ese empujón que necesito, ese respiro de toda la carga que pude llegar a tener durante este tiempo, mi compañero en esta odisea y en muchas otras, gracias por siempre creer y ver lo mejor en mí, pues siempre me cuesta creer todo lo que puedo lograr. Gracias por acompañarme, aunque ya no pudiéramos más, gracias a ti creo que soy mejor persona día con día.

A Abraham Aguilar, quien igualmente fue testigo de mis desvelos y de mis madrugadas, gracias por siempre ver por mí y procurar que no me faltara nada día con día pues estos dos años fueron más fáciles contigo en el laboratorio haciéndome compañía.

A mis mejores amigos, Ángel, Bryan y Juan, quienes siempre estuvieron ahí a pesar de las distancias, siempre apoyándome y dándome ánimos para terminar, pues fui el único de los cuatro que decidió entrar a un posgrado... tal vez el loco soy yo después de todo; aún con ello, agradezco que aun después de más de 8 años sigamos juntos como desde aquellos días de licenciatura; siempre los llevaré conmigo.

A Román Torres, pues gracias a él he encontrado muchas veces la inspiración que necesitaba, pues su música siempre me acompañó en mis días y noches elaborando este trabajo.

## INDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
INTRODUCCIÓN .....	2
HIPÓTESIS.....	5
OBJETIVOS .....	6
1.1 Objetivo General .....	6
1.1.1 Objetivos Específicos .....	6
REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
2.1 Kombucha .....	7
2.2 Parámetros de Fermentación .....	8
2.2.1 Inoculo .....	8
2.2.2 Fuente de Carbono .....	8
2.2.3 Temperatura .....	9
2.2.4 Tiempo de Fermentación .....	9
2.2.5 Sustratos para la infusión .....	10
2.3 Zacate limón ( <i>Cymbopogon citratus</i> ).....	10
2.4 Tomillo ( <i>Thymus vulgaris</i> ) .....	10
2.5 Hierbabuena ( <i>Mentha spicata</i> ) .....	11
2.6 Modelos de Superficie de Respuesta.....	12
2.6.1 Diseño de Componentes Centrales .....	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1 Material biológico .....	13
3.2 Infusión.....	13
3.3 Diseño de Componentes Centrales.....	14
3.4 Caracterización del fermentado.....	14
3.4.1 Sólidos solubles .....	14
3.4.2 Medición de pH.....	14
3.4.3 Determinación de acidez .....	14
3.4.4 Determinación de azúcares totales.....	15

3.4.5	Cuantificación de azúcares reductores .....	15
3.4.6	Azúcares no reductores .....	16
3.5	Actividad Antioxidante .....	16
3.5.1	Contenido de Fenoles totales .....	16
3.5.2	Ensayo del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).....	16
3.5.3	Ensayo del radical ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico).....	17
3.5.4	Ensayo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) .....	17
FASE II:	Validación .....	18
FASE III:	Análisis sensorial .....	19
3.6.1	Prueba con Panelistas no Entrenados .....	19
3.6.2	Evaluación con Panelistas Semi-Entrenados .....	20
3.7	Análisis de datos .....	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	.....	25
4.1	Fase 1 .....	25
4.1.1	pH .....	27
4.1.2	Acidez total .....	28
4.1.3	Sólidos solubles.....	29
4.1.4	Azúcares totales .....	30
4.1.5	Capacidad Antioxidante .....	31
4.1.6	Cuantificación de Fenoles Totales.....	33
4.2	FASE 2: Validación .....	34
4.2.1	pH .....	38
4.2.2	Porcentaje de acidez .....	39
4.2.3	Sólidos Solubles .....	40
4.2.4	Azúcares totales .....	41
4.2.5	Azúcares reductores.....	42
4.2.6	Ensayo del radical DPPH.....	43
4.2.7	Fenoles totales .....	45
Fase 3:	Evaluación Sensorial.....	47
4.3.1	Prueba sensorial con evaluadores no entrenados .....	47

4.3.2 Prueba sensorial con evaluadores semi entrenados .....	50
CONCLUSIONES .....	54
RECOMENDACIONES .....	55
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
ANEXOS.....	61

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
<b>Cuadro 1.</b> Distribución de los tratamientos utilizados para llevar a cabo la cinética de comportamiento para las kombuchas de tomillo, hierbabuena y zacate limón.....	19
<b>Cuadro 2.</b> Codificación de las muestras de tomillo, hierbabuena y zacate limón para la prueba sensorial de panelistas no entrenados. ....	20
<b>Cuadro 3.</b> Codificación de las muestras de tomillo, hierbabuena y zacate limón para la prueba sensorial de panelistas semi entrenados. ....	21
<b>Cuadro 4.</b> Matriz experimental del DCC .....	22
<b>Cuadro 5.</b> Promedios globales del Diseño de Componentes Centrales .....	26
<b>Cuadro 6.</b> Tabla ANOVA donde A=Inoculo (%) B=Temperatura (°C) C=Incubación (Días) D=Té (g/L) y E=Azúcar (g Dextrosa/L). ....	27
<b>Cuadro 7.</b> Caracterización de kombuchas a base de zacate limón. ....	36
<b>Cuadro 8.</b> Caracterización de kombuchas a base de tomillo a 18 d de fermentación. ....	36
<b>Cuadro 9.</b> Caracterización de kombuchas a base hierbabuena a 18 d de fermentación. ....	37
<b>Cuadro 10.</b> Caracterización de kombuchas a base de zacate limón durante 18 d de fermentación.....	37
<b>Cuadro 11.</b> Resultados de la evaluación sensorial de los 5 atributos de la kombucha de tomillo, hierbabuena y zacate limón a diferentes tiempo de fermentación. ....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
<b>Figura 1.</b> Fotografías de las plantas utilizadas para la elaboración de kombuchas, donde; A) Zacate limón, B) Tomillo y C) Hierbabuena, respectivamente. ....	13
<b>Figura 2.</b> Gráfico de datos predichos vs reales. ....	25
<b>Figura 3.</b> Gráfico de residuales.....	26
<b>Figura 4.</b> Gráfico de contorno para pH para la interacción azúcar y té.....	28
<b>Figura 5.</b> Gráfico de contorno para los valores de % Acidez para la interacción incubación*temperatura. ....	29
<b>Figura 6.</b> Gráficas de contorno para la concentración de azúcares totales en la interacción: A) té*temperatura; B) té*azúcar y C) incubación*temperatura. ....	31
<b>Figura 7.</b> Gráfico de contornos para la capacidad antioxidante de las kombuchas donde A) Prueba DPPH para la interacción incubación*inoculo. y B) Para la prueba del poder reductor del ion fierro (FRAP) para la interacción azúcar*té. ....	32
<b>Figura 8.</b> Gráfico de superficie de respuesta para la cuantificación de fenoles totales en µg GAE/mL para las interacciones: A) inoculo*temperatura, B) inóculo*azúcar y C) azúcar*temperatura.....	34
<b>Figura 9.</b> Gráfico de las condiciones de la optimización para los 5 factores del modelo, donde se especifican puntos altos, actuales y bajos. Se considera un punto actual el valor “actual” o resultante de la optimización. ....	35
<b>Figura 10.</b> Cinéticas de cambio de pH en 18 días para tres tratamientos de tres diferentes kombuchas: A) tomillo. Donde T1 (azul) 2.3 g/L, T2 (naranja) 4.6g/L y T3 (gris) 6.9 g/L de tomillo. B) hierbabuena. Donde H1 (azul) 2.3 g/L, H2 (naranja) 4.6g/L y H3 (gris) 6.9 g/L de hierbabuena. y C) zacate limón. Donde ZL1 (azul) 2.3 g/L, ZL2 (naranja) 4.6g/L y ZL3 (gris) 6.9 g/L de zacate limón.....	39
<b>Figura 11.</b> Cinéticas de cambio del % de acidez en 18 días para tres tratamientos de tres diferentes kombuchas: A) tomillo. Donde T1 (azul) 2.3 g/L, T2 (naranja) 4.6g/L y T3 (gris) 6.9 g/L de tomillo. B) hierbabuena. Donde H1 (azul) 2.3 g/L, H2 (naranja) 4.6g/L y H3 (gris) 6.9 g/L de hierbabuena. y C) zacate limón. Donde ZL1 (azul) 2.3 g/L,	

ZL2 (naranja) 4.6g/L y ZL3 (gris) 6.9 g/L de zacate limón..... 40

**Figura 12.** Cinéticas de cambio de sólidos solubles en 18 días para tres tratamientos de tres diferentes kombuchas: A) tomillo. Donde T1 (azul) 2.3 g/L, T2 (naranja) 4.6g/L y T3 (gris) 6.9 g/L de tomillo. B) hierbabuena. Donde H1 (azul) 2.3 g/L, H2 (naranja) 4.6g/L y H3 (gris) 6.9 g/L de hierbabuena. y C) zacate limón. Donde ZL1 (azul) 2.3 g/L, ZL2 (naranja) 4.6g/L y ZL3 (gris) 6.9 g/L de zacate limón..... 41

**Figura 13.** Cinéticas de cambio de la cantidad de azúcares totales en 18 días para tres tratamientos de tres diferentes kombuchas: A) tomillo. Donde T1 (azul) 2.3 g/L, T2 (naranja) 4.6g/L y T3 (gris) 6.9 g/L de tomillo. B) hierbabuena. Donde H1 (azul) 2.3 g/L, H2 (naranja) 4.6g/L y H3 (gris) 6.9 g/L de hierbabuena. y C) zacate limón. Donde ZL1 (azul) 2.3 g/L, ZL2 (naranja) 4.6g/L y ZL3 (gris) 6.9 g/L de zacate limón. .... 42

**Figura 14.** Cinéticas de cambio de la cantidad de azúcares reductores en 18 días para tres tratamientos de tres diferentes kombuchas: A) tomillo. Donde T1 (azul) 2.3 g/L, T2 (naranja) 4.6g/L y T3 (gris) 6.9 g/L de tomillo. B) hierbabuena. Donde H1 (azul) 2.3 g/L, H2 (naranja) 4.6g/L y H3 (gris) 6.9 g/L de hierbabuena. y C) zacate limón. Donde ZL1 (azul) 2.3 g/L, ZL2 (naranja) 4.6g/L y ZL3 (gris) 6.9 g/L de zacate limón. .... 43

**Figura 15.** Cinéticas de cambio de la actividad antioxidante del reactivo DPPH en 18 días para tres tratamientos de tres diferentes kombuchas: A) tomillo. Donde T1 (azul) 2.3 g/L, T2 (naranja) 4.6g/L y T3 (gris) 6.9 g/L de tomillo. B) hierbabuena. Donde H1 (azul) 2.3 g/L, H2 (naranja) 4.6g/L y H3 (gris) 6.9 g/L de hierbabuena. y C) zacate limón. Donde ZL1 (azul) 2.3 g/L, ZL2 (naranja) 4.6g/L y ZL3 (gris) 6.9 g/L de zacate limón. .... 45

**Figura 16.** Cinéticas de cambio de la cantidad de azúcares reductores en 18 días para tres tratamientos de tres diferentes kombuchas: A) tomillo. Donde T1 (azul) 2.3 g/L, T2 (naranja) 4.6g/L y T3 (gris) 6.9 g/L de tomillo. B) hierbabuena. Donde H1 (azul) 2.3 g/L, H2 (naranja) 4.6g/L y H3 (gris) 6.9 g/L de hierbabuena. y C) zacate limón. Donde ZL1 (azul) 2.3 g/L, ZL2 (naranja) 4.6g/L y ZL3 (gris) 6.9 g/L de zacate limón. .... 46

**Figura 17.** Rango de aceptación a través de 18 días donde: Azul=Tomillo; Naranja=Hierbabuena y Verde=Zacate Limón para el atributo "Aceptación General". .... 50

**Figura 18.** Gráfico de estrella para el grado de aceptación donde: Azul=Día4;

Naranja=Día 8; Gris=Día 12 y Amarillo= Día 18 para los 5 atributos de kombuchas de Tomillo..... 52

**Figura 19.** Gráfico de estrella para el grado de aceptación donde: Azul=Día4; Naranja=Día 8; Gris=Día 12 y Amarillo= Día 18 para los 5 atributos de kombuchas de Hierbabuena..... 53

**Figura 20.** Gráfico de estrella para el grado de aceptación donde: Azul=Día4; Naranja=Día 8; Gris=Día 12 y Amarillo= Día 18 para los 5 atributos de kombuchas de Zacate limón..... 53

## RESUMEN

La kombucha es una bebida fermentada resultante del proceso metabólico de bacterias y levaduras en un té azucarado. En el presente estudio se utilizó zacate limón (*Cymbopogon citratus*) como fuente de fermentación. Un diseño de componentes centrales con 5 factores y 3 niveles cada uno fueron establecidos: inóculo (2.5, 5 y 10%); temperatura (25, 30 y 35 °C); concentración de té (1, 3 y 5 g/L) y azúcar (dextrosa) añadida (10, 30 y 50 g/L) y periodo de incubación (4, 16 y 28 días). En las formulaciones se caracterizó el fermentado (azúcares totales, acidez, pH y sólidos solubles), así como la cuantificación de la capacidad antioxidante (fenoles totales, DPPH, ABTS y FRAP). De este diseño de componentes centrales se obtuvo una optimización de los factores de fermentación resultando el siguiente tratamiento: 1% de inóculo, 25 grados de temperatura, 4.6 g/L de té y 18 días de incubación. Después se utilizó un diseño optimizado con la variación del té (2.3, 4.6 y 6.9 g/L de té), empleando tomillo (*Thymus vulgaris*) y hierbabuena (*Mentha spicata*). además del zacate limón para evaluar la fermentación durante 18 días en los parámetros de pH, acidez, azúcares reductores y no reductores, sólidos solubles, DPPH y fenoles totales. Las kombuchas tuvieron mayor capacidad antioxidante en las de zacate limón. Además de tener mayor acidez y pH, seguido de las kombuchas de tomillo y al final, las de hierbabuena. En la evaluación sensorial, las kombuchas con mayor aceptación general fueron las de zacate limón a 18 días, mientras que la de menor agrado fue tomillo con 4 días de fermentación; además, en algunos casos, las kombuchas de zacate limón con 12 días de fermentación no presentaron diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) contra las de 18 días. En conclusión, el tratamiento optimizado de kombuchas de zacate limón si contiene una mayor proporción de compuestos antioxidantes, y esta optimización puede ser utilizado en otras plantas obteniendo resultados similares. Además, las kombuchas de zacate limón tienen una mayor aceptación en el público general.

## INTRODUCCIÓN

En la industria alimentaria, los procesos fermentativos son importantes en la industria vinícola, cervecera, panadera y láctea, debido a la versatilidad de crear nuevos productos funcionales y conferir sabores o aromas especiales. Además, esos nuevos productos deben ser atractivo para el consumidor, saludables y estén dentro de los límites permisibles de inocuidad, nutrimentos y aditivos que las normativas mexicanas indican. Algunos de esos productos pueden ser llamados alimentos funcionales.

Los probióticos y simbióticos son ejemplos de alimentos funcionales; sin embargo, la mayoría de las bebidas probióticas proceden de los lácteos y sus productos. La tendencia a las dietas veganas con el consumo de nutraceuticos no lácteos y el aumento del papel de la intolerancia a la lactosa exigen el diseño de nuevos productos probióticos no lácteos y seguros, que pueden convertirse en un grupo esencial de alimentos saludables (Prado et al. 2008; Reva et al. 2015).

La calidad de los alimentos es fundamental en la industria alimentaria, por lo que se buscan procesos y técnicas para obtener alimentos de alta calidad. Uno de los procesos de calidad es la evaluación sensorial, con la cual se evalúan y caracterizan atributo sensoriales de los productos (Dufresne y Franworth, 2000).

Dentro de los procesos fermentativos, la kombucha ha sido de interés en los años recientes. La kombucha es el nombre común dado a la bebida que resulta de una fermentación (comúnmente de té verde o té negro) producida por un grupo simbiótico de bacterias y levaduras, conocido como SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast, por sus siglas en inglés). Las primeras fermentaciones de kombucha datan de los años 220 a.C. para desintoxicar el cuerpo y abastecerse energía; además, estas bebidas mejoran problemas digestivos (Dufresne y Franworth, 2000).

El té de la kombucha es el resultado de la fermentación compartida de bacterias y levaduras que tiene como resultado una bebida con actividad fitoquímica. La formación de estos compuestos de valor, tales como las vitaminas y minerales están relacionadas con el proceso y condiciones a las cuales se somete la fermentación.

Condiciones tales como la agitación, variación en la fuente de carbono, pH, temperatura, inóculo y tiempo de fermentación definen el producto al final de la fermentación (Petrovic et al. 1995).

Al momento de beber kombucha, el consumidor experimenta la apariencia del producto, el aroma por el perfil aromático antes y después de la ingesta, así como aspectos gustativos por los distintos sabores que tiene y efervescencia través de la quimiosensación del hormigueo de las burbujas de dióxido de carbono en la lengua (Redondo et al. 2014).

El mercado mundial de la kombucha ha aumentado en los últimos años; en 2018 se estimaba un valor aproximado de 1.5 billones de dólares, y, se estima que para el año 2025 llegaría a 5 billones, con un crecimiento anual es del 23% (Kim y Adhikari, 2020). En México, la popularidad de la kombucha ha crecido en grupos selectos de la población. Actualmente, podemos encontrar diversas marcas de kombuchas en el mercado, pero su mayoría destaca por tener sabores añadidos por una segunda fermentación con frutas. Esto es debido a que la segunda fermentación dentro de las kombuchas ayuda a añadir efervescencia y reducir los niveles de acidez, así como el adicionar otro tipo de sabores (Tran et al. 2020).

Por lo anterior, cada vez es más frecuente utilizar infusiones de diferentes tés e incluso jugo de frutas, verduras o residuos agroindustriales como suero de leche o extracto de malta. El zacate limón (*Cymbopogon citratus*) es una hierba perenne cultivada en Sur y Centroamérica, África y otras regiones tropicales, es utilizada en la herbolaria como antibacterial, antifúngico, antidiarreico y anti-amebas, además de ser conocida por su efecto antioxidante. Los constituyentes del zacate limón son variados, destaca por tener fitoconstituyentes tales como Citral a, Citral B; 6-C y 7-C-glicosidas, isooretina 2'-O-rhamnosida, aislados de flavonoides como quercetina, kampoferoles, y compuestos fenólicos como elimicina, catecol, ácido clorogénico, ácido cafeico e hidroquinonas (kiShah et al. 2011).

Otra planta es el tomillo, la cual es perenne subarborescente que habita suelos áridos arenosos y pedregosos, suele encontrarse en África, Portugal y Medio Oriente. España es el país con un mayor número de variedades (Jaume y Jaimice, 2017). Esta planta es rica en aceites esenciales como el timol y el carvacol, además de contener

ácidos fenólicos como el caféico, rosmarico y clorogénico. Otro ejemplo es la hierbabuena; esta es una planta herbácea que crece hasta 30 cm, usada para la gastronomía por su sabor y con propiedades antisépticas y antiinflamatoria que destaca por la presencia de mentol, mentona, felandreno y limonero. Por estas razones, las infusiones del zacate limón, tomillo y hierbabuena podrían considerarse en la elaboración de kombucha.

## **HIPÓTESIS**

Las variables evaluadas y optimizadas durante la fermentación de la kombucha con la infusión de zacate limón se comportan similar cuando se fermenta con tomillo y hierbabuena.

## **OBJETIVOS**

### **1.1 Objetivo General**

Evaluar los parámetros fisicoquímicos y sensoriales de la fermentación de kombucha empleando infusiones de zacate limón, tomillo y hierbabuena.

#### **1.1.1 Objetivos Específicos**

- Establecer las variables de concentración de inóculo, té y fuente de carbono, temperatura y tiempo de fermentación de la kombucha para obtener una mayor capacidad antioxidante empleando zacate limón en la infusión.
- Validar la optimización empleando infusiones de tomillo y hierbabuena.
- Analizar sensorialmente las kombuchas elaboradas con las tres infusiones: zacate limón, tomillo y hierbabuena.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Kombucha

La kombucha es un té obtenido por la fermentación del SCOBY en un medio dulce conformado por dos fases, una fase líquida donde se encuentra el té y una segunda fase donde se produce una capa de celulosa que flota en la superficie (Watawana *et al.*, 2016).

Esta capa de celulosa bacteriana es un exopolisacárido creado por el SCOBY, consiste en unidades de D-Glucosa unidas por enlaces B 1-4, insoluble, y dentro del medio sirve para proteger a la bacteria de los rayos UV, microorganismos patógenos, pH y agua en el medio (Avcioglu *et al.*, 2021). La colonia simbiótica de bacterias y levaduras es un cultivo viviente que se reproduce durante el proceso de fermentación, dando lugar a nuevos cultivos a los cuales se les conoce como cultivos hijos. Estos cultivos tienen apariencia gelatinosa y muchas veces puede parecer una esponja, los colores también pueden variar, pero los más comunes son tonos cremas y grisáceos, por lo que, muchas veces se le suele llamar hongo, aunque este no lo sea (Vargas-Mora, 2011).

De acuerdo con estudios de composición química realizados por Jayabalan *et al.* (2014), la kombucha contiene ácidos orgánicos como el acético, glucónico, glucurónico, cítrico, L-láctico, málico, tartárico, malónico, oxálico, succínico, pirúvico, azúcares como sacarosa, glucosa y fructosa, vitaminas del complejo B, C (que es un antioxidante natural conocido) y 14 aminoácidos (leucina, isoleucina, histidina, metionina y fenilalanina), así como enzimas hidrolíticas, etanol, dióxido de carbono, fenoles, polifenoles del té y minerales.

Si bien la kombucha no es una bebida que se pueda catalogar como alcohólica, es posible encontrar etanol en ella. Ivory *et al.* (2021), cuantificaron en ocho formulaciones de kombucha comercial alcohol, encontrando entre 0.25 al 0.5 % de etanol en una que contenía zacate limón.

La acidez de la kombucha se debe a la cafeína del té y polifenoles, estos últimos son característicos en la kombucha, estos confieren astringencia y sabores ácidos al fermentado y son encontrados en las hojas secas de té en 30

a 40% (p/p en peso seco; Balentine et al. 2017).

## **2.2 Parámetros de Fermentación**

### **2.2.1 Inoculo**

Bishop et al. (2022) mencionaron que las principales familias de bacterias y levaduras encontrados en los medios fermentados de kombucha son *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Brettanomyces*, *Candida*, *Klocker*, *Pichia* y *Sacharomyces*. Algunos estudios utilizan cepas como *Komagataeibacter saccharivorans* LN886705, *Brettanomyces bruxellensis* MH393498 y *Brettanomyces anomalus* KY103303 (Avcioglu et al., 2021).

De acuerdo con Jayabalan et al. (2014), las comunidades microbianas varían de acuerdo con el lugar geográfico, clima y especies locales de bacterias y levaduras, así como de matrices de fermentación previas.

### **2.2.2 Fuente de Carbono**

Los mejores ingredientes base de la infusión de la kombucha son el té negro y azúcar refinada (Jayabalan et al., 2014). Estudios indican de utilizar sacarosa (50 g/L) favorece en la obtención adecuada de concentraciones de etanol y ácido láctico (Reiss, 1994). Adicionar glucosa, favorece la formación del exopolímero (celulosa bacteriana) subproducto de la fermentación (Molina-Ramírez et al., 2017). Para la elaboración de las infusiones se han empleado otros tipos de sustratos como la cáscara de café (75%) con azúcar (25 %) para incrementar la producción de celulosa bacteriana (Merchán y Tigre, 2019); miel de abeja con té negro (100 g/L de sacarosa + 2 g/L de té) o adiciones de polen, los cuales incrementan propiedades del fermentado (Vargas-Mora, 2011; Utoiu et al., 2018) e incluso, sacarosa, maltosa y lactosa en las formulaciones (Avcioglu et al., 2021).

### **2.2.3 Temperatura**

La temperatura es una condición fundamental para el mantenimiento y optimización de las fermentaciones, es importante mantener una temperatura adecuada en el medio para poder realizar todos los procesos de fermentación, así como algunos procesos enzimáticos que pueden requerirse para que se lleve a cabo una correcta fermentación y tener la mejor calidad posible en el producto (Hur et al. 2014).

Ivanisova et al. (2020) realizaron kombucha de té negro (5 g) y azúcar blanca (30 g) por 7 días a una 22 °C. Mientras, Watawana et al. (2016) mencionaron que la temperatura para iniciar los procesos de fermentación es de 20°C; mientras que Vitas et al. (2013) indicaron rangos de entre los 22 y 30°C como las mejores temperaturas para poder obtener buenos resultados en la kombucha. Sin embargo, los fermentos a mayores temperaturas generan mayor producción de etanol y ácido acético, lo cual provoca que el té no se pueda consumir (Crum y LaGlory, 2016).

### **2.2.4 Tiempo de Fermentación**

La fermentación de la kombucha se hace en distintas fases; las levaduras presentes en el SCOBY hidrolizan la sacarosa en glucosa y fructosa, produciendo etanol (Reiss, 1994), mientras que las bacterias ácido-acéticas convierten la glucosa (resultante de la hidrólisis) en ácido glucónico, mientras que la fructosa es convertida en ácido acético (Hara et al. 1995).

Chu et al. (2006) explicaron que los tiempos de fermentación impactan en los tipos de metabolitos que se forman en el medio; además, este es dependiente del cultivo madre. Los tiempos de fermentación de una kombucha pueden ir desde los 7 d hasta los 60, siendo los 15 d más usados para que la kombucha tenga buenas condiciones de aceptabilidad. De acuerdo con Malbasa et al. (2006), el té formado por la fermentación de la kombucha en condiciones anaerobias, el SCOBY puede convertir en un periodo de 7 a 10 d la azúcar y té presente en el medio en una bebida ligeramente carbonatada, ácida y refrescante.

### **2.2.5 Sustratos para la infusión**

En la preparación de la kombucha se realizan infusiones de diferentes tés, siendo el negro y verde los más utilizados. Sin embargo, existen sustitutos que se han utilizado debido a su fácil adquisición, alto valor nutrimental o factible; ejemplos de estos son jugos de frutas y verduras, extractos y aguas de cereales y granos, así como el uso de residuos agroindustriales como el extracto de malta, suero de leche, lixiviados de frutas y residuos de café. Amhed et al. (2020) realizaron un estudio para preparar kombucha a partir de té verde, arroz y cebada con sacarosa comercial (7%).

### **2.3 Zacate limón (*Cymbopogon citratus*)**

El zacate limón es una hierba perenne que pertenece a la familia de las poaceae, es utilizada en países tropicales y sureste de Asia, siendo su principal uso en aromaterapia y medicinal (Cápiro et al., 2001). La mayoría de las plantas aromáticas contienen compuestos con actividad antioxidante (sustancias con la capacidad de retardar la oxidación de los lípidos que existen en los alimentos), disminuyendo su deterioro durante su vida de anaquel (Martinello y Parmparo, 2005).

De acuerdo con Shah et al. (2011), el zacate limón contiene diversos compuestos que van desde terpenos, alcoholes, cetonas, aldehídos, ésteres, citral a y B, geraniol, citronellal, terpinoleno, geranyl acetato, myrecene, terpinol Metil-eptenona, leuteolina, 6-C y 7-C-glicosidas, isooretina 2'-O-rhamnosida, aislados de flavonoides como quercetina, kampoferoles y apiginina; además de compuestos fenólicos como elimicina, catecol, ácido clorogénico, ácido cafeico e hidroquinonas.

Los extractos de metanol, MeOH/agua e infusión de zacate limón tienen efectos de eliminación de radicales libres, así como la eliminación del anión superóxido e inhibición de la enzima xantina oxidasa y peroxidación lipídica en eritrocitos humanos (Cheel et al., 2005).

### **2.4 Tomillo (*Thymus vulgaris*)**

El tomillo es una planta perenne subarborescente de 30 cm de altura, tiene tallos leñosos en la base inferior y herbáceos en la superior. Las hojas son abundantes; sin

embargo, no superan los 5-8 mm de largo, tienen bordes curvados y son de tonos verde oscuro, dependiendo de la variedad pueden tener tonalidades lilas o grisáceos (Jaume y Jaimice, 2017).

Esta planta habita en suelos áridos, arenosos y pedregosos, con una buena exposición a la luz solar, es capaz de soportar sequías. Aunque su origen parece ser en África y Oriente Medio occidental, también suele encontrarse en Portugal. España tiene el mayor número de variedades y producción (Berdonces, 2001).

Jaume y Jaimice (2017) y Berdonces, (2001) identificaron distintos compuestos en aceites esenciales como el timol, p-cimeno, gamma-terpina, carvacol, borneol, alfa terpineol, alcohol amílico; ácidos fenólicos (cafeico, rosmarico y clorogénico), flavonoides (apiginina, eriodictol, flavonas, leuteolina, naringenina), taninos, manganeso y grasas.

## **2.5 Hierbabuena (*Mentha spicata*)**

La hierbabuena es una planta herbácea ampliamente utilizada en la gastronomía y perfumería, crece hasta los 30 cm de altura, sus hojas tienen una forma característica de “spica” o lanza. Esta planta medicinal posee propiedades antiespasmódicas y carminativas sobre el sistema digestivo, antisépticas y antiinflamatorias sobre el sistema respiratorio y propiedades antisépticas sobre la piel y mucosas. Otras propiedades que se le atribuyen son de estimulante, hipostenizante cardiovascular, antidismenorreica y antihipocondríaca (Lagarto et al. 1997).

El componente activo de la planta es un aceite esencial que contiene mentol (50-86 %), mentona, felandreno y limoneno. En el estudio realizado por Ariel et al. (2019) describieron los principales compuestos activos de la hierbabuena, entre los cuales destacan: carvona (60.72-68.09%), limoneno (14.23-16.41%),  $\alpha$ -pineno (0.12-3.14%),  $\beta$ -mirceno (0.35-2.33%), 1.8-cineol (1.69-2.73%), cis-dihidrocarvona (1.82-2.31%), trans-craveol (1.09-1.19%),  $\beta$ -bourboneno (2.4 y 4-3.17%) y  $\beta$ -cariofileno (1.42-1.82%).

## 2.6 Modelos de Superficie de Respuesta

La Metodología de Superficies de Respuesta (MSR) es una combinación de diversos análisis de regresión y diseños de experimentos introducidos por Box y Wilson en 1951; estos modelos siguen un modelo (ecuación 1)

$$y = (f_{x_1}, f_{x_2}). \text{ Ec.(1)}$$

Donde:  $x$  es la variable, que está en función a  $f$ ,  $y$  es la respuesta

Los MSR son estrategias de experimentación secuencial y modelos que conducen a la localización de los valores óptimos de las variables independientes que maximizan, minimizan o cumplen ciertas restricciones en la variable respuesta.

### 2.6.1 Diseño de Componentes Centrales

Los diseños centrales compuestos son experimentos diseñados con factores o factoriales fraccionados con puntos centrales, los cuales son ampliados con puntos axiales, permitiendo conocer una curvatura, que ayuda a conocer los términos de primer y segundo orden. Este tipo de diseños compuestos son particularmente útiles en aquellos experimentos del tipo secuenciales, ya que permiten ampliar experimentos factoriales al agregar puntos axiales y centrales (Box y Wilson, 1951).

Los modelos cúbicos son aquellos que utilizan ecuaciones del tipo  $ax^3+bx^2+cx+d$  para modelar análisis de datos. La implementación de estos modelos puede ayudar a identificar o explorar distintas dimensiones, resultados y cambios a una o más dimensiones según se plantee (ecuación 2).

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{111}x_1^3 + \beta_{222}x_2^3 + \beta_{112}x_1^2x_2 + \beta_{221}x_2^2x_1 + \varepsilon \text{ Ec. (2)}$$

Donde:  $y$  es la variable respuesta,  $\beta$  son los factores,  $x$  es la variable independiente y  $\varepsilon$  es el error.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Material biológico

El zacate limón se colectó del campus Marín de la FA, UANL (Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León). Mientras que el tomillo y hierbabuena fueron adquiridos en viveros cercanos a la FA. El inóculo de trabajo CPN está compuesto por *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Ruminococaceae* y *Propionobacterium* el cual fue proporcionado por el laboratorio de biotecnología microbiana de la FA, UANL.

#### 3.2 Infusión

La infusión se preparó con agua purificada a 85 °C, a la cual se le adicionó dextrosa, especie vegetal e inóculo según el tratamiento. Los tratamientos se enfriaron para ser separados en frascos de vidrio con 100 mL. Todos los recipientes fueron tapados con gasa y colocados dentro de incubadoras de acuerdo con la temperatura correspondiente, durante los días establecidos para cada experimento.



**Figura 1.** Fotografías de las plantas utilizadas para la elaboración de kombuchas, donde; A) Zacate limón, B) Tomillo y C) Hierbabuena, respectivamente.

## **FASE 1: Optimización**

### **3.3 Diseño de Componentes Centrales**

Para la optimización del proceso de fermentación se elaboró un Diseño de Componentes Centrales (DCC; ver apartado 3.7) para el cual se midieron variables de sólidos solubles, pH, % de acidez, contenido de azúcares y fenoles totales, así como la actividad del radical ABTS y DPPH y el ensayo FRAP.

### **3.4 Caracterización del fermentado**

#### **3.4.1 Sólidos solubles**

Los sólidos solubles se determinaron con la medición de grados Brix, que se evaluaron conforme a la NMX-F-436-SCFI-2011, mediante el uso de un refractómetro ATAGO N-1EBX (Tokio, Japón). Se colocó una gota de la solución sobre la superficie, observando la lectura y registrando el valor en °Brix.

#### **3.4.2 Medición de pH**

La determinación de pH se realizó conforme a la metodología usada por Pereyra et al. (2006), calibrando el equipo con buffers de pH 4 y 7. Después se introdujo el electrodo del potenciómetro al recipiente con la muestra y se registró el resultado.

#### **3.4.3 Determinación de acidez**

La acidez en el medio se evaluó por valoración volumétrica. Donde a 10 mL de muestra se le adicionaron dos gotas de fenolftaleína al 0.1% y se valoró con una solución de NaOH (1N) hasta el viraje rosa (Vitas et al., 2020). La acidez se determinó a partir del volumen gastado de NaOH, según la siguiente ecuación (1):

$$\% \text{ Acidez} = \frac{[(mL \text{ NaOH})(N \text{ NaOH})(0.06)]}{mL \text{ M}} \times 100 \quad \text{Ec. (3)}$$

#### **3.4.4 Determinación de azúcares totales**

Para la prueba de azúcares totales se utilizó la metodología presentada por López-Legarda et al. (2017), en donde agregaron 500  $\mu\text{L}$  de muestra, con 500  $\mu\text{L}$  de fenol al 5% en tubos de ensayo (en el caso de la muestra control se realizó una muestra extra con 500  $\mu\text{L}$  de agua destilada sustituyendo la muestra). Enseguida, se adicionaron 2 mL de ácido sulfúrico concentrado y se agitaron levemente. Las soluciones guardaron reposo por 10 minutos a temperatura ambiente y fueron agitadas en vortex por 30 s. Para finalizar, los tubos se colocaron en un baño de agua fría para reducir su temperatura y se leyeron por espectrofotómetro UV/Vis (modelo, compañía, cd, país) a 490 nm.

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

#### **3.4.5 Cuantificación de azúcares reductores**

La cuantificación de los azúcares reductores se llevó a cabo por el método DNS (Ácido 3,5-dinitrosalisílico; Miller, 1959). El cual consiste en la preparación del reactivo DNS, añadiendo 1.6 g de NaOH, 4.38 g de tartrato de potasio y 0.1 g de DNS aforado a 10 mL, el cual se mantuvo en agitación durante 12 h. Una vez transcurrido el tiempo, en viales de 5 mL se mezclaron 250  $\mu\text{L}$  de muestra y 250  $\mu\text{L}$  de DNS, se llevó a baño maría a 92 °C durante 5 min. Posteriormente, se enfriaron los tubos y se añadieron 2.5 mL de agua destilada, se agitaron y se leyeron las muestras en un espectrofotómetro (Thermo Scientific™ Espectrofotómetros Spectronic GENESYS 8) a 540 nm.

La cuantificación de la cantidad de azúcares reductores se realizó una curva de calibración a partir de 6 puntos con concentraciones conocidas de glucosa (0, 0.5, 0.7, 1, 1.5 y 2 g/L de glucosa). Los resultados se expresaron como g de glucosa/mL.

### **3.4.6 Azúcares no reductores**

Para la cuantificación de los azúcares no reductores se realizó el cálculo utilizando los azúcares totales y reductores con la siguiente ecuación (4).

$$\text{Azúcares No Reductores} = \text{Azúcares Totales} - \text{Azúcares Reductores} \text{ Ec. (4)}$$

## **3.5 Actividad Antioxidante**

### **3.5.1 Contenido de Fenoles totales**

La cuantificación de fenoles totales fue realizada bajo la metodología de Singleton et al. (1999). La solución utilizada fue  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 7.5% y reactivo Folin al 1N. Para realizar el ensayo se tomaron tubos Eppendorf de 2 mL a los cuales se les añadieron 250  $\mu\text{L}$  de muestra, 800  $\mu\text{L}$  de agua destilada, 50  $\mu\text{L}$  de Folin 1N y 800  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 7.5%, los cuales se resguardaron por 30 min en oscuridad, una vez transcurrido el tiempo se tomó la lectura en un espectrofotómetro (Thermo Scientific™ Espectrofotómetros Spectronic GENESYS 8, Massachusetts, USA.) a 750 nm.

Para la cuantificación del contenido de fenoles se realizó una curva de calibración a partir de 6 puntos, con concentraciones conocidas de ácido gálico [20  $\mu\text{g}$  GAE/mL, 40  $\mu\text{g}$  GAE/mL, 60  $\mu\text{g}$  GAE/mL, 80  $\mu\text{g}$  GAE/mL, 100  $\mu\text{g}$  GAE/MI 120  $\mu\text{g}$  GAE/mL]. Los resultados se expresarán en  $\mu\text{g}$  GAE/mL.

### **3.5.2 Ensayo del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)**

Para la cuantificación de la actividad antioxidante con DPPH se tomó como base la metodología utilizada por Vohra et al. (2019). El reactivo DPPH se realizó pesando 0.006 g en 100 mL de metanol al 85 % el cual se agitó vigorosamente y cubrió con aluminio. Para preparar las muestras se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de muestra y 1 mL de reactivo DPPH a cada tubo; se agitaron y resguardaron en oscuridad por 30 min. El blanco se realizó con metanol al 85 % en vez de muestra. La lectura se realizó con un espectrofotómetro (Thermo Scientific™ Espectrofotómetros Spectronic GENESYS 8, Massachusetts, USA.) a 517 nm.

Para la cuantificación del contenido de DPPH se realizó una curva de

calibración a partir de 10 puntos, con concentraciones conocidas de trolox [20 meq Trolox/mL, 40 meq Trolox/mL, 60 meq Trolox/mL, 80 meq Trolox/mL, 100 meq Trolox/mL 120 meq Trolox/mL]. Los resultados se expresarán en meq Trolox/mL.

### **3.5.3 Ensayo del radical ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico).**

Para la realización de esta técnica se utilizó la metodología usada por Tanticharakunsiri et al. (2020). Para la preparación del reactivo ABTS se realizó una solución 7mM de ABTS (0.0192 g) con una solución al 140 mM de persulfato de potasio (0.0189 g) en 5 mL de agua destilada. Después, se mezclaron 88 µL en los 5 mL de ABTS. La solución obtenida se mezcló con 15 mL de metanol puro. La reacción debió de tener una absorbancia entre 0.7 a 1 cuantificada a 734 nm. Para en análisis se mezclaron 25 µL de muestra y 1 mL de reactivo ABTS se agitaron y mantuvieron en oscuridad por 45 min. El blanco utilizado fue etanol puro en lugar de muestra.

Para la cuantificación del contenido de ABTS se utilizó un espectrofotómetro Thermo Scientific™ Espectrofotómetros Spectronic GENESYS 8 (Massachusetts, USA) en el cual se realizó una curva de calibración a partir de 10 puntos, con concentraciones conocidas de trolox [20 meq Trolox/mL, 40 meq Trolox/mL, 60 meq Trolox/mL, 80 meq Trolox/mL, 100 meq Trolox/mL 120 meq Trolox/mL]. Los resultados se expresarán en meq Trolox/mL.

### **3.5.4 Ensayo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)**

Para el análisis FRAP se utilizó la metodología de Aung y Eun (2021). Donde se preparó ácido clorhídrico a 40 mM (170 µL en 50 mL de agua destilada), una solución de buffer de acetato de sodio (0.683 g con 4 mL de ácido acético glacial y fue aforado a 250 mL; pH de 3.6) y una solución de cloruro férrico (0.54 g en 10 mL de agua destilada). Por último, en una solución de 2,4,6-Tris-(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) se agregaron 0.156 g en 5 mL de ácido clorhídrico al 40 mM. Para preparar el 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 alcanzar los 37 °C, una vez que se llegó a la temperatura, se mezcló 10 mL de buffer, 1 mL de cloruro férrico y 1 mL de TPTZ, en un recipiente cubierto con aluminio. La preparación de muestras se realizó mezclando

25  $\mu$ L de muestra y 1 mL de reactivo FRAP; los tubos fueron resguardados por 1.5 h en la oscuridad. El blanco que se utilizó en el equipo fue metanol puro en lugar de muestra. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 595 nm en el espectrofotómetro (Thermo Scientific™ Espectrofotómetros Spectronic GENESYS 8, Massachusetts, USA).

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

## **FASE II: Validación**

Las plantas de tomillo, hierbabuena y zacate limón fueron utilizadas en esta fase, considerando como referencia los parámetros optimizados por el DCC (figura 2). Para evaluar el efecto directo de la concentración del té en el comportamiento de la fermentación se estableció un diseño factorial de 3 x 3 (las plantas con 3 concentraciones 2.3, 4.6 y 6.9 g/L cada una) con 4 réplicas (cuadro 1). Para observar el comportamiento de los distintos tratamientos de las tres plantas utilizadas durante la fermentación, a los días 0, 4, 8, 12 y 18 se cuantificó el pH, acidez, sólidos solubles, DPPH y fenoles totales. Los datos resultantes se promediaron y fueron comparados contra los Intervalos de confianza del 95% que arroja el programa analítico; el criterio utilizado para aceptar la validación fue comparar si el resultado promedio entraba dentro de estos intervalos de confianza. Estos intervalos dependen de la variación de la media que puede resultar dentro de una distribución normal, es por ello por lo que el modelo puede arrojar intervalos con extremos negativos y positivos y para cada respuesta su valor es independiente.

**Cuadro 1.** Distribución de los tratamientos utilizados para llevar a cabo la cinética de comportamiento para las kombuchas de tomillo, hierbabuena y zacate limón

TRATAMIENTO	INÓCULO %V/V	TÉ g/L	AZÚCAR g/L	INCUBACIÓN días	TEMPERATURA °C
TOMILLO 1	1	2.3	10	18	25
TOMILLO 2	1	4.6	10	18	25
TOMILLO 3	1	6.9	10	18	25
HIERBABUENA 1	1	2.3	10	18	25
HIERBABUENA 2	1	4.6	10	18	25
HIERBABUENA 3	1	6.9	10	18	25
ZACATE LIMÓN 1	1	2.3	10	18	25
ZACATE LIMÓN 2	1	4.6	10	18	25
ZACATE LIMÓN 3	1	6.9	10	18	25

Distribución de los tratamientos utilizados para la cinética de comportamiento.

### FASE III: Análisis sensorial

#### 3.6.1 Prueba con Panelistas no Entrenados

Se convocaron 30 evaluadores sin entrenamiento, consumidores no habituales. Se prepararon 10 mL de muestra en una serie de vasos. Los consumidores evaluaron tres diferentes kombuchas durante 3 sesiones diferentes. Esto lo realizaron en cabinas individuales, con luz y tarja. A cada evaluador se le entregó cuatro muestras codificadas correspondientes a los días de fermentación de dicha muestra (4, 8, 12 y 18 días) y un vaso con agua para limpiar su paladar. La distribución de los códigos de las muestras se presenta a continuación (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Codificación de las muestras de tomillo, hierbabuena y zacate limón para la prueba sensorial de panelistas no entrenados.

<b>Muestra</b>	<b>Tiempo de fermentación</b>	<b>Código</b>
<b>Tomillo</b>	4	357/798
<b>Tomillo</b>	8	167/321
<b>Tomillo</b>	12	487 / 665
<b>Tomillo</b>	18	382 / 919
<b>Hierbabuena</b>	4	877 / 215
<b>Hierbabuena</b>	8	198 / 313
<b>Hierbabuena</b>	12	622 / 774
<b>Hierbabuena</b>	18	632 / 921
<b>Zacate limón</b>	4	765 / 225
<b>Zacate limón</b>	8	897 / 378
<b>Zacate limón</b>	12	963 / 369
<b>Zacate limón</b>	18	536 / 951
Distribución de las muestras empleadas y sus respectivas codificaciones para la evaluación sensorial		

Se utilizó una escala hedónica mixta, utilizando una escala gráfica, numérica y verbal de 5 puntos, donde 1 es desagrado total y 5 el máximo agrado. Fueron 5 los atributos evaluados: color, olor, sabor, acidez y aceptación global. Para la prueba se le proporcionó a cada panelista una hoja (Anexo 1) donde podía marcar su preferencia dentro de una escala hedónica de 5 puntos, donde el 5 era un agrado máximo y el 1 un desagrado máximo.

### **3.6.2 Evaluación con Panelistas Semi-Entrenados**

Se convocaron 15 evaluadores, consumidores habituales. Se prepararon 10 mL de muestra en una serie de vasos. Para el estudio se evaluaron sensorialmente tres diferentes kombuchas a diferentes tiempos de fermentación. A cada juez se les

entregaron seis muestras codificadas correspondientes a dos días de fermentación de cada muestra (4 y 8 o 12 y 18 d) junto con un vaso con agua para limpiar su paladar. La distribución de los códigos de las muestras se presenta a continuación (Cuadro 3).

Para la prueba se le proporcionó a cada evaluador una hoja (Anexo 2) donde indicaron su preferencia dentro de una recta de 10 cm de longitud, donde el 10.0 representaba un agrado máximo y el 0.0 un desagrado máximo. Se evaluó: color, olor, sabor, acidez y aceptación global. El dato se calculó con el uso de una regla de 10 cm.

**Cuadro 3.** Codificación de las muestras de tomillo, hierbabuena y zacate limón para la prueba sensorial de panelistas semi entrenados.

<i>Muestra</i>	<b>Tiempo de fermentación</b>	<b>Código</b>
<i>Tomillo</i>	4	357 / 798
<i>Tomillo</i>	8	167 / 321
<i>Tomillo</i>	12	487 / 665
<i>Tomillo</i>	18	382 / 919
<i>Hierbabuena</i>	4	877 / 215
<i>Hierbabuena</i>	8	198 / 313
<i>Hierbabuena</i>	12	622 / 774
<i>Hierbabuena</i>	18	632 / 921
<i>Zacate limón</i>	4	765 / 225
<i>Zacate limón</i>	8	897 / 378
<i>Zacate limón</i>	12	963 / 369
<i>Zacate limón</i>	18	536 / 951

*Distribución de las muestras empleadas y sus respectivas codificaciones para la evaluación sensorial*

### 3.7 Análisis de datos

#### Fase I: Optimización

Para el diseño experimental de esta fase se utilizó un Diseño de Componentes Centrales (DCC) con caras centradas utilizando MiniTab, en el cual se establecieron ocho puntos centrales y tres niveles para cada factor (inferior, medio y superior), obteniendo 5 factores. Las siguientes condiciones de fermentación se establecieron:

- Inóculo (%): 2.5, 5 y 10
- Temperatura (°C): 25, 30 y 35
- Concentración de té (g/L): 1, 3, y 5
- Concentración de dextrosa (g/L): 10, 30 y 50
- Periodo de incubación (días): 4, 16 y 28

Las condiciones del fermentado se introdujeron al DCC y se obtuvieron 51 tratamientos (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Matriz experimental del DCC

Corrida	Bloque	A	B	C	D	E
1	1	3	30	16	3.5	30
2	1	3	30	16	3.5	30
3	1	5	25	28	5	50
4	1	1	25	28	2	50
5	1	5	35	4	5	50
6	1	3	30	16	3.5	30
7	1	1	35	4	5	10
8	1	1	35	28	5	50
9	1	5	25	28	2	10
10	1	1	35	28	2	10
11	1	1	35	4	2	50
12	1	5	35	4	2	10
13	1	5	25	4	5	10
14	1	3	30	16	3.5	30

15	1	1	25	4	5	50
16	1	1	25	4	2	10
17	1	5	35	28	2	50
18	1	1	25	28	5	10
19	1	5	35	28	5	10
20	1	5	25	4	2	50
21	1	3	30	16	2	30
22	3	3	30	16	5	30
23	3	3	30	16	3.5	30
24	3	3	30	28	3.5	30
25	3	3	30	16	3.5	50
26	3	3	30	4	3.5	30
27	3	1	30	16	3.5	30
28	3	3	25	16	3.5	30
29	3	3	30	16	3.5	10
30	3	3	35	16	3.5	30
31	3	5	30	16	3.5	30
32	2	5	35	28	2	10
33	2	3	30	16	3.5	30
34	2	5	35	4	2	50
35	2	1	25	28	5	50
36	2	1	35	4	5	50
37	2	1	25	4	2	50
38	2	5	35	4	5	10
39	2	5	25	4	5	50
40	2	3	30	16	3.5	30
41	2	3	30	16	3.5	30
42	2	5	25	28	2	50
43	2	3	30	16	3.5	30
44	2	1	25	4	5	10
45	2	1	25	28	2	10
46	2	5	25	28	5	10
47	2	1	35	28	5	10
48	2	1	35	4	2	10
49	2	1	35	28	2	50
50	2	5	25	4	2	10
51	2	5	35	28	5	50

A: Inoculo (%) B: Temperatura (°C) C: Incubación (Días) D: Té (g/L) y E: Azúcar (g Dextrosa/L).

Posteriormente se realizaron gráficos de contorno con los resultados significativos ( $P \leq 0.05$ ) de las interacciones para cada una de las variables estudiadas.

## **Fase II: Validación**

Se realizará una optimización con resultados objetivos (Obj) para cada variable analizada, que se establecerán una vez se obtengan los resultados del modelo. Este proceso de optimización se realizará con el programa analítico MiniTab, el cual establecerá condiciones para cada uno de los factores que ayuden a la obtención de una respuesta dada, en este caso, la obtención de una mayor cantidad de compuestos antioxidantes.

Para la validación del proceso se comparará el resultado de la replica del tratamiento optimizado contra los Intervalos de Confianza 95% (IC95%). Si el resultado entra en los valores del intervalo, el proceso es correcto.

## **Fase III: Evaluación Sensorial**

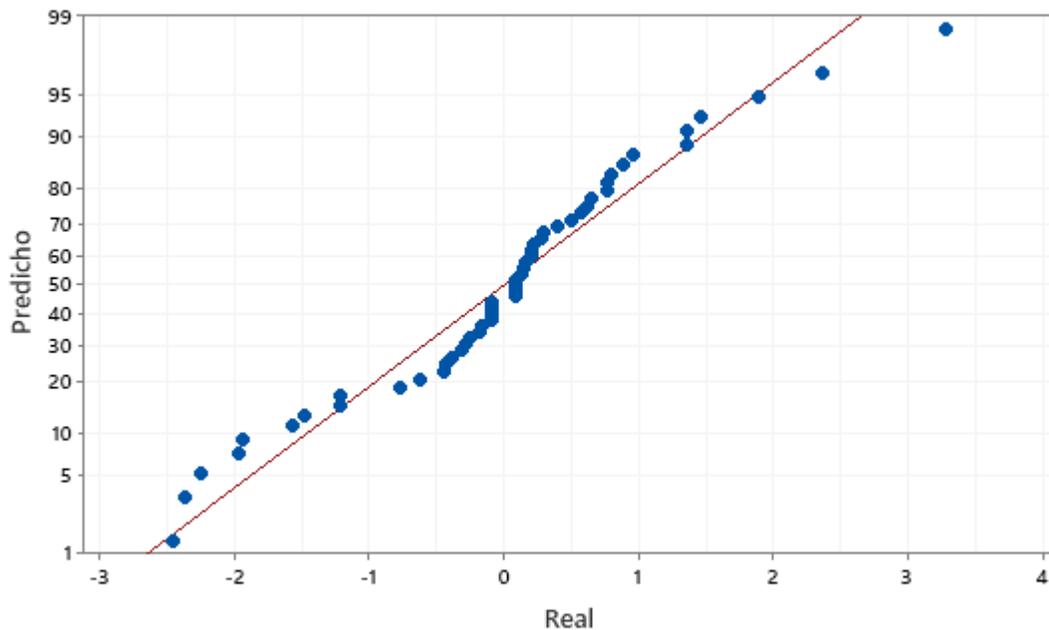
Para la primera evaluación realizada se utilizó un estadístico de medianas de Friedman para determinar si existía o no diferencia significativa en el agrado de cada uno de los atributos a través de los días de fermentación.

La evaluación de los resultados de la segunda evaluación sensorial se llevó a cabo utilizando un análisis de varianza ANOVA y una comparación de medias de TUKEY para determinar si existe una diferencia significativa entre: el agrado de los 5 puntos evaluados a través de tiempo para cada sabor de kombucha y entre los diferentes sabores.

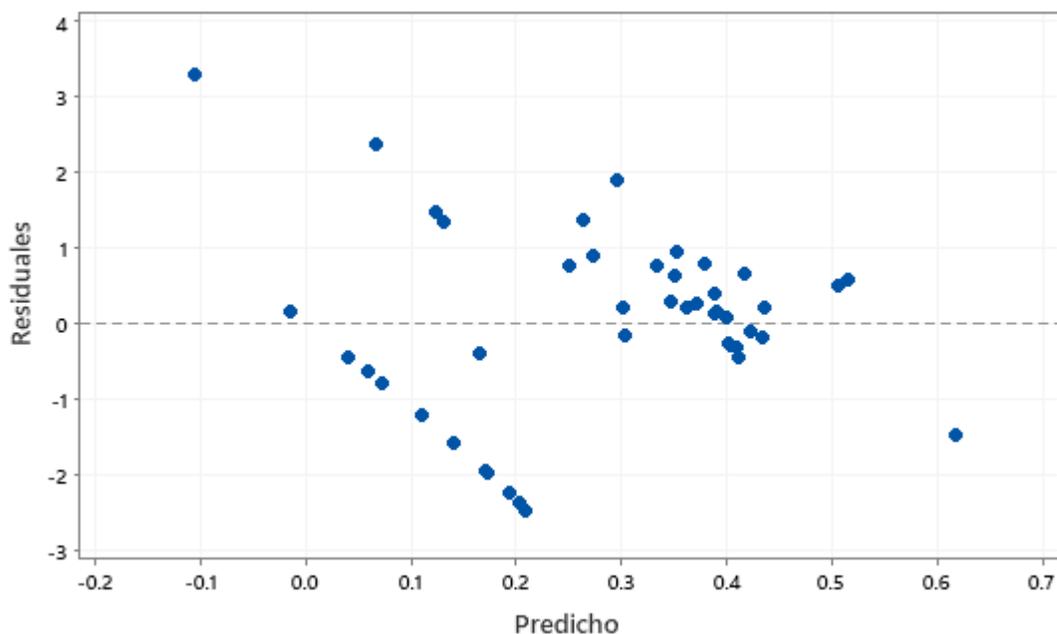
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Fase 1

Por la complejidad del diseño el modelo obtenido logra explicar una parte de la actividad antioxidante basada en las variables mencionadas ( $R^2= 64.24\%$ ). Los datos obtenidos en las distintas corridas experimentales se ajustan a los datos predichos modelo (Figura 2) de los reales, y mantienen cercanos los valores entre ellos (Figura 3).



**Figura 2.** Gráfico de datos predichos vs reales.



**Figura 3.** Gráfico de residuales.

Para cada una de las variables evaluadas se presenta la media global del modelo (Resultante del Anexo 1), así como un coeficiente de determinación ( $R^2$ ; Cuadro 5). Mientras que el cuadro 6 representa el ANOVA para el modelo.

**Cuadro 5.** Promedios globales del Diseño de Componentes Centrales

Variable	Media	$R^2$ (%)
pH	2.5819±0.4	84.73%
Acidez (%)	0.1349±0.1289	75.19%
Sólidos Solubles (°Brix)	8.206±5.229	65.10%
Azúcares (g Dextrosa/L)	16.62±9.25	70.76%
DPPH (meq Trolox/mL)	222.9±90.4	40.8%
ABTS (meq Trolox/mL)	589.6±189.9	44.86%
FRAP (uM Trolox/mL)	274.8±100.1	70.01%
FENOLES (ug GAE/mL)	433.86±2.99	64.24%

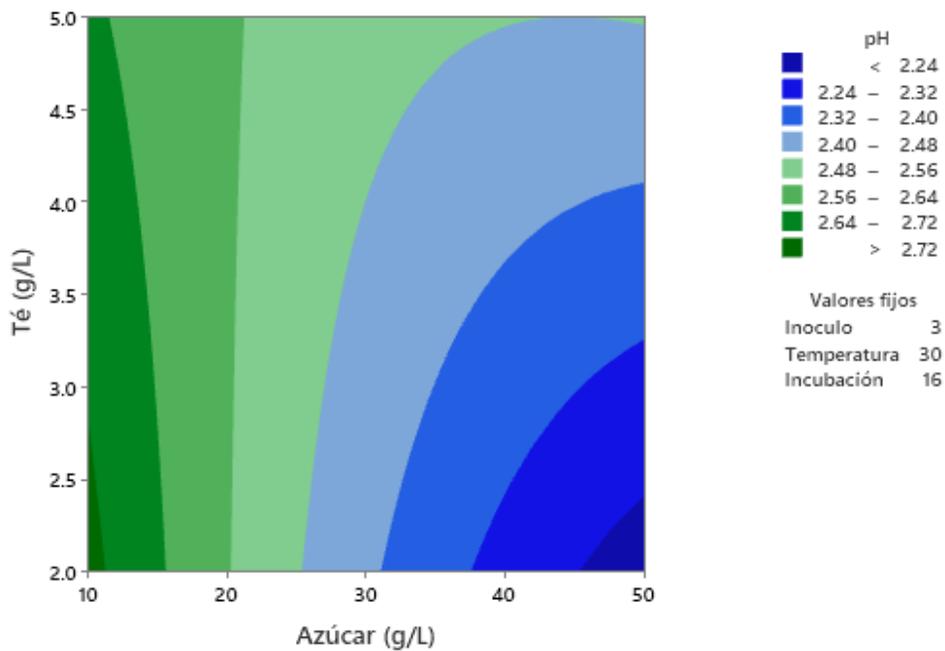
Resultados promedio  $\pm$  su desviación estándar

**Cuadro 6.** Tabla ANOVA donde A=Inoculo (%) B=Temperatura (°C) C=Incubación (Días) D=Té (g/L) y E=Azúcar (g Dextrosa/L).

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Media Cuadrada	Valor F	Valor P
<b>Modelo</b>	6.79	22	0.0308	7.06	0
<b>A</b>	0.13	1	0.13	3.02	0.093
<b>B</b>	0.04	1	0.049	1.14	2.95
<b>C</b>	4.13	1	4.13	94.58	0
<b>D</b>	0.07	1	0.07	1.83	0.187
<b>E</b>	1.0	1	1	24.92	0
<b>AA</b>	0.0004	1	0.0004	1.58	0.921
<b>BB</b>	0.038	1	0.038	0.88	0.356
<b>CC</b>	0.1357	1	0.1357	3.1	0.089
<b>DD</b>	0	1	0	0	0.066
<b>EE</b>	0.0083	1	0.0083	1.97	0.077
<b>AB</b>	0.0051	1	0.0051	0.14	0.716
<b>AC</b>	0.09	1	0.09	2.2	0.149
<b>AD</b>	0.0511	1	0.0511	1.17	0.289
<b>AE</b>	0.0568	1	0.0568	1.3	0.264
<b>BC</b>	0.0006	1	0.0006	0.02	0.901
<b>BD</b>	0.104	1	0.104	2.38	0.134
<b>BE</b>	0.0024	1	0.0024	0.05	0.817
<b>CD</b>	0.075	1	0.075	1.73	0.199
<b>CE</b>	0.1892	1	0.1892	4.33	0.047
<b>DE</b>	0.2799	1	0.2799	6.4	0.017

#### 4.1.1 pH

El comportamiento del pH dio como resultado un modelo cuyo ajuste fue 84.73% ( $R^2$ ). El pH se vio influenciado significativamente ( $P < 0.05$ ) por la relación azúcar y té. En la Figura 4 se puede observar que los valores de pH decrecen a mayor concentración de azúcar, lo cual es ideal para kombucha; a pH bajo se genera ácido acético, dándole un toque ácido característico al fermento. Valores de pH bajos se relacionan con concentraciones bajas de té utilizados.

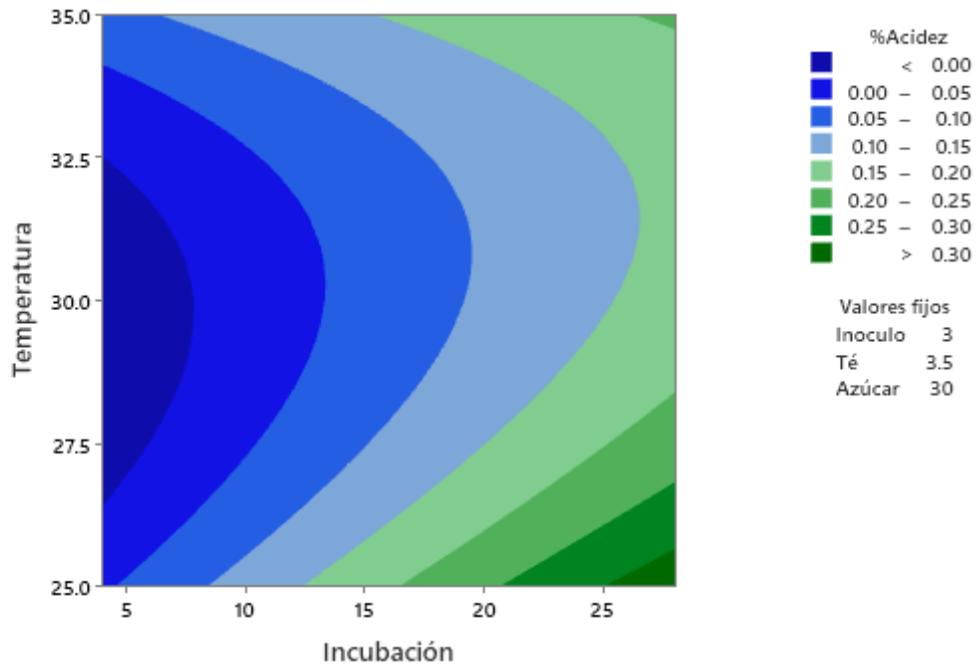


**Figura 4.** Gráfico de contorno para pH para la interacción azúcar y té.

#### 4.1.2 Acidez total

El porcentaje de acidez dio como resultado un ajuste del modelo de 75.19% donde solamente hubo diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en la interacción temperatura contra el inóculo.

En la Figura 5 se observa que el mayor porcentaje de acidez (0.42%) es a los 25 d de incubación con temperaturas de 25 °C. La acidez generada en la kombucha de zacate limón se debe principalmente a la presencia de cafeína y los polifenoles, estos confieren astringencia y sabores ácidos al fermentado y son ampliamente encontrados en las hojas secas de té, en volúmenes de 30 a 40% (p/p en peso seco; Balentine et al. 2017).



**Figura 5.** Gráfico de contorno para los valores de % Acidez para la interacción incubación\*temperatura.

#### 4.1.3 Sólidos solubles

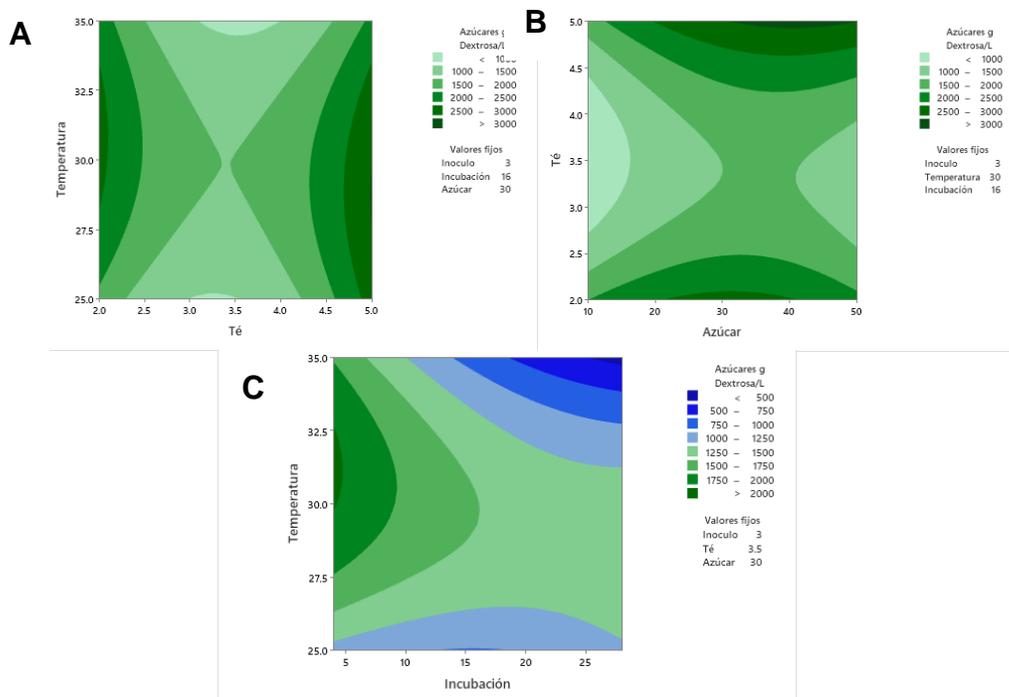
La cuantificación de sólidos solubles explicado un 65.10% por el modelo ( $R^2$ ) y tuvo ninguna diferencia estadística ( $P < 0.05$ ) con las otras variables por lo que no hay ninguna interacción en el modelo. Sin embargo, la concentración de sólidos solubles cuantificados por los °Brix están relacionados con el consumo del sustrato o la producción de celulosa microbiana generada durante la fermentación.

Vargas-Mora (2011) elaboró kombuchas con la adición de miel como sustituto de la fuente de carbono para la kombucha; sus resultados indicaron que no hay cambios importantes (12 a 11.13) en los °Brix después de casi 10 d de fermentación, pero al combinar 50/50 sacarosa/miel de abeja, la concentración de sólidos solubles disminuía hasta los 9 °Brix. Lo cual puede estar relacionada con la afinidad que tienen los microorganismos para consumir las fuentes de carbono (Vargas-Mora, 2011).

#### 4.1.4 Azúcares totales

Los azúcares totales indican que existe una alta dependencia para obtener la mayor actividad antioxidante en el fermentado ( $R^2= 70.76\%$ ). Las concentraciones más bajas de azúcares totales fueron cuantificadas a temperaturas de 25 °C y 35 °C (Figura 6A) y concentraciones intermedias de té (3.5 g/L) y dextrosa (10 g/L; Figura 6B). Por último, la Figura 6C muestra el comportamiento de la cantidad de azúcares presentes en el medio en la interacción del tiempo de incubación y temperatura de incubación; aquí se puede ver que las concentraciones más bajas se encuentran en días de incubación menores a 15 y temperaturas que oscilan entre los 28 y 32 °C. El comportamiento observado indicó que los microorganismos capaces de consumir dextrosa la hacen de manera constante durante toda la fermentación, indicando que, entre más tiempo pase, se consume una mayor cantidad de azúcar.

Molina (2019) realizó un estudio con kombucha utilizando borras de café, en sus resultados donde las concentraciones finales de azúcares totales son mayores a las de esta experimentación (39.62 g/L vs. 160 mg/L). Esto puede deberse a compuestos contenidos en las borras de café que puedan metabolizarse en el proceso de fermentación. Comportamiento diferente al mostrado, teniendo en este estudio, kombuchas de menor contenido de azúcares totales.

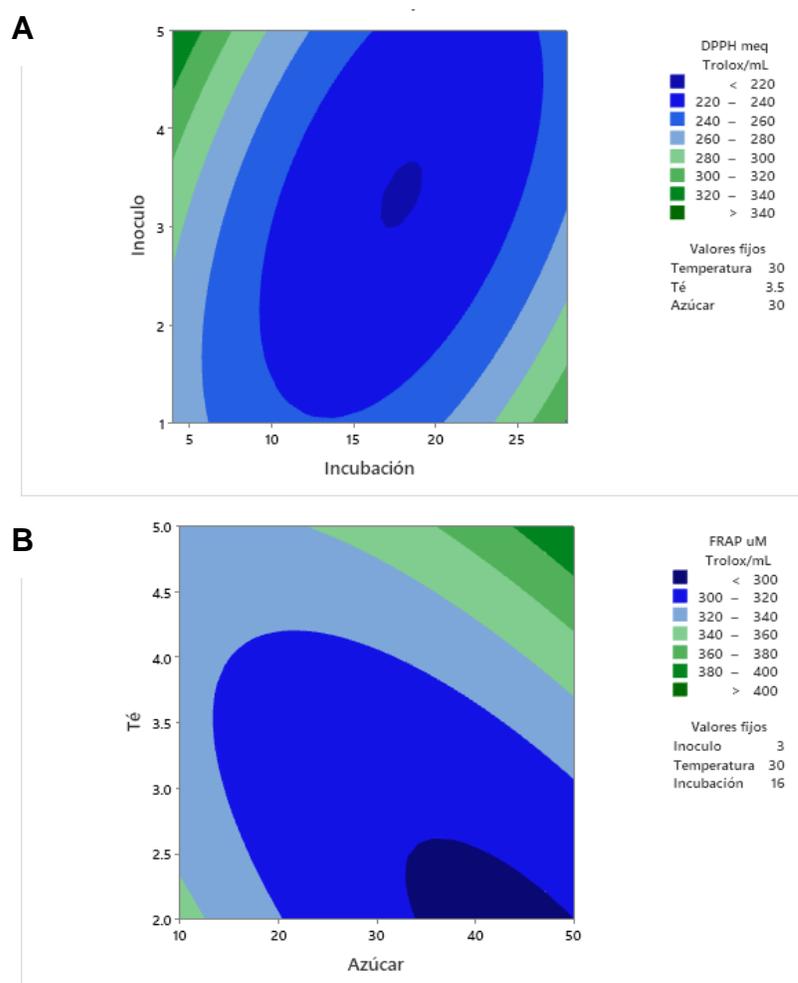


**Figura 6.** Gráficas de contorno para la concentración de azúcares totales en la interacción: A) té\*temperatura; B) té\*azúcar y C) incubación\*temperatura.

#### 4.1.5 Capacidad Antioxidante

La cuantificación de la capacidad antioxidante por el ensayo del radical DPPH dio como resultado una  $R^2$  de 40.8%, teniendo un promedio global de  $222.9 \pm 90.4$  meq Trolox/mL. Se encontraron resultados significativos ( $P=0.039$ ) para la interacción inoculo y tiempo (figura 7A) La concentración de Trolox va aumentando conforme pasan los días de fermentación, pero se cuantifican mayores concentraciones (mayores a 220 meq Trolox/mL) en aquellos fermentados con menor cantidad de inóculo.

La cuantificación de la capacidad antioxidante por el ensayo del radical ABTS dio como resultado una  $R^2$  de 44.8% un promedio global de  $589.6 \pm 189.9$  meq Trolox/mL. Además, no se encontraron resultados significativos ( $P > 0.05$ ) para ninguna de las interacciones del modelo. Para ambas actividades complementarias de antioxidantes, posiblemente puede haber interacciones antagonistas o sinérgicas entre los compuestos fenólicos y otros metabolitos que pueden afectar la actividad antioxidante para compuestos que son medidos por DPPH y ABTS



**Figura 7.** Gráfico de contornos para la capacidad antioxidante de las kombuchas donde A) Prueba DPPH para la interacción incubación\*inoculo. y B) Para la prueba del poder reductor del ion fierro (FRAP) para la interacción azúcar\*té.

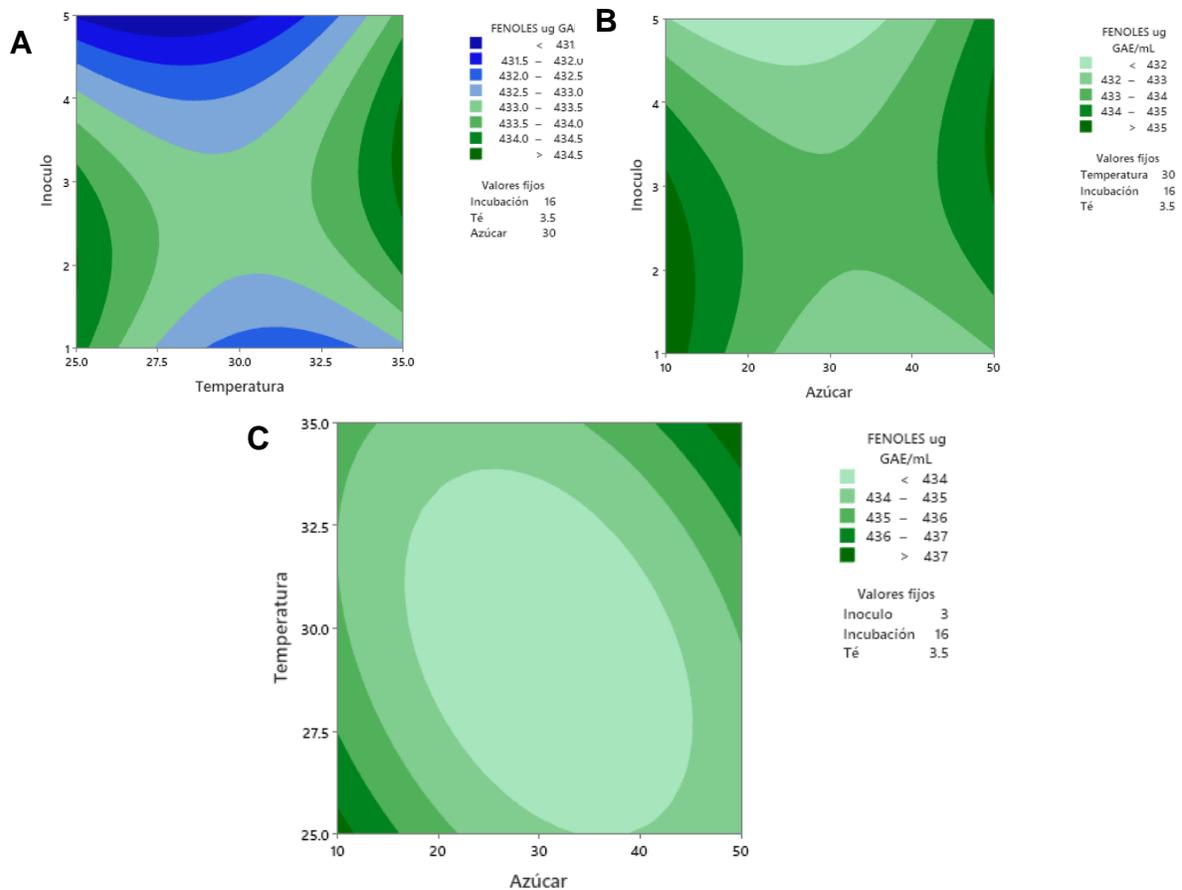
La capacidad antioxidante para la reducción del ion fierro (FRAP) se obtuvo un ajuste ( $R^2$ ) de 70.01% y se encontró diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) para la interacción té con azúcar, así como en los factores inóculo y temperatura. En la Figura 8B se puede observar que las mayores concentraciones (mayores a 400  $\mu\text{M}$  Trolox) de equivalentes micro molares de Trolox se encuentran en aquellos tratamientos con altas concentraciones de azúcar mientras que el té entre menor cantidad hay en el medio, más poder reductor hay en el medio.

Tamer et al. (2021) realizaron kombucha utilizando té negro y verde, al principio de la fermentación cuantificaron  $150.28 \pm 5.32 \mu\text{M}$  de Trolox para la prueba de FRAP, pero a medida que avanzó la fermentación (9 d), la concentración se incrementó a  $223.85 \pm 5.79 \mu\text{M}$  de Trolox. Abuduabifu y Tamer (2019) realizaron kombucha con baya goji negra y roja; los resultados más altos de FRAP se obtuvieron en día 11 de fermentación, donde se encontraron  $90.77 \pm 2.60 \mu\text{M}$  de Trolox. En la presente investigación las concentraciones máximas cuantificadas fueron mayores, entre 430 y 437  $\mu\text{M}$  de Trolox en los tratamientos de 16 días, 3% de inóculo, 3% de azúcar, 30°C y 3.5 g/L de té en 26 días.

#### **4.1.6 Cuantificación de Fenoles Totales**

La cuantificación de fenoles totales dio como resultado un ajuste del modelo de 64.24% ( $R^2$ ), teniendo interacciones significativas ( $P < 0.05$ ) entre el inóculo, temperatura y azúcar (Figura 9). Se cuantifica la mayor concentración de compuestos fenólicos (355 y 364  $\mu\text{g GAE/mL}$ ) en la Figura 8A se puede apreciar que, a mayor concentración de inóculo, a temperaturas entre 25 y 30°C se pueden ver contenidos de fenoles totales más altos. En la Figura 8B se pueden encontrar los picos más altos con concentraciones de azúcar entre 10 y 30 g/L con inóculos del 1% o del 5%. Para la Figura 8C muestra estos mismos rangos de azúcar en el medio y se puede comprobar que la mejor respuesta es a temperaturas de 25 y 30°C.

La cantidad de compuestos fenólicos puede estar relacionada con el comportamiento del pH en el medio (Torskangerpoll y Andersen, 2004); esos autores sugieren que los compuestos fenólicos tales como las antocianinas pueden permanecer estables por más tiempo cuando se encuentran en medios ácidos. La reducción de la actividad fenólica también puede estar relacionada con la cantidad de inóculo y tiempo de fermentación. Blanc (1996) explicó que puede deberse además a que los téis utilizados como medios de fermentación, tienen metabolitos indeseados que pueden reaccionar y degradar los compuestos fenólicos, y los tiempos prolongados de fermentación pueden presentar el mismo comportamiento por la producción de sustancias oxidantes.



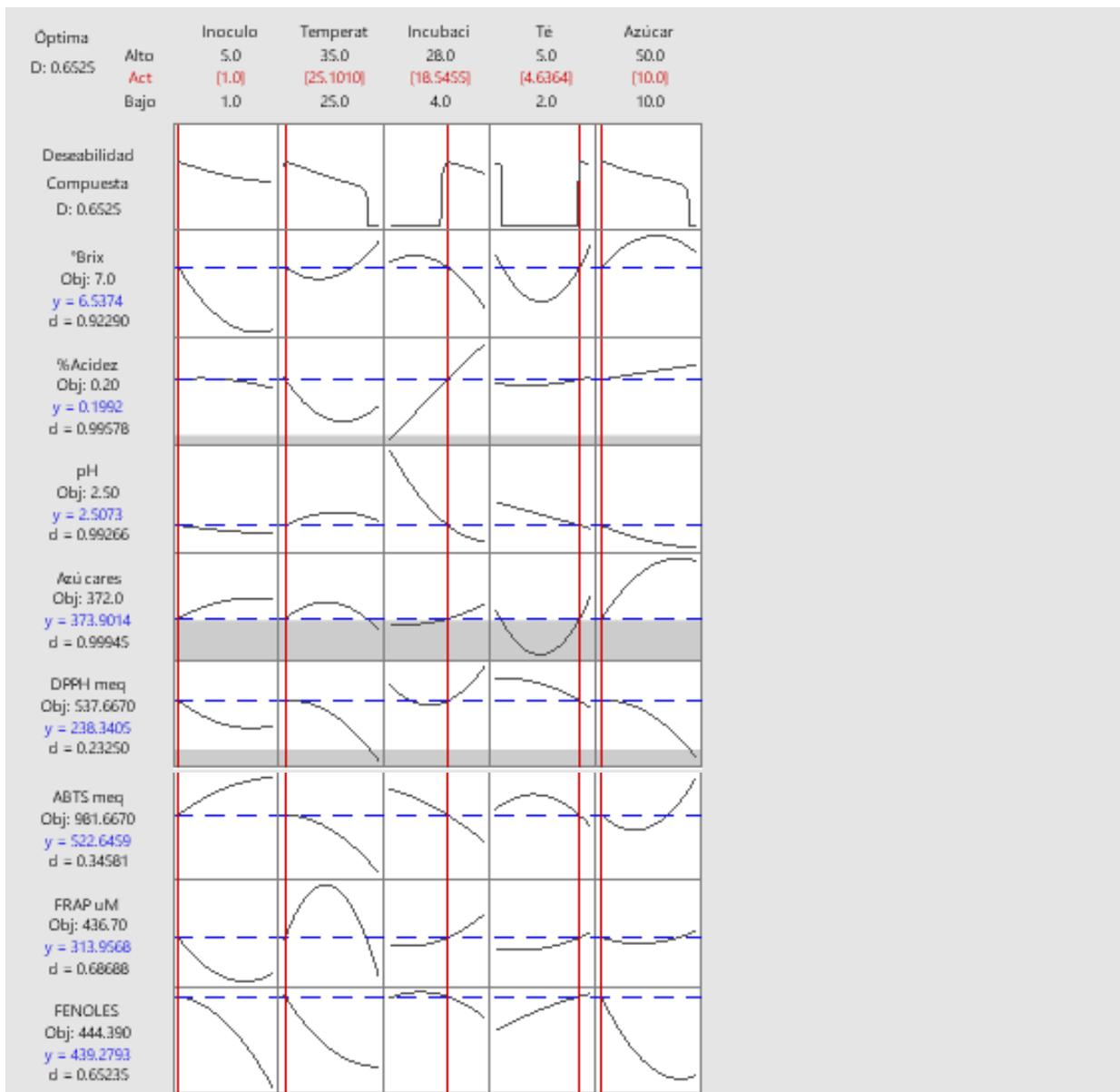
**Figura 8.** Gráfico de superficie de respuesta para la cuantificación de fenoles totales en  $\mu\text{g GAE/mL}$  para las interacciones: A) inóculo\*temperatura, B) inóculo\*azúcar y C) azúcar\*temperatura.

## 4.2 FASE 2: Validación

Los resultados de la optimización del proceso se pueden observar en la figura 9 donde se establecen las condiciones de optimización para cada una de las variables, a cada una se le asignó un valor objetivo y el gráfico muestra a su vez, el punto en donde se puede alcanzar este valor objetivo bajo las condiciones de cada uno de los factores del modelo (valor actual o “act”). Las condiciones óptimas de fermentación resultantes para una mayor actividad antioxidante mediante los ensayos de radical ABTS, DHHP y el ensayo FRAP de la kombucha fueron: incubación de 18 días; temperatura a  $25^{\circ}\text{C}$ ,  $4.6 \text{ g/L}$  de té y  $1\%$  de inóculo (Figura 9).

La validación del proceso de optimización se puede observar en el Cuadro 7, donde se expresan los resultados objetivos, los resultados promedio de la reproducción del tratamiento optimizado y el intervalo de confianza (IC95%).

Como se mencionó anteriormente, el criterio de validación fue la evaluación del promedio contra los IC95%, por ende; el tratamiento S1 cumple con la optimización (a excepción del contenido de fenoles totales).



**Figura 9.** Gráfico de las condiciones de la optimización para los 5 factores del modelo, donde se especifican puntos altos, actuales y bajos. Se considera un punto actual el valor “actual” o resultante de la optimización.

**Cuadro 7.** Caracterización de kombuchas a base de zacate limón.

Variable	Resultado objetivo	Resultado promedio	IC de 95%
pH	2.5	2.51	(2.171, 2.840)
Acidez (%)	0.2	0.03	(0.0613, 0.3360)
Sólidos solubles (°Brix)	7	0	(-0.22, 13.00)
Azúcares (g Dextrosa/L)	3.72	2.31	(-7.20, 14.20)
DPPH (meq Trolox/mL)	537.667	248.92	(91.5, 389.2)
ABTS (meq Trolox/mL)	981.667	373.75	(222, 825)
FRAP (µM Trolox/mL)	436.7	326.75	(200.2, 434.8)
FENOLES (µg GAE/mL)	444.439	180.95	(435.35, 443.01)

**IC: intervalos de confianza resultantes del modelo optimizado.**

Los resultados en fermentados de kombucha de tomillo, hierbabuena y zacate limón, se puede observar en los Cuadros 8 a 10. Para las tres diferentes hierbas el comportamiento es similar en todas las variables evaluadas.

**Cuadro 8.** Caracterización de kombuchas a base de tomillo a 18 d de fermentación.

	T1	T2	T3
pH	3.18±0.06a	3.05±0.03a	3.29±0.06a
Acidez (%)	0.108±0a	0.084±0ab	0.088±0.006a
Sólidos solubles (°Brix)	7.7±0.57a	7.7±0a	8±0.57a
Azúcares totales (g/L)	6.99±0.28a	6.52±0.069a	6.8±0.419a
Azúcares reductores (g/L)	0.36±0.03ab	0.37±0.049ab	0.484±0.018a
Azúcares no reductores (g/L)	6.63±0.256 a	6.15±0.044 a	6.36±0.4 a
DPPH (meq Trolox/L)	809.12±15.4 b	830.25±18.82 ab	847.76±3.72 a

Letras minúsculas indican la comparación de medias de Tukey

Para tomillo todas las variables evaluadas no mostraron diferencias estadísticas entre las concentraciones de tomillo, salvo la concentración de DPPH, la cual es mayor cuando aumenta la concentración del té en el fermentado.

**Cuadro 9.** Caracterización de kombuchas a base hierbabuena a 18 d de fermentación.

	<b>H1</b>	<b>H2</b>	<b>H3</b>
<b>pH</b>	3.418±0.013 a	3.212±0.03 b	3.123±0.0001 c
<b>Acidez (%)</b>	0.064±0.006 a	0.072±0 a	0.06±0.02 a
<b>Sólidos Solubles (°Brix)</b>	10±0 a	10±0 a	10±0 a
<b>Azúcares totales (g/L)</b>	7.3±0.079 a	6.98±0.169 a	6.41±0.255 b
<b>Azúcares reductores (g/L)</b>	0.54±0.01b	0.57±0 b	0.63±0.014 a
<b>Azúcares no reductores (g/L)</b>	6.76±0.091 a	6.41±0.169 ab	5.78±0.246 b
<b>DPPH (meq Trolox/L)</b>	713.1±13.59 ab	662.9±31.07 b	733±23.08 a

Letras minúsculas indican la comparación de medias de Tukey

En fermentados con hierbabuena se observó que a mayor concentración de ésta, disminuye el pH, los azúcares totales, aumentan los azucares reductores y la concentración del radical DPPH (Cuadro 9).

**Cuadro 10.** Caracterización de kombuchas a base de zacate limón durante 18 d de fermentación.

	<b>Z1</b>	<b>Z2</b>	<b>Z3</b>
<b>pH</b>	2.707±0.101a	2.445±0.018 b	2.61±0.013ab
<b>Acidez (%)</b>	0.12±0b	0.16±0.018a	0.136±0.013ab
<b>Sólidos Solubles (°Brix)</b>	6.3±0.57 a	8±0 a	9.6±4.4 a
<b>Azúcares totales (g/L)</b>	5.55±0.015 ab	5.35±0.011 b	5.66±0.109 a
<b>Azúcares reductores (g/L)</b>	0.78±0.026 b	0.997±0.08 a	0.816±0.037 ab
<b>Azúcares no reductores (g/L)</b>	4.77±0.042 a	4.353±0.11 b	4.844±0.134 a
<b>DPPH (meq Trolox/L)</b>	586.89±149.45 b	696.8±2.09 a	655.74±16.43 ab

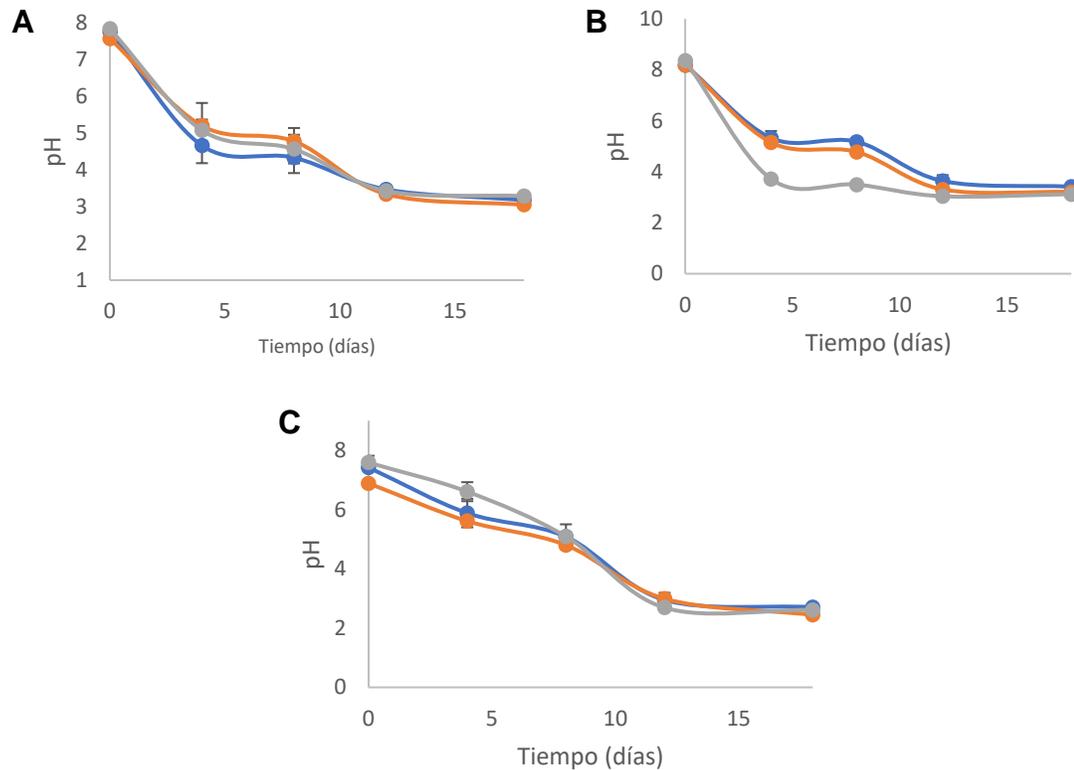
Letras minúsculas indican la comparación de medias de Tukey

En fermentados con zacate limón se observó que a mayor concentración de este disminuye el pH, mientras que los sólidos solubles, los azúcares totales y los no reductores aumentan. Para la capacidad antioxidante y azúcares reductores los mejores resultados se encontraron en valores medios de té (Cuadro 10).

#### 4.2.1 pH

El pH tuvo un comportamiento similar en las tres kombuchas, puesto a que en todos los tratamientos se redujo hasta alcanzar valores ácidos. En la Figura 10A se muestra el comportamiento para el tratamiento con tomillo donde se obtuvo el valor más bajo al día 18 de  $3.05 \pm 0.05$  con 2.3 g de tomillo. Para la Figura 10B se observa el comportamiento del fermentado con hierbabuena, obteniendo un pH  $3.123 \pm 0.03$  como el más bajo con 6.9 g al día 18. Mientras en la figura 10C con zacate limón se obtuvo al día 18 con 4.9 g, el valor más bajo de  $2.445 \pm 0.01$ . El decremento en la cantidad de pH en los fermentados es debido a que las bacterias utilizan azúcar como fuente de carbono y dependiendo de su metabolismo pueden producir principalmente ácido láctico y ácido acético.

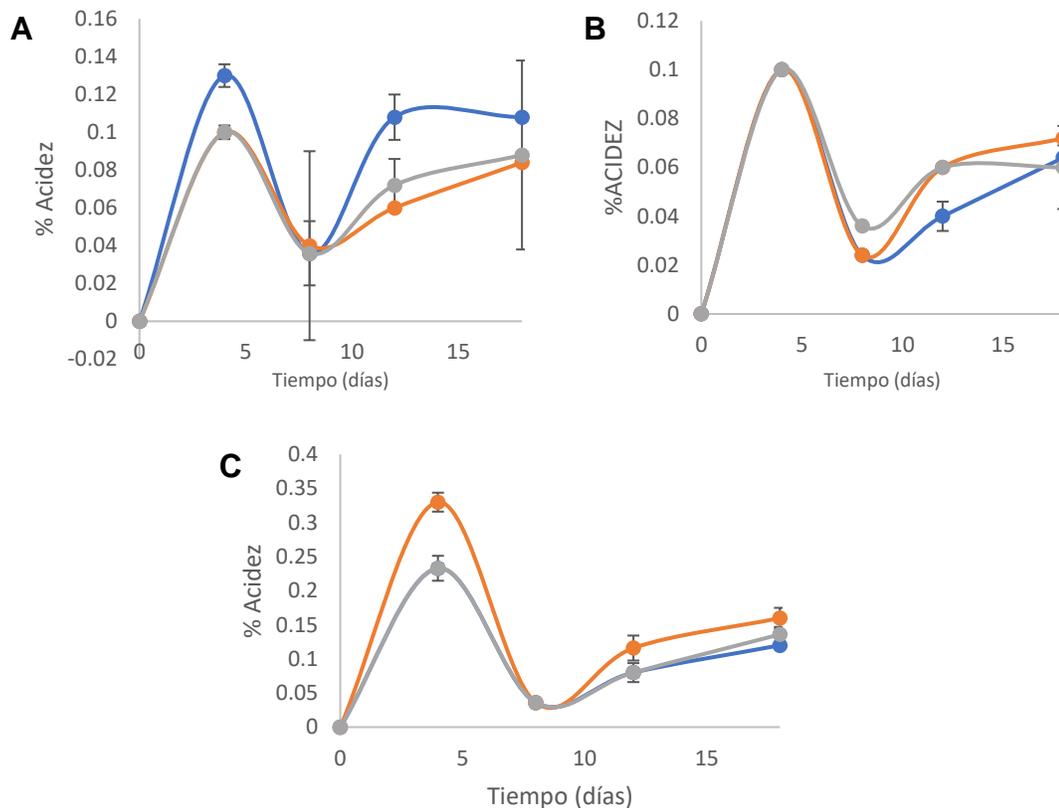
En un estudio similar, López-Zazueta et al. (2022) estudiaron los atributos de kombuchas de té verde, té limón e infusiones de hojas de guayaba durante 10 días, obteniendo valores de pH de 3.34, 3.65 y 3.42. Asimismo, López-Zazueta et al. (2022) indicaron que los valores de 2.5 y 4.2 son los recomendados para un consumo seguro. En este experimento los valores de pH encontrados son menores a los reportados en los tres tratamientos para la kombucha de té limón ( $2.707 \pm 0.101$ ,  $2.455 \pm 0.018$  y  $2.61 \pm 0.013$ ), esto puede deberse a que los tiempos de fermentación fueron diferentes. En dicho estudio se fermentó por 10 días, (en este estudio se fermentó durante 18 días). Observando la Figura 3, en el día 10 de fermentación se alcanzaron valores similares a López-Zazueta et al. (2022). Shahbazi et al. (2018) estudiaron las propiedades de la kombucha con cuatro variedades de plantas medicinales, incluyendo un tomillo de diferente variedad (*Shirazi thyme*). Los valores promedio de pH encontrados para este tomillo fueron de  $\sim 3.2$ , similar a los valores encontrados en este estudio para el tomillo que oscilan entre 3.1 a 3.4.



**Figura 10.** Cinéticas de cambio de pH en 18 días para tres tratamientos de tres diferentes kombuchas: A) tomillo. Donde T1 (azul) 2.3 g/L, T2 (naranja) 4.6g/L y T3 (gris) 6.9 g/L de tomillo. B) hierbabuena. Donde H1 (azul) 2.3 g/L, H2 (naranja) 4.6g/L y H3 (gris) 6.9 g/L de hierbabuena. y C) zacate limón. Donde ZL1 (azul) 2.3 g/L, ZL2 (naranja) 4.6g/L y ZL3 (gris) 6.9 g/L de zacate limón.

#### 4.2.2 Porcentaje de acidez

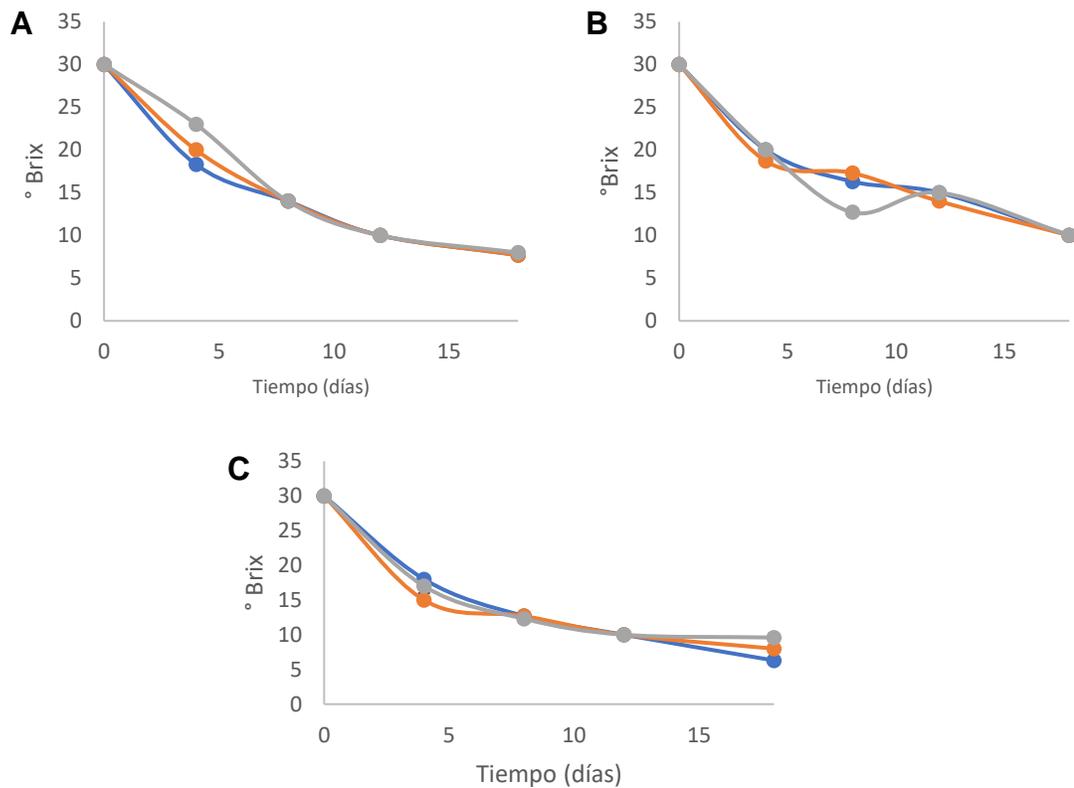
La cinética de comportamiento del porcentaje de acidez presente en las muestras durante 18 días se puede observar en la Figura 11. En ellas podemos observar que el pico más alto de acidez se encuentra en el día 4 para las kombuchas de tomillo, hierbabuena y zacate limón. Los valores más bajos de acidez a día 18 se encontraron en hierbabuena ( $0.07 \pm 0\%$ ) seguido de las kombuchas de tomillo ( $0.1 \pm 0\%$ ) y por último, las de zacate limón ( $0.16 \pm 0.018\%$ ).



**Figura 11.** Cinéticas de cambio del % de acidez en 18 días para tres tratamientos de tres diferentes kombuchas: A) tomillo. Donde T1 (azul) 2.3 g/L, T2 (naranja) 4.6g/L y T3 (gris) 6.9 g/L de tomillo. B) hierbabuena. Donde H1 (azul) 2.3 g/L, H2 (naranja) 4.6g/L y H3 (gris) 6.9 g/L de hierbabuena. y C) zacate limón. Donde ZL1 (azul) 2.3 g/L, ZL2 (naranja) 4.6g/L y ZL3 (gris) 6.9 g/L de zacate limón.

#### 4.2.3 Sólidos Solubles

La cinética de comportamiento del contenido de sólidos solubles presente en las muestras durante 18 días se puede observar en la Figura 12. Los sólidos solubles totales decrecieron a medida que pasan los días de fermentación; esto se puede atribuir a la actividad metabólica del inóculo, pues este se encarga de transformar los sustratos y fuente de carbono en otros compuestos que le serán útiles para su desarrollo y formación de metabolitos secundarios, y en el caso de la kombucha, la producción del biopolímero. Los valores finales de °Brix a día 18 se encontraron entre los 10°Brix en hierbabuena, seguido de las kombuchas de tomillo (7.7-8°Brix) y por último, las de zacate limón (6-9°Brix).

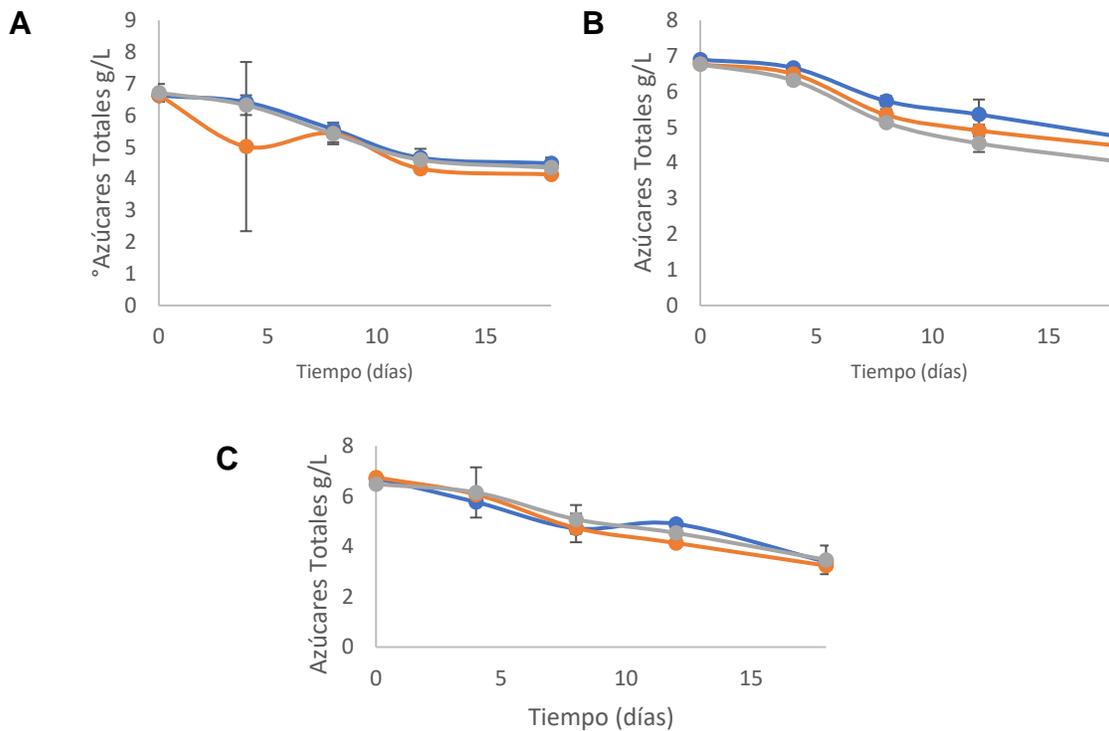


**Figura 12.** Cinéticas de cambio de sólidos solubles en 18 días para tres tratamientos de tres diferentes kombuchas: A) tomillo. Donde T1 (azul) 2.3 g/L, T2 (naranja) 4.6g/L y T3 (gris) 6.9 g/L de tomillo. B) hierbabuena. Donde H1 (azul) 2.3 g/L, H2 (naranja) 4.6g/L y H3 (gris) 6.9 g/L de hierbabuena. y C) zacate limón. Donde ZL1 (azul) 2.3 g/L, ZL2 (naranja) 4.6g/L y ZL3 (gris) 6.9 g/L de zacate limón.

#### 4.2.4 Azúcares totales

La cinética de comportamiento del contenido de azúcares totales presentes en las muestras durante 18 días se puede observar en la Figura 13. En los gráficos se puede notar un decremento en la cantidad de azúcares a través del tiempo, esto es debido a que el SCOBY utiliza la dextrosa en el medio como fuente de carbono principal para llevar a cabo sus procesos de fermentación. Los valores más bajos se obtuvieron en el día 18 para los tres tipos de kombuchas, teniendo  $6.99 \pm 0.28$ ,  $6.52 \pm 0.069$  y  $6.8 \pm 0.419$  g/L para tomillo,  $7.3 \pm 0.0079$ ,  $6.98 \pm 0.169$  y  $6.41 \pm 0.252$  g/L para hierbabuena y  $5.55 \pm 0.015$ ,  $5.35 \pm 0.011$  y  $5.66 \pm 0.109$  g/L para zacate limón en sus tres tratamientos, siendo ZL2 aquella con menor contenido de azúcares totales a día 18 y

HB1 aquella con mayor contenido de azúcares totales a día 18.

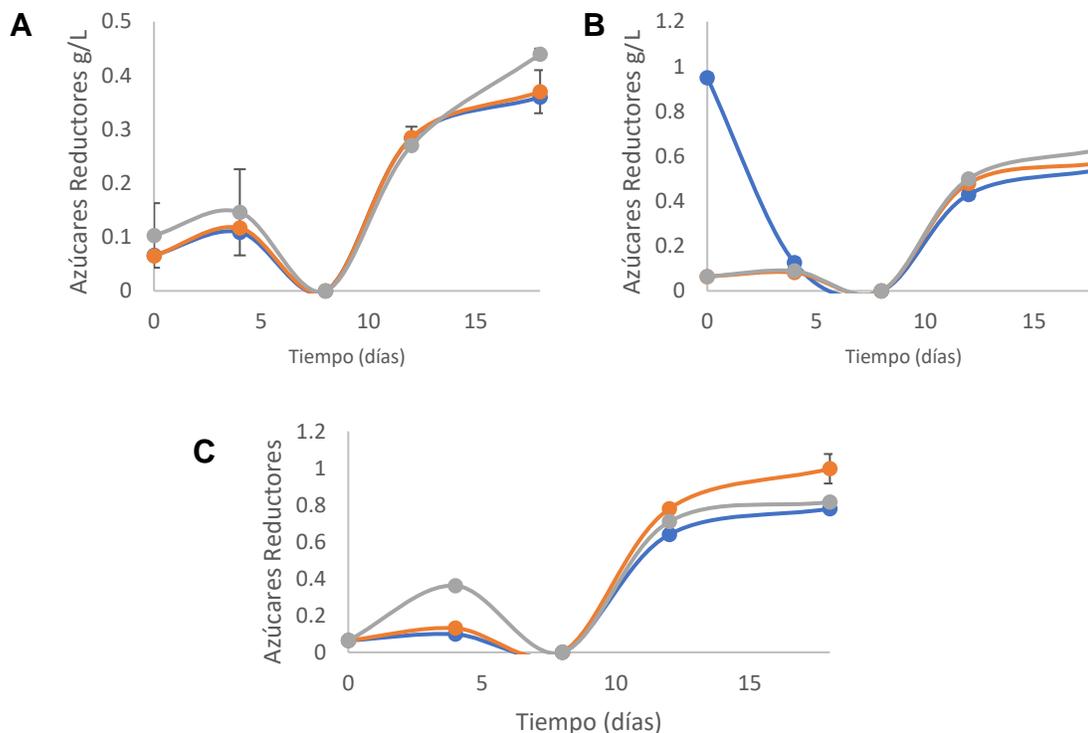


**Figura 13.** Cinéticas de cambio de la cantidad de azúcares totales en 18 días para tres tratamientos de tres diferentes kombuchas: A) tomillo. Donde T1 (azul) 2.3 g/L, T2 (naranja) 4.6g/L y T3 (gris) 6.9 g/L de tomillo. B) hierbabuena. Donde H1 (azul) 2.3 g/L, H2 (naranja) 4.6g/L y H3 (gris) 6.9 g/L de hierbabuena. y C) zacate limón. Donde ZL1 (azul) 2.3 g/L, ZL2 (naranja) 4.6g/L y ZL3 (gris) 6.9 g/L de zacate limón.

#### 4.2.5 Azúcares reductores

La cinética de comportamiento del contenido de azúcares reductores presentes en las muestras durante 18 días se puede observar en la Figura 14. Los azúcares reductores de la kombucha aumentaron a través del tiempo; esto podría indicar que, durante el proceso de fermentación, el SCOBY produce una pequeña cantidad de azúcares reductores como puede ser la fructosa; sin embargo, dado los bajos niveles de pH se cree que la mayoría de los azúcares son metabolizados en etanol por las levaduras y después los grupos de acetobacterias metabolizarían este alcohol en ácido acético. Los valores más altos se obtuvieron en el día 18 para los tres tipos de

kombuchas, siendo ZL2 aquella con menor contenido de azúcares reductores a día 18 ( $0.997\pm 0.08$  g/L) seguido de HB1 ( $0.63\pm 0.014$  g/L) y por último T3 ( $0.484\pm 0.01$  g/L).



**Figura 14.** Cinéticas de cambio de la cantidad de azúcares reductores en 18 días para tres tratamientos de tres diferentes kombuchas: A) tomillo. Donde T1 (azul) 2.3 g/L, T2 (naranja) 4.6g/L y T3 (gris) 6.9 g/L de tomillo. B) hierbabuena. Donde H1 (azul) 2.3 g/L, H2 (naranja) 4.6g/L y H3 (gris) 6.9 g/L de hierbabuena. y C) zacate limón. Donde ZL1 (azul) 2.3 g/L, ZL2 (naranja) 4.6g/L y ZL3 (gris) 6.9 g/L de zacate limón.

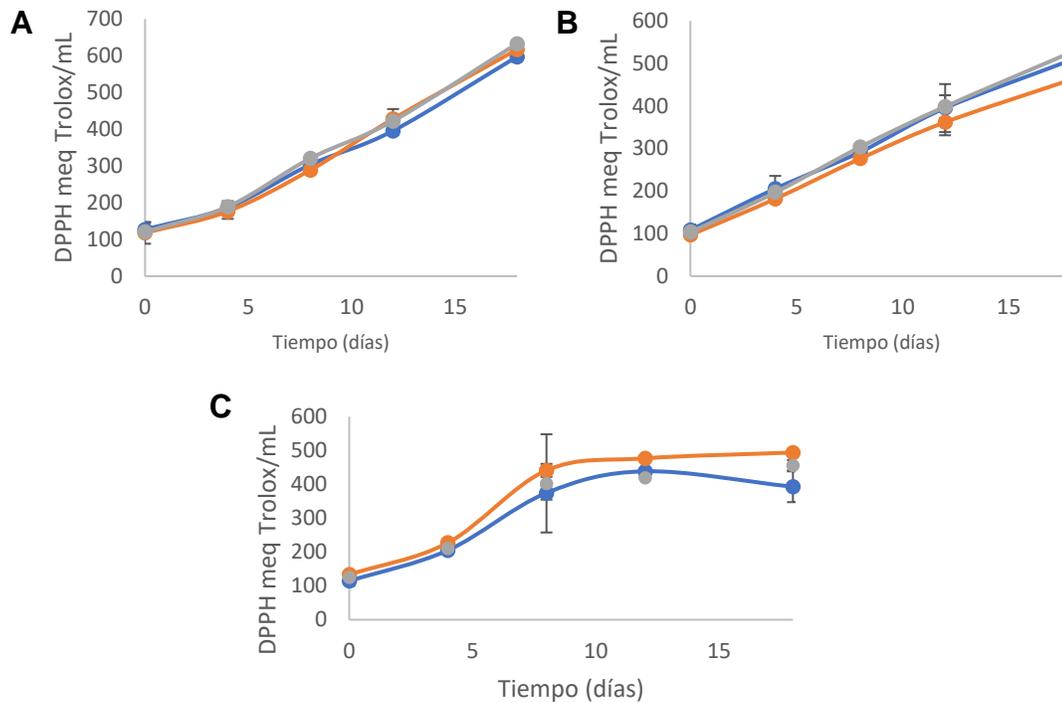
#### 4.2.6 Ensayo del radical DPPH

En la Figura 15 se muestran los comportamientos del radical DPPH- para el tomillo, hierbabuena y zacate limón. Se observa en los tres tratamientos se incrementó la concentración del radical, y para el día 18 se obtuvieron las mayores concentraciones en cada tratamiento, siendo para tomillo de  $847.76\pm 32.72$  meq Trolox/L, hierbabuena de  $733\pm 23.08$  meq Trolox/L y zacate limón de  $696\pm 2.09$  meq Trolox/L.

La cuantificación de la actividad antioxidante depende de los factores que controlan el proceso de obtención de los extractos a analizar. En zacate limón se ha evaluado en diferentes estudios y han encontrado que los extractos de metanol, MeOH/agua y la infusión de *C. citratus* tienen efectos de eliminación de radicales libres (medido con la técnica del radical 1,1-difenil-2 picril-hidrazilo (DPPH-), así como la eliminación del anión superóxido e inhibición de la enzima xantina oxidasa y peroxidación lipídica en eritrocitos humanos (Cheel et al., 2005). Esto disminuye la actividad antioxidante durante el proceso de extracción. Sin embargo, los extractos alcohólicos son los más reportados para su utilización.

González-Reza et al. (2016) elaboraron nano cápsulas de aceite de tomillo y cuantificaron  $272.79 \pm 41.46$   $\mu\text{mol}$  equivalentes de ácido ascórbico/g de aceite nanoestructurado para la prueba de DPPH-, a pesar de ser diferentes unidades de equivalencia, se reporta que es una buena cantidad de equivalentes. Lo cual significa que estos compuestos pueden estar presentes en otro tipo de preparaciones.

Nickavar et al. (2008) realizaron extractos con etanol de 5 especies de hierbabuena a las cuales les realizó un ensayo de DPPH-, en el cual, todos los extractos mostraron un notable efecto antirradical dependiente de la concentración, pero estos difirieron en sus actividades inhibitoras. La mayor actividad de barrido se observó para *M. piperita* [IC<sub>50</sub>=13.32 (12.12-14.64)  $\mu\text{g}$  catequina/ml], mientras que la más baja correspondió a *M. spicata* [IC<sub>50</sub> = 87.89 (81.66-94.59)  $\mu\text{g/ml}$ ]. Los valores de IC<sub>50</sub>(DPPH-) de los extractos aumentaron en el siguiente orden: *M. piperita*, *M. pulegium*, *M. rotundifolia*, *M. longifolia* y por último *M. spicata* (el IC<sub>50</sub> es el valor o cantidad mínima para inhibir algún proceso biológico concreto en un 50%).



**Figura 15.** Cinéticas de cambio de la actividad antioxidante del reactivo DPPH en 18 días para tres tratamientos de tres diferentes kombuchas: A) tomillo. Donde T1 (azul) 2.3 g/L, T2 (naranja) 4.6g/L y T3 (gris) 6.9 g/L de tomillo. B) hierbabuena. Donde H1 (azul) 2.3 g/L, H2 (naranja) 4.6g/L y H3 (gris) 6.9 g/L de hierbabuena. y C) zacate limón. Donde ZL1 (azul) 2.3 g/L, ZL2 (naranja) 4.6g/L y ZL3 (gris) 6.9 g/L de zacate limón.

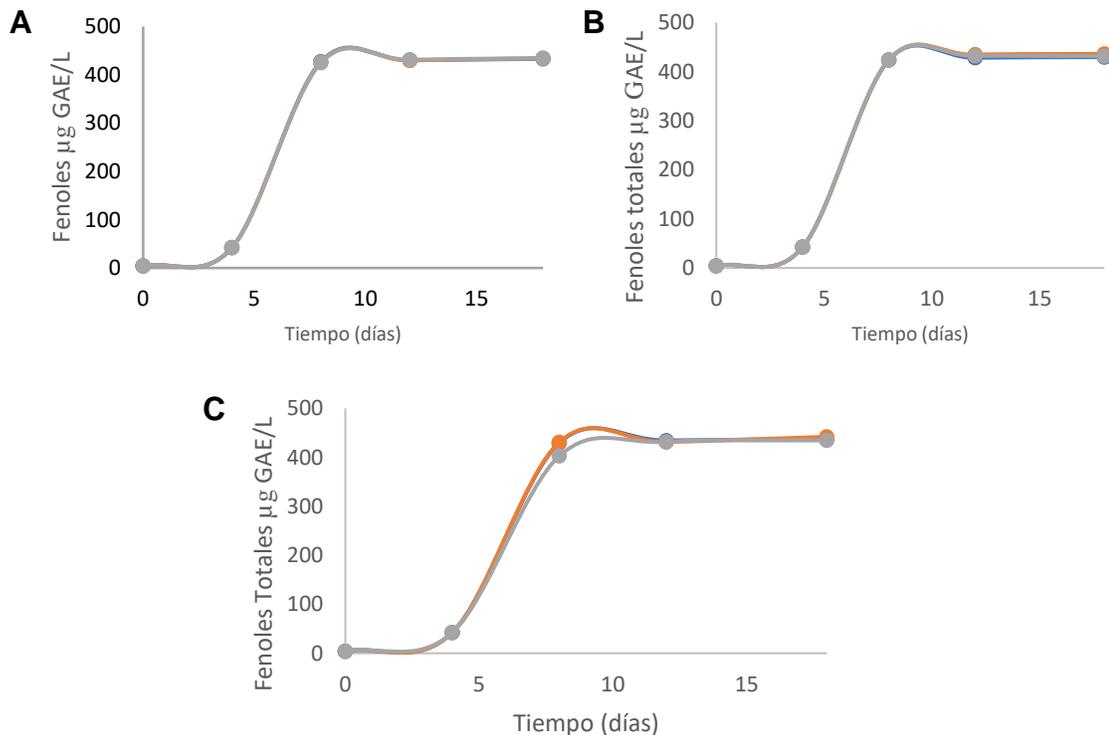
#### 4.2.7 Fenoles totales

En la Figura 16 se muestran los contenidos de fenoles totales para el tomillo, hierbabuena y zacate limón. Se observa en los tres tratamientos que independientemente de la concentración de la planta en el día 8 experimental se incrementó la concentración total de fenoles y para el día 18 se obtuvieron las mayores concentraciones de cada tratamiento siendo para zacate limón  $326.9 \pm 27.2 \mu\text{g GAE/L}$ , para tomillo  $233.12 \pm 21.26 \mu\text{g GAE/L}$  y  $207.4 \pm 153.1 \mu\text{g GAE/L}$  para hierbabuena.

Ortiz-Rojas (2016) realizó un estudio con distintos tratamientos para cuantificar la actividad fenólica utilizando tomillo y hierbabuena de la misma variedad que este estudio, encontrando 130 mg/ mg que, comparado con este estudio, los valores son menores, esto puede deberse al procesamiento de la muestra, es decir, la cantidad de compuestos fenólicos depende de la forma de extracción; a la cantidad de compuestos

que están presentes en la plantas evaluadas o la cantidad de compuestos generados durante la fermentación.

Tanticharakunsiri et al. (2022) estudió las propiedades funcionales del té oolong donde destaca que este té puede proveer aumentos en el contenido fenólico total (TPC) de la bebida de kombucha en un 6.6%, y lo comparó con un té de menta, que presentaba un 3.4%. Té como la yerba mate, el rooibos y el zijuan también fueron analizados por Tsuru et al. (2021) como sustratos alternativos de la kombucha, con estudios que destacan su superioridad en comparación con la kombucha de té negro en cuanto a su mayor actividad antioxidante, menor estrés oxidativo y mejores características sensoriales.



**Figura 16.** Cinéticas de cambio de la cantidad de azúcares reductores en 18 días para tres tratamientos de tres diferentes kombuchas: A) tomillo. Donde T1 (azul) 2.3 g/L, T2 (naranja) 4.6g/L y T3 (gris) 6.9 g/L de tomillo. B) hierbabuena. Donde H1 (azul) 2.3 g/L, H2 (naranja) 4.6g/L y H3 (gris) 6.9 g/L de hierbabuena. y C) zacate limón. Donde ZL1 (azul) 2.3 g/L, ZL2 (naranja) 4.6g/L y ZL3 (gris) 6.9 g/L de zacate limón.

### **Fase 3: Evaluación Sensorial**

#### **4.3.1 Prueba sensorial con evaluadores no entrenados**

En la prueba sensorial no se encontró diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) entre las kombuchas de diferentes sabores y entre los tiempos de fermentación.

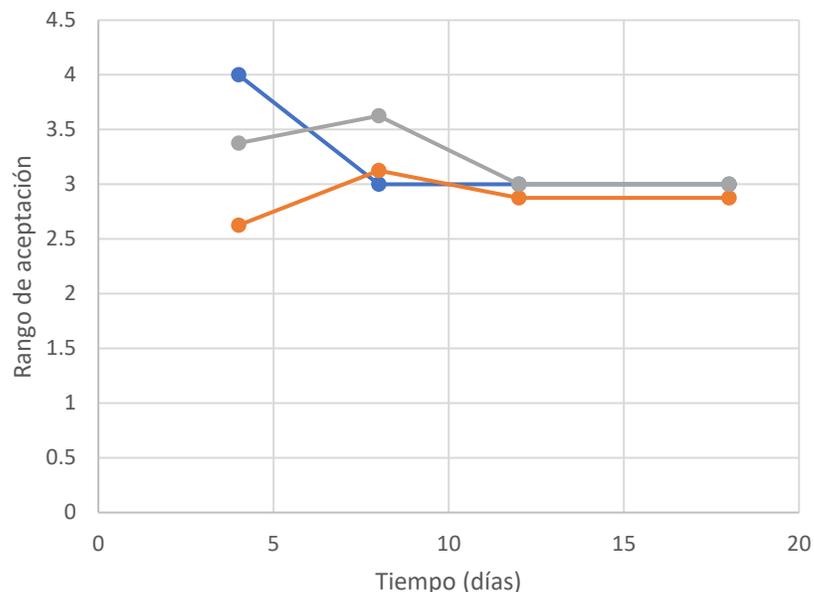
En el Cuadro 11 se encuentran las medianas resultantes de la evaluación sensorial. No se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los diferentes sabores de kombucha, así como para los tiempos de fermentación. Sin embargo, se puede notar como las kombuchas de zacate limón tienen mayor preferencia en los atributos de color, olor y acidez en los primeros días de fermentación, mientras que, para sabor y aceptación general, los fermentados de hierbabuena tienen promedios más altos en el primer día evaluado (día 4). Además, se puede observar en la Figura 16 una tendencia hacia las calificaciones “3” de la evaluación sensorial, las cuales indicaban “no me gusta ni me disgusta” a excepción de los resultados de color para las kombuchas de zacate limón en todos los días de fermentación muestreados, los cuales se mantuvieron en 4, es decir “me gusta”.

Los evaluadores externaron para la kombucha de tomillo tenía notas muy especiadas, y que “no sabía igual a lo que olía”. Probablemente está interpretación esté relacionada con el poco consumo de bebidas saborizadas con especies de aromas intensos. Mientras para la kombucha de hierbabuena, resaltaron su agradable aroma, indicando que los sabores que presentaban eran muy suaves al paladar y baja acidez en comparación con las de tomillo y zacate limón, independientemente del día de la fermentación. La tendencia general se centró en la preferencia por las kombuchas con menos tiempo de fermentación; esto por el nivel de acidez. Este comportamiento se comprobó con la kombucha de zacate limón, ya que a medida que avanzaban los días de fermentación, los panelistas tenían menor agrado hacia ella, por el grado de acidez que se intensificaba (Figura 17).

**Cuadro 11.** Resultados de la evaluación sensorial de los 5 atributos de la kombucha de tomillo, hierbabuena y zacate limón a diferentes tiempo de fermentación.

Tiempo (días)	4			8			12			18		
	Planta											
	T	H	Z	T	H	Z	T	H	Z	T	H	Z
Color	3.50	3.25	4.00	3.50	3.25	4.00	3.50	3.25	4.00	3.50	3.25	4.00
Sabor	3.70	2.63	3.25	3.00	3.13	3.50	2.88	2.88	3.38	2.75	2.88	3.00
Olor	3.30	2.75	3.63	2.80	2.75	3.50	3.06	2.75	3.38	3.06	2.75	3.00
Acidez	3.13	3.00	3.63	3.00	3.00	3.63	2.88	3.00	3.38	3.00	3.00	2.88
Aceptación general	4.0	2.63	3.38	3.00	3.13	3.63	3.00	2.88	3.00	3.00	2.88	3.00

T= tomillo; H= hierbabuena; Z= zacate limón



**Figura 17.** Rango de aceptación a través de 18 días donde: Azul=Tomillo; Naranja=Hierbabuena y Verde=Zacate Limón para el atributo “Aceptación General”.

González-Téllez et al. (2018/ realizaron una evaluación sensorial no paramétrica con 32 evaluadores, para kombuchas de cardamomo y cúrcuma; cardamomo-árnica y cardamomo, árnica y clavo; sus resultados indican mayor aceptación a las kombuchas menos astringentes y con olores no relacionados con especies. Resultados similares se obtuvieron en el presente estudio con la kombucha de tomillo, que presentó una tendencia de menor aceptabilidad. Este comportamiento pudiera estar relacionado con los hábitos de consumo de un mexicano promedio que prefiere en bebidas no alcohólicas las azucaradas.

#### 4.3.2 Prueba sensorial con evaluadores semi entrenados

Los resultados se pueden observar en las Figuras 18, 19 y 20, donde los evaluadores prefirieron los colores más claros y traslucidos de las kombuchas de hierbabuena y zacate limón respecto a los colores opacos y ámbar resultantes de las kombuchas de tomillo. Esto se comprueba dado que los resultados de la evaluación sensorial del color fueron significativamente menores ( $P < 0.05$ ) para las kombuchas de tomillo en los días 4 y 8. Los panelistas mencionaban que los colores ámbar que caracterizaban a estos fermentados les parecía poco atractivo, ya que les recordaba

algún tipo de remedio casero al momento de relacionar colores y olores, caso contrario a las tonalidades cristalinas y blanquecinas de las kombuchas zacate limón al día 18, las cuales resultaron ser las más llamativas y mejor aceptadas por los evaluadores. Sin embargo, las kombuchas de hierbabuena y zacate limón, durante los días 4, 8 y 12 son estadísticamente iguales a pesar de que las kombuchas de hierbabuena presentaban tonalidades verduzcas, posiblemente debido a la concentración de clorofila y moléculas formadas durante la fermentación. La aceptación de los evaluadores por colores claros puede estar asociada a bebidas refrescantes tradicionales. Entre los comentarios, los panelistas relacionaban atributos sensoriales y mencionaban que “se ve y sabe cómo huele”. Este comportamiento es debido a la asociación sabor-color y olor-color que el cerebro relaciona. Un caso conocido es la uva, la cual se asocia a colores morados; así como productos que contienen menta o hierbabuena que se asocian a tonalidades verdes.

Las muestras de tomillo tuvieron los resultados más bajos para la aceptación general durante todos los días de fermentación muestreados, siendo el 4 día, la que obtuvo el menor resultado ( $5.52 \pm 1.89$ ). Mientras la kombucha de zacate limón con 12 y 18 días de fermentación tuvieron la mayor aceptación general (8.12 y 8.79).

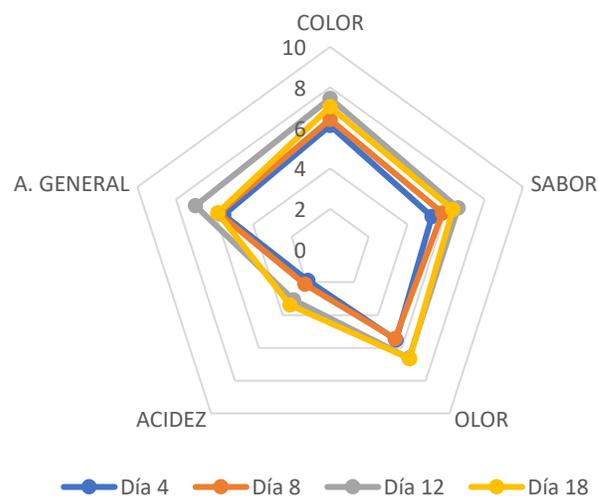
El sabor ácido de la kombucha es atribuido por los ácidos cafeico y compuestos fenólicos (Tran et al. 2020), que pueden provenir del sustrato o que se formen durante el proceso de fermentación. El zacate limón destaca por tener compuestos fenólicos como flavonoides y kampoferoles; además, estos sabores ácidos son característicos del citral contenido en el zacate, por lo que, se percibía una mayor cantidad de acidez en las kombuchas de zacate limón en los días 12 y 18 de fermentación.

Neffe-Skocinska et al. (2017) realizaron un perfil sensorial de una kombucha de té verde mezclado con té negro, encontrando sabores intensos relacionados al té y generación de sabores cítricos debido al ácido acético. Lo cual coincide con los resultados encontrados, ya que los evaluadores indicaron un sabor cítrico en la kombucha de zacate limón. Esta apreciación pudiera deberse a las plantas típicas

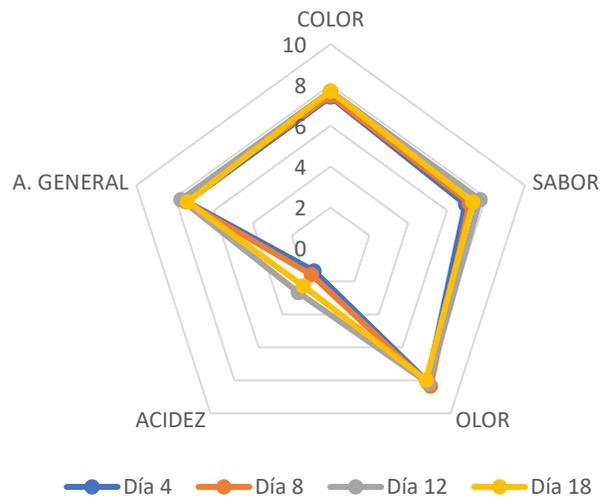
consumidas en México para la elaboración de infusiones, donde podemos encontrar como preferenciales la manzanilla, té negro, té verde y limón.

Mendoça et al. (2023) realizaron una evaluación sensorial de kombucha comercial de té negro y kombucha experimental sabor uva-jamaica con un panel de 100 jueces no entrenados, mixto entre hombres y mujeres sus resultados indicaron que, para los atributos de color, aspecto y aroma, no presentaron diferencias significativas, pero en sabor y aceptación general, los evaluadores prefirieron el sabor uva-jamaica.

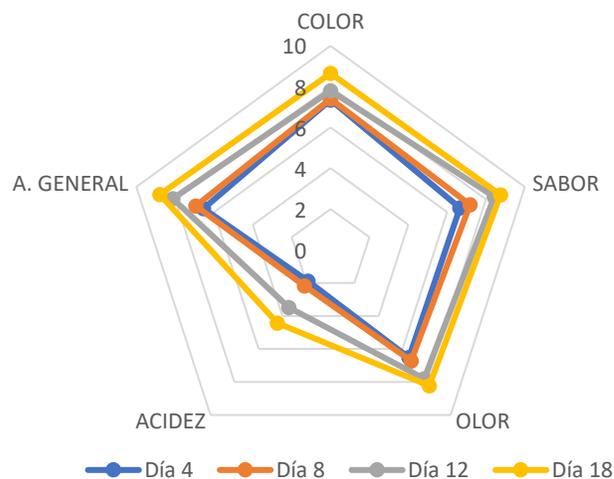
Puede indicarse que la preferencia del evaluador semi-entrenado esta sesgado a sabores conocidos, tales como el sabor limón de la kombucha de zacate limón. Los resultados obtenidos en el presente estudio marcan una pauta sobre las preferencias generales de los sabores de una población promedio para el consumo de kombucha, generando información importante para la selección de la materia prima en vista de una producción a mayor escala.



**Figura 18.** Gráfico de estrella para el grado de aceptación donde: Azul=Día4; Naranja=Día 8; Gris=Día 12 y Amarillo= Día 18 para los 5 atributos de kombuchas de Tomillo.



**Figura 19.** Gráfico de estrella para el grado de aceptación donde: Azul=Día4; Naranja=Día 8; Gris=Día 12 y Amarillo= Día 18 para los 5 atributos de kombuchas de Hierbabuena.



**Figura 20.** Gráfico de estrella para el grado de aceptación donde: Azul=Día4; Naranja=Día 8; Gris=Día 12 y Amarillo= Día 18 para los 5 atributos de kombuchas de Zacate limón.

Un hallazgo importante de la presente investigación es que estadísticamente no hay diferencias ( $P > 0.05$ ) entre los atributos evaluados, al fermentar la kombucha de zacate limón hasta los 18 días, ya que a los 12 días se obtuvieron resultados similares. Lo cual, favorece el proceso de producción y posiblemente abarate los costos operativos.

## CONCLUSIONES

Las interacciones más representativas fueron la cantidad de inóculo y tiempo de fermentación.

En las interacciones de pH y concentración de fenoles se encontraron las menores concentraciones de dextrosa, generando una bebida con baja concentración de azúcares.

El modelo establecido ayudó a obtener un tratamiento optimizado para una mejor capacidad antioxidantes con las siguientes condiciones: 1% de inóculo, 25 grados de temperatura, 4.6 g/L de té y 18 días de incubación.

Las variables de fermentación optimizadas tuvieron comportamientos similares cuando se utilizó en la infusión tomillo y hierbabuena.

La kombucha de tomillo tiene una mayor capacidad antioxidante DPPH, mientras la kombucha de zacate limón tiene mayor contenido de fenoles totales.

Los evaluadores no entrenados no percibieron diferencias entre las kombuchas, pero los semientrenados indicaron sus preferencias por sabores conocidos como el zacate limón y hierbabuena. La mayor aceptación general fue para la kombucha de zacate limón, seguida de la hierbabuena y tomillo.

## RECOMENDACIONES

Para estudios posteriores se recomendaría emplear sustratos alternativos de fermentación para favorecer la aceptabilidad del potencial consumidor, pero manteniendo la funcionalidad de la kombucha.

Se podría optar por el uso combinado de hierbabuena y zacate limón para una kombucha de una sola fermentación.

Se sugiere elaborar kombucha a partir de dos fermentaciones en donde se mejore la aceptabilidad del consumidor y funcionalidad de la bebida.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, R. Hikal, M. Abou-Taleb, K. (2020). Biological, chemical and antioxidant activities of different types Kombucha. *Annals of Agricultural Sciences*.
- Ariel, D. Lescano, J. Arraiza, M. y Beltrán, R. (2019). Yield, chemical composition, and functional properties of essential oils from *Mentha spicata* (Lamiaceae) in Santiago del Estero, Argentina. *UNED Research Journal / Cuadernos de Investigación UNED* 11(3).
- Aung T, Eun JB. (2021) Production and characterization of a novel beverage from laver (*Porphyra dentata*) through fermentation with kombucha consortium. *Food Chem.* 15;350.
- Avcioglu, N. Birben, M. Bilkay, I. (2021). Optimization and physicochemical characterization of enhanced microbial cellulose production with a new Kombucha consortium. *Process Biochemistry* 108 (2021) 60–68.
- Balentine, D. Wiseman, S y Bouwens, L. (1997). The chemistry of tea flavonoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 37(8). pp. 693-704.
- Berdonces, J. (2001). Especies y plantas aromáticas: el más sabroso aliado de la salud en tu cocina. Océano Grupo Editorial. p. 224-227.
- Bishop, P. Pitts, E. Budner, P y Thompson-Witrick, K. (2022). Kombucha: Biochemical and microbiological impacts on the chemical and flavor profile. *Food Chemistry Advances* (1).
- Box, G. and Wilson, K. (1951). *On the experimental attainment of optimum conditions.* *Journal of the Royal Statistical Society.* B 13, 1-45.
- Cápiro, N. Sánchez, L. Fonseca, G. Baluja, L. y Borges, E. (2021). Capacidad protectora de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. Ante el daño genético inducido por estrés oxidativo. *Rev Cubana Invest Biomed* 20 (1) 33-8.
- Cheel J, Theoduloz C, Rodriäguez J, Hirschmann SG. (2005) Free Radical Scavengers and Antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). *J Agric Food Chem*; 53:2511-7.
- Chu, S. y Chen, C. (2006). Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of Kombucha. *Food Chemistry*, 98 (3) (2006), pp. 502-507.

- Crum, H. y LaGlory, A. (2016), The big book of Kombucha: Brewing, flavoring, and enjoying the health benefits of fermented tea. Storey Publishing, North Adams.
- Diario Oficial de la Federación (2012). NMX-F-436-SCFI-2011. INDUSTRIA AZUCARERA Y ALCOHOLERA - Determinación De Grados Brix En Jugos De Especies Vegetales Productoras De Azúcar Y Materiales Azucarados - Método Del Refractómetro (Cancela A La Nmx-F-436-1982).
- Dufresne, C. y Farnworth, E. (2000). Tea, Kombucha, and health: a review, Food Research International, 33(6) 409-421.
- González-Tellez, S. Olivares-Vazquez, D. Espinoza-Raya, Ruíz-Duran, R. y Gómez-Pliego, R. (2018). Bebidas fermentadas nutraceuticas elaboradas a partir del hongo Kombucha y su uso potencial en el tratamiento de Síndrome metabólico. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos. 3. 338-343.
- Hara, Y., Luo, S.-J., Wickremashinghe, R.L. and Yamanishi, T., (1995). VI. Biochemistry of processing black tea, Food Rev Int, 11: 457–471.
- Hur, S. J., Lee, S. Y., Kim, Y. C., Choi, I., & Kim, G. B. (2014). Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. Food Chemistry, 160, 346–356.
- Ivanisova, E. Menhartova, K. Terentjeva, L. Attila, K. Kaxaniova, M. 2020. The evaluation of chemical, antioxidant, antimicrobial and sensory properties of kombucha tea beverage. J. Food Sci Technol. 57(5): 1840-1846.
- Ivory R, Delaney E, Mangan D, McCleary BV. Determination of Ethanol Concentration in Kombucha Beverages: Single-Laboratory Validation of an Enzymatic Method, First Action Method 2019.08. J AOAC International. 21;104(2):422-430.
- Jaume, R. y Janice, A. (2017). Tomillo (*Thymus vulgaris*). Manual práctico de plantas medicinales: El libro más completo sobre las aplicaciones terapéuticas de las plantas medicinales. Robinbook. p.124.
- Jayabalan R, Malbaša RV, Lončar ES, Vitas JS, Sathishkumar M (2014) A review on Kombucha tea—microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. Comp Rev Food Sci Food Safe 13:539–550.

- Kim, J. y Adhikari, K. 2020. Current Trends in Kombucha; Marketing Perspectives and the need for Improved Sensory Research. *Brevages*. 6(15).
- Lagarto, A. Tillán, J. y Cabrera, Y. (1997). Toxicidad aguda oral del extracto fluido de *Mentha spicata* L. (hierbabuena). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2(2), 6-8.
- López-Legarda, X. Taramuel-Gallardo, A. Arboleda-Echavarría, C. Segura-Sánchez, F. Restrepo-Betancur, L. (2017). Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales. *Revista Cubana de Química*. 29(2). 180-198.
- Malbasa, R., Loncar, E., Djuric, M., Klasnja, M., Kolarov, L. J., & Markov, S. (2006). Scale-up of black tea batch fermentation by Kombucha. *Food and Bioprocess Technology*, 84(3), 193–199.
- Martinello, M y Pramparo, M. (2005). Poder Antioxidante de Extractos de Romero Concentrados por destilación Molecular. *Información tecnológica* 16 (5) 17-20.
- May, S. Narayanan, J. Alcock, A. Varsani, C. Maley y A. Aktipis. (2019). Kombucha: a novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem. *PeerJ*, 7.
- Mendonça, G. Pinto, R. Almeida, E. Gonçalves Abreu, V. Pereira Dutra, R. Fernandes Pereira, A. Oliveira Lemos, T. Silva dos Reis, A. y Fernandes Pereira, A. (2023). Kombucha based on unconventional parts of the *Hibiscus sabdariffa* L.: Microbiological, physico-chemical, antioxidant activity, cytotoxicity and sensorial characteristics, *International Journal of Gastronomy and Food Science*. 34.
- Merchán, J. y Tigre, J. (2019). Obtención De Celulosa Bacteriana A Base De Kombucha Por Sustitución De Té Negro Por Té De Cáscara De Café. Universidad de Guayaquil.
- Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31 (3). pp. 426-428.
- Molina-Ramirez, C. Castro, M. Osorio, M. Torres-Taborda, M. Gomez, B. Zuluaga, R. Gomez, C. Ganán, P. Rojas, O. Castro C. (2017). Effect of different carbon sources on bacterial nanocellulose production and structure using the low pH

- resistant strain *Komagataeibacter medellinensis*, *Materials* 10. 639–651.
- Montero-Lagunes, Maribel, Juárez-Lagunes, Francisco I., & García-Galindo, Hugo S. (2009). Suero de leche fermentado con lactobacilos para la alimentación de becerros en el trópico. *Agrociencia*, 43(6), 585-593.
- Neffe-Skocińska, K., Sionek, B., Ścibisz, I., & Kołożyn-Krajewska, D. (2017). Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. *CyTA - Journal of Food*, 15(4), 601–607.
- Nutakor, C. Essiedu, J. Adadi, P. y Kanwugu, O. 2020. Ginger Beer: An Overview of Health Benefits and Recent Developments. *Fermentation* 6(102).
- Pereyra et al. (2006), Investigación sobre un hongo ficticio, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.
- Pérez-Fragero, I. Coronel, A. y Vazquez, G. Producción de bebida fermentada a base de suero de quesería. *Biosaia*, (2). 1.
- Petrovic, S. Loncar, E. Ruzic, N. y Kolarov, L. (1995). Nutritive characteristics of tea fungus metabolites, faculty of Technology, Novi Sad, *Proceedings*, 26(27) 257–269.
- Prado, F. Parada, J. Pandey, A. y Soccol. C. (2008). Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Res Int* 4:111–112.
- Reiss, J. (1994). Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Z Lebensm Unters Forsch.* 198:258-261.
- Reva, O. Zaets, I. Ovcharenko, L. Kukharenko, O. Shpylova, S. Podolich, O. Vera, J. y Kozyrousa, N. (2015). Metabarcoding of the kombucha microbial community grown in different microenvironments. *AMB Express* 5:2–8.
- Singleton V. Orthofer R. Lamuela-Raventos R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299. 152-179.
- Tanticharakunsiri, W. Mangmool, S. Wonsariya, K. Ochaikul, S. (2020). Characteristics and upregulation of antioxidant enzymes of kitchen mint and oolong tea kombucha beverages. *Journal of Food Biochemistry*. 00: e13574. 1-14.
- 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*.
- Ulusoy, A., Tamer, C. (2019). Determination of suitability of black carrot (*Daucus carota* L. spp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) juice concentrate, cherry laurel (*Prunus laurocerasus*), blackthorn (*Prunus spinosa*) and red raspberry (*Rubus idaeus*) for kombucha beverage production. *Food Measure* 13,1524–1536.
- Uțoiu, E., Matei, F., Toma, A., Diguță, C., Ștefan, L., Mănoiu, S., y Vrăjmașu, V. 2018. Bee Collected Pollen with Enhanced Health Benefits, Produced by Fermentation with a Kombucha Consortium. *Nutrients*, 10(10), 1365.
- Vargas-Mora. (2011). *Elaboración De Una Bebida Refrescante Fermentando La Simbiosis Kombucha Con El Objeto De Mejorar La Calidad De Vida De Los Consumidores De Bebidas No Alcohólicas*. Universidad Técnica De Ambato Facultad De Ciencia E Ingeniería En Alimentos. Ambato, Ecuador.
- Vitas, J. Vukmanović, S. Cakarevic, J. Popovic, L. y Malbaša, R. (2019). Kombucha fermentation of six medicinal herbs: Chemical profile and biological activity. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*. 26. 34-34.
- Vohra, B. Fazry, S. Sairi, F. Babul-Airianah. O. (2018). Effects of medium variation and fermentation time on the antioxidant and antimicrobial properties of Kombucha. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences. Special Issue on International Conference on Agriculture, Animal Sciences and Food Technology 2018 (Applied Sciences)* 298-302.
- Watawana, M. I., Jayawardena, N., Gunawardhana, C. B., & Waisundara, V. Y. (2016). Enhancement of the antioxidant and starch hydrolase inhibitory activities of king coconut water (*Cocos nucifera* var. *aurantiaca*) by fermentation with Kombucha “tea fungus”. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(2), 490–498.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Tabla de resultados para los 51 tratamientos resultantes del modelo

DCC

Corrida	pH	Acidez (%)	Sólidos Solubles (°Brix)	Azúcares (g Dextrosa/L)	DPPH (meq Trolox/mL)	ABTS (meq Trolox/mL)	FRAP (µM Trolox/mL)	FENOLES (µg GAE/mL)
1	2.48	0.05	7.00	1920.00	166.00	508.33	304.70	434.44
2	2.42	0.06	9.00	1708.00	168.50	580.00	328.70	430.19
3	2.22	0.40	9.00	3828.00	174.33	479.17	365.70	433.89
4	2.18	0.36	9.00	1820.00	249.33	980.83	263.20	432.04
5	3.08	0.02	9.00	3124.00	328.50	706.67	404.70	434.14
6	2.38	0.06	7.00	1808.00	356.83	713.33	317.70	431.49
7	3.35	0.01	10.00	1968.00	194.33	397.50	246.70	431.84
8	1.90	0.42	15.00	756.00	211.00	561.67	227.70	434.89
9	2.28	0.35	2.00	2020.00	207.67	325.00	271.20	432.64
10	2.54	0.13	8.00	512.00	189.33	370.83	289.20	434.29
11	2.45	0.11	9.00	2432.00	161.83	638.33	368.70	433.59
12	3.16	0.01	6.00	2284.00	400.17	492.50	304.70	433.29
13	3.00	0.07	6.00	2060.00	479.33	866.67	157.70	431.84
14	2.31	0.07	7.00	2540.00	367.67	890.00	265.20	430.79
15	2.86	0.05	9.00	2724.00	157.67	768.33	367.20	431.84
16	3.50	0.00	9.00	732.00	221.00	668.33	342.70	439.14
17	2.08	0.21	10.00	1028.00	158.50	543.33	214.20	437.44
18	2.45	0.22	5.00	1880.00	177.67	360.83	432.70	435.14
19	2.12	0.21	8.00	668.00	230.17	485.83	228.20	434.14
20	2.75	0.04	9.00	2220.00	220.17	280.00	416.70	433.54
21	2.44	0.08	9.00	2852.00	186.83	565.00	314.20	432.94
22	2.52	0.09	9.00	2188.00	159.33	398.33	351.70	430.89
23	2.45	0.22	8.00	548.00	221.83	351.67	436.70	430.44
24	2.21	0.06	5.00	828.00	310.17	596.67	305.20	431.39
25	2.68	0.06	5.00	648.00	161.83	955.00	396.20	430.74
26	3.22	0.06	5.00	1972.00	176.83	465.83	381.20	430.99
27	2.52	0.05	8.00	1012.00	237.67	378.33	401.20	431.19
28	2.43	0.16	6.00	492.00	156.00	616.67	142.20	434.09
29	2.40	0.07	5.00	600.00	157.67	345.83	275.20	437.54
30	2.28	0.18	9.00	768.00	157.67	398.33	167.70	432.74
31	2.47	0.05	7.00	960.00	185.17	675.83	328.20	430.39
32	2.38	0.12	1.00	2740.00	192.67	432.50	92.70	433.64
33	2.41	0.06	3.00	1344.00	328.50	845.00	214.70	438.34
34	1.80	0.42	30.00	2972.00	356.83	945.83	44.70	444.44
35	2.19	0.42	7.00	2788.00	181.83	531.67	362.70	434.64
36	3.18	0.02	10.00	3064.00	162.67	455.00	275.20	435.74
37	2.75	0.05	9.00	1348.00	153.50	727.50	160.70	433.59

38	3.09	0.02	10.00	1880.00	161.83	715.83	114.70	429.69
39	2.73	0.05	9.00	3740.00	161.83	505.00	333.70	433.59
40	2.45	0.09	5.00	3108.00	161.00	605.00	289.70	432.94
41	2.61	0.09	5.00	372.00	161.00	695.83	353.70	435.94
42	2.18	0.38	8.00	824.00	147.67	981.67	57.20	431.79
43	2.60	0.05	8.00	788.00	161.00	464.17	307.70	436.04
44	3.30	0.02	7.00	596.00	329.33	580.00	324.20	443.84
45	2.57	0.38	1.00	1108.00	537.67	410.83	227.70	434.54
46	2.57	0.21	1.00	1076.00	166.00	736.67	295.70	432.24
47	2.46	0.18	6.00	932.00	168.50	420.83	190.20	434.24
48	3.38	0.01	8.00	1420.00	311.00	572.50	326.20	436.04
49	2.18	0.19	13.50	1044.00	286.00	460.00	104.70	434.39
50	3.25	0.01	8.00	1428.00	153.50	710.00	217.70	432.64
51	2.48	0.22	30.00	1276.00	156.83	907.50	103.20	434.84

**Anexo 2.** Hoja de respuestas usada para la prueba sensorial hedónica de panelistas no entrenados, usando una escala grafica para el nivel de agrado de 5 atributos

	<b>UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN</b> <b>FACULTAD DE AGRONOMÍA</b>	
<b>Evaluación Sensorial</b>		
Nombre: _____		Edad: _____
<p>Frente a usted tiene 4 muestras de una bebida fermentada de kombucha. Pruebe cada una de ellas de izquierda a derecha. Coloque el número de muestra que está probando y marque con una X el nivel de agrado para cada atributo mostrado a continuación. Puede utilizar el agua que se proporciona para enjuagar la boca entre cada muestra.</p>		
Número de muestra: _____		
<b>Color</b>		
1  No me gusta nada	2  No me gusta	3  No me gusta ni me disgusta
	4  Me gusta	5  Me gusta mucho
<b>Sabor</b>		
1  No me gusta nada	2  No me gusta	3  No me gusta ni me disgusta
	4  Me gusta	5  Me gusta mucho
<b>Olor</b>		
1  No me gusta nada	2  No me gusta	3  No me gusta ni me disgusta
	4  Me gusta	5  Me gusta mucho
<b>Acidez en boca</b>		
1  No me gusta nada	2  No me gusta	3  No me gusta ni me disgusta
	4  Me gusta	5  Me gusta mucho
<b>Aceptación general</b>		
1  No me gusta nada	2  No me gusta	3  No me gusta ni me disgusta
	4  Me gusta	5  Me gusta mucho

### Anexo 3.

EVALUACIÓN SENSORIAL (KOMBUCHAS)

NOMBRE: \_\_\_\_\_ EDAD: \_\_\_\_\_

INSTRUCCIONES: Frente a usted tiene dos grupos de muestras que corresponden a 3 kombuchas de diferentes sabores con distintos tiempos de fermentación. Usted deberá probar las muestras por grupo, en el orden que desee y deberá marcar en la recta con una "X" que tanto le gusta o le disgusta cada atributo mencionado, Siendo el extremo izquierdo de la recta 0 y el extremo derecho 10 de calificación

<p>#MUESTRA</p> <p>0 _____ Color _____ 10</p> <p>0 _____ Olor _____ 10</p> <p>0 _____ Sabor _____ 10</p> <p>0 _____ Acidez _____ 10</p> <p>0 _____ Aceptacion General _____ 10</p>	<p>#MUESTRA</p> <p>0 _____ Color _____ 10</p> <p>0 _____ Olor _____ 10</p> <p>0 _____ Sabor _____ 10</p> <p>0 _____ Acidez _____ 10</p> <p>0 _____ Aceptacion General _____ 10</p>
<p>#MUESTRA</p> <p>0 _____ Color _____ 10</p> <p>0 _____ Olor _____ 10</p> <p>0 _____ Sabor _____ 10</p> <p>0 _____ Acidez _____ 10</p> <p>0 _____ Aceptacion General _____ 10</p>	<p>#MUESTRA</p> <p>0 _____ Color _____ 10</p> <p>0 _____ Olor _____ 10</p> <p>0 _____ Sabor _____ 10</p> <p>0 _____ Acidez _____ 10</p> <p>0 _____ Aceptacion General _____ 10</p>
<p>#MUESTRA</p> <p>0 _____ Color _____ 10</p> <p>0 _____ Olor _____ 10</p> <p>0 _____ Sabor _____ 10</p> <p>0 _____ Acidez _____ 10</p> <p>0 _____ Aceptacion General _____ 10</p>	<p>#MUESTRA</p> <p>0 _____ Color _____ 10</p> <p>0 _____ Olor _____ 10</p> <p>0 _____ Sabor _____ 10</p> <p>0 _____ Acidez _____ 10</p> <p>0 _____ Aceptacion General _____ 10</p>