

FACULTAD DE INGENIERÍA

Carrera de Ingeniería Agroindustrial

“Nueva bebida análoga a la kombucha hecha de molle,
matico y cedrón: perfiles bioactivo y sensorial”

Tesis para optar el título profesional de:

Ingeniera Agroindustrial

Autor:

Valeria Tamara Diaz Silva

Asesor:

Dr. Ricardo David Vejarano Mantilla

Trujillo - Perú

2020



DEDICATORIA

A Dios, a mis padres, a mi hermana Fiorela, a mis buenos amigos y a los profesores que siempre estuvieron ahí.

AGRADECIMIENTO

Le agradezco a Dios, a mis padres y mis profesores que siempre me apoyaron con sus conocimientos.

Tabla de contenidos

DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTO.....	3
ÍNDICE DE TABLAS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE ECUACIONES	9
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	11
1.1. <i>Generalidades de la kombucha.....</i>	<i>12</i>
1.1.1. <i>Química de la kombucha.....</i>	<i>13</i>
1.1.2. <i>Beneficios de la kombucha sobre la salud.....</i>	<i>15</i>
1.1.3. <i>Análogos a la kombucha</i>	<i>18</i>
1.2. Formulación del problema	21
1.3. Objetivos	21
1.3.1. <i>Objetivo general.....</i>	<i>21</i>
1.3.2. <i>Objetivos específicos.....</i>	<i>21</i>
1.4. Hipótesis.....	21
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA	22
1.5. Tipo de investigación	22
1.5.1. <i>De acuerdo al fin que se persigue: Aplicada.....</i>	<i>22</i>
1.5.2. <i>De acuerdo a la naturaleza de los datos: Cuantitativa</i>	<i>22</i>
1.5.3. <i>De acuerdo al nivel: Explicativa</i>	<i>22</i>
1.5.4. <i>De acuerdo al diseño de investigación: Experimental pura.....</i>	<i>22</i>
1.6. Materiales, instrumentos y métodos.....	22
1.6.1. <i>Materiales consumibles.....</i>	<i>22</i>
1.6.2. <i>Reactivos químicos y medios de cultivo</i>	<i>22</i>
1.6.3. <i>Material de laboratorio</i>	<i>23</i>
1.6.4. <i>Equipos e instrumentos</i>	<i>23</i>
1.6.5. <i>Softwares.....</i>	<i>24</i>
1.7. Técnicas e instrumentos de recolección y análisis de datos.....	24
1.7.1. <i>Tratamiento de las materias primas</i>	<i>24</i>
1.7.2. <i>Diseño de mezclas.....</i>	<i>24</i>
1.7.3. <i>Elaboración de las bebidas fermentadas</i>	<i>25</i>

1.7.4.	<i>Análisis fisicoquímico de las bebidas</i>	25
1.7.5.	<i>Capacidad antioxidante</i>	27
1.7.6.	<i>Capacidad antimicrobiana</i>	28
1.7.7.	<i>Análisis sensorial</i>	29
1.7.7.2.	<i>Selección</i> 30	
	<i>La Prueba 1 consistió en una prueba triangular, mientras que la Prueba 2 fue una prueba dúo-trío (Figura 1). Teniendo en cuenta la Norma ISO 8586:2012, los resultados de las pruebas permitieron seleccionar a 36 jueces, quienes acertaron ambas pruebas, y posteriormente fueron entrenados para valorar las bebidas fermentadas a base de molle, matico y cedrón.</i>	30
1.7.7.3.	<i>Entrenamiento</i>	31
1.7.7.4.	<i>Pruebas de análisis sensorial al panel entrenado</i>	31
1.7.8.	<i>Análisis estadístico</i>	33
CAPÍTULO III. RESULTADOS		34
3.1.	Prueba 1: Selección de las mezclas con mayor contenido fenólico y mejor aceptabilidad sensorial	34
3.2.	Prueba 2	38
3.3.	Prueba 3	39
3.4.	Prueba 4	42
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES		44
4.1.	Discusión	44
4.1.1.	<i>Prueba 1</i>	44
	<i>Producción de ácidos orgánicos</i>	44
	<i>Contenido de fenoles totales</i>	44
	<i>Aceptabilidad sensorial</i>	45
4.1.2.	<i>Prueba 2</i>	46
4.1.3.	<i>Prueba 3</i>	48
4.1.4.	<i>Prueba 4</i>	49
4.2.	Conclusiones	50
REFERENCIAS		51
ANEXOS		67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	16
Tabla 2	24
Tabla 3	26
Tabla 4	27
Tabla 5	29
Tabla 6	33
Tabla 7	42

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Rutas metabólicas implicadas en la elaboración de kombucha. Adaptado de Yavari <i>et al</i> (2010) y Villarreal, Beaufort, Bouajila, Souchard y Taillandier (2018).	14
<i>Figura 2.</i> Consorcio de multimicrobiano de bacterias y levaduras (SCOBY). Imagen adquirida en laboratorio.....	15
<i>Figura 3.</i> Formato para test triangular y test dúo – trío.	31
<i>Figura 4.</i> Evolución del pH de las bebidas fermentadas.....	34
<i>Figura 5.</i> Evolución de azúcares fermentables (°Brix).....	35
<i>Figura 6.</i> Acidez total expresada como ácido acético (g/L).....	35
<i>Figura 7.</i> Contenido de fenoles totales (mg ác. gálico/L).....	36
<i>Figura 8.</i> Resultados del análisis sensorial	36
<i>Figura 9.</i> Resultados del análisis sensorial respecto al aroma de las muestras.....	37
<i>Figura 10.</i> Resultados del análisis sensorial respecto a la acidez de las muestras.....	37
<i>Figura 11.</i> Resultados del análisis sensorial respecto al sabor de las muestras	38
<i>Figura 12.</i> Acidez total expresada como ácido acético (g/L).....	38
<i>Figura 13.</i> Contenido de fenoles totales (mg ác. gálico/L).....	39
<i>Figura 14.</i> Evolución del pH de las bebidas fermentadas.....	39
<i>Figura 15.</i> Evolución de azúcares fermentables (°Brix).....	40
<i>Figura 16.</i> Acidez total expresada como ácido acético (g/L).....	40
<i>Figura 17.</i> Contenido de fenoles totales (mg ác. gálico/L).....	41
<i>Figura 18.</i> Capacidad antioxidante de las mezclas (método ABTS)	41
<i>Figura 19.</i> Capacidad antioxidante de las diferentes mezclas (método DPPH).....	¡Error!
Marcador no definido.	

Figura 20. Placas cultivadas con *Samonella spp.* y *E. coli* para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión..... 42

Figura 21. Contenido de fenoles totales (mg ác. gálico/L) en infusiones sin fermentación43

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1	26
Ecuación 2	27
Ecuación 3	30

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue elaborar una bebida análoga a la *kombucha* a partir de *Buddleja globosa* (matico), *Schinus molle* L. (molle) y *Aloysia citriodora* (cedrón), con el fin de determinar la mezcla óptima de estas hierbas. Se prepararon 10 mezclas de las hierbas, más un control sin hierbas, en medios a base de agua y sacarosa (4 % v/v), trabajando tres repeticiones por mezcla, las cuales fueron inoculadas con un inóculo de SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*), el cual en condiciones aerobias realizó el proceso fermentativo. Periódicamente se evaluó la evolución de la acidez total, y tras la fermentación se determinó el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante. Con las bebidas obtenidas se realizó un análisis sensorial utilizando el método descriptivo aplicando un rango de puntuación de 1 a 5. Se obtuvieron valores de acidez total entre 10.92 y 29.40 g de ácido acético/L, correspondiendo el valor más bajo a la muestra control (sin hierbas), además de identificar las mezclas con mayor contenido de compuestos fenólicos y mayor aceptabilidad sensorial. En base a dichos resultados se ejecutó una nueva prueba con las mezclas seleccionadas, a partir de las cuales se obtuvo como las mejores mezclas, aquellas a base de xxxxx, tanto en el contenido de fenoles totales, capacidad antioxidante y en la evaluación sensorial.

Palabras clave: Kombucha, bebida funcional, antioxidante, molle, matico, cedrón.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

En la actualidad, se ha ido incrementando el interés de los consumidores por productos saludables que puedan ofrecerles diversos beneficios nutricionales y fisiológicos, refiriéndose más precisamente a los alimentos funcionales (Rodríguez-Leyva, 2013; Brown, Caligiurib, Brown y Pierce, 2018). Esto ha resultado en el aumento de la comercialización de dichos productos, llegando a más personas, quienes buscan alternativas saludables que, además de ofrecerles aporte de nutrientes, les ayuden a prevenir diversas enfermedades (Pérez, 2016; Bigliardi y Galati, 2013; Menrad, 2003).

Recientemente se puede observar a más personas dejando de lado el consumo de bebidas con alto contenido de azúcares y preservantes químicos, optando por las denominadas “bebidas saludables” (Derkyia, Acheampong, Mwin, Tetteh, y Aidoo, 2018; Thakur y Sharma, 2017; Shah y Prajapati, 2013). Una de esas bebidas es la kombucha, bebida fermentada originaria de la región de Manchuria, China, cuyo origen se remonta aproximadamente al año 220 a.C., y llevada posteriormente a Rusia y a otros países (Hartmann, Burleson, Holmes y Geist, 2000; Liu, Hsu, Lee y Liao, 1996; Sievers, Lanini, Weber, Schuler-Schmid, y Teuber, 1995). Su aceptabilidad se atribuye a su poder estimulante (debido a los componentes de té) y a sus posibles propiedades desintoxicantes. En la actualidad se sigue la receta estándar, la cual consta de la inoculación de un caldo de té negro azucarado (Dufresne y Farnworth 2000; Hartmann, Burleson, Holmes y Geist, 2000; Liu, Hsu, Lee y Liao, 1996; Sievers, Lanini, Weber, Schuler-Schmid, y Teuber, 1995).

El éxito de la kombucha está relacionado con sus efectos sobre la salud, dado que la evidencia científica le atribuye beneficios en base a sus propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antidiabéticas, antimicrobianas, además de sus beneficios en el tratamiento

de úlceras gástricas, hipercolesterolemia, osteoartritis, regulación del sistema inmune, etc. (Bellassoued *et al.*, 2015; Nguyen, Nguyen, Nguyen, y Le, 2015; Bhattacharya, Gachhui y Sil, 2013; Srihari, Karthikesan, Ashokkumar y Satyanarayana, 2013; Battikh, Bakhrouf y Ammar, 2012; Yavari, Assadi, Moghadam y Larijani, 2011; Jayabalan *et al.*, 2011; Dipti *et al.*, 2003).

1.1. Generalidades de la kombucha

La kombucha es una bebida carbonatada, refrescante y de sabor agridulce (Ismaiel, Bassyouni, Kamel y Gabr, 2015; Jayabalan, Malbaša, Lončar, Vitas, y Sathishkumar, 2014), elaborada a partir de una infusión de té negro, a la cual se le añade sacarosa como fuente de carbohidratos para ser fermentada por un consorcio de levaduras y bacterias denominado SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*) (Jayabalan, Malbaša y Sathishkumar, 2016; Teoh, Heard y Cox, 2004), en cuyo proceso fermentativo, en condiciones aeróbicas, convierte la sacarosa mayoritariamente en ácidos orgánicos y etanol (Ismaiel, Bassyouni, Kamel y Gabr, 2015; Jayabalan, Baskaran, Marimuthu, Swaminathan y Yun, 2010). Dentro del SCOBY se han identificado levaduras como *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces lambicus*, *Brettanomyces custersii* y *Candida estella*, responsables del proceso de la fermentación alcohólica; y por otro lado, bacterias causantes del proceso de acidificación, como *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter xylinoides*, *Bacterium gluconicum*, *Acetobacter aceti* y *Acetobacter pasteurianus*, siendo la más dominante la *A. xylinum*, actualmente reclasificada como *Komagataeibacter xylinus* (Ebrahimi, Ghods, Keyghobadi y Ebrahimi, 2017; Battikh *et al.*, 2012; Mo, Zhu y Chen, 2008; Yamada *et al.*, 2012).

Asimismo, es importante mencionar que la composición microbiana de la kombucha varía según la fuente del inóculo (Jayabalan *et al.*, 2014; Mo *et al.*, 2008).

1.1.1. Química de la kombucha

La elaboración de la kombucha se basa en dos procesos simultáneos, uno de fermentación alcohólica realizado por levaduras, las cuales sintetizan etanol, y otro de acidificación por bacterias, de acuerdo con lo mostrado en la Figura 1.

Entre los compuestos constituyentes de la kombucha se encuentran los ácidos láctico, glucónico, acético, glucorónico, málico, tartárico, oxálico y malónico, etanol, dióxido de carbono, además de otros metabolitos capaces de atrapar radicales libres, como vitaminas solubles (C, B1, B2, B6, B12) y catalasa (Bauer-Petrovska y Petrushevska-Tozi, 2000; Chen y Liu, 2000), los cuales pueden actuar en sinergia con compuestos antioxidantes (Rizner Hraš, Hadolin, Knez y Bauman, 2000).

También se puede encontrar aminoácidos, purinas, enzimas hidrolíticas, proteínas, lípidos, pigmentos, aminos biógenas, polifenoles de té, minerales, sustancias antibióticas, ácido D-sacárico-1,4-lactona (DSL), además de metabolitos propios de bacterias y levaduras (Blanc 1996; Wang, Gan, Tang, Wang y Tan, 2010; Yang *et al.* 2010; Yavari, Mazaheri Assadi, Larijani y Moghadam, 2010; Yavari, Assadi, Moghadam y Larijani, 2011; Velicanski, Cvetkovic y Markov, 2013; Vitas, Malbasa, Grahovac y Loncar, 2013).

Durante el proceso fermentativo, de acuerdo con la Figura 1, la enzima invertasa hidroliza la sacarosa en glucosa y fructosa, produciéndose posteriormente etanol mediante el proceso de la glucólisis por las levaduras. Por otro lado, las bacterias producen ácido glucónico utilizando la glucosa como fuente de carbono, y ácido acético a partir del etanol (Reiss, 1994,

Sievers *et al.*, 1995; Jayabalan *et al.*, 2014), con el consiguiente descenso del pH debido a la formación de ácidos orgánicos (Dufresne y Farnworth, 2000).

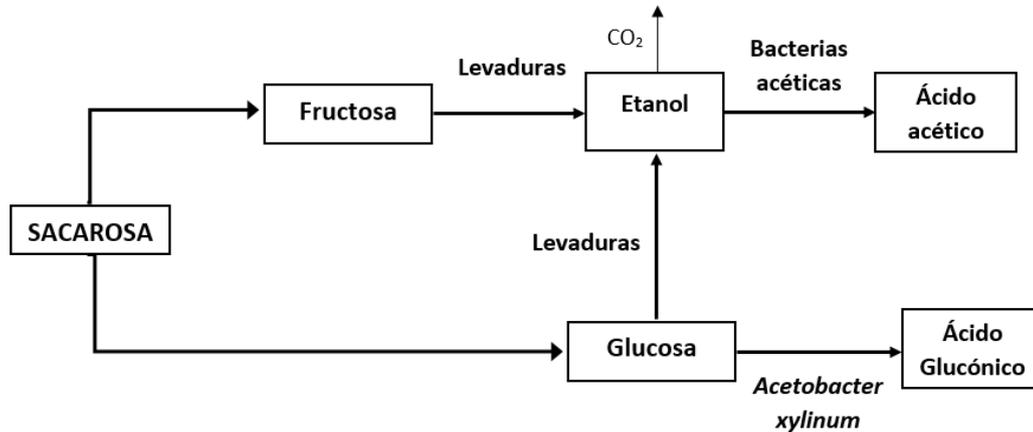


Figura 1. Rutas metabólicas implicadas en la elaboración de kombucha. Adaptado de Yavari *et al* (2010) y Villarreal, Beaufort, Bouajila, Souchard y Taillandier (2018).

En el SCOBY se han identificado en mayor cantidad bacterias de los géneros *Acetobacter*, de naturaleza aerobia, encargadas de convertir el etanol en acetaldehído, y a partir del acetaldehído producir ácido acético, por acción de la enzima *acetaldehído deshidrogenasa* (Jayabalan, Marimuthu y Swaminathan, 2007). Simultáneamente, la bacteria *Acetobacter xylinum* o *Komagataeibacter xylinus* tiene la capacidad de oxidar la glucosa hasta ácido glucónico y uridina difosfo-glucosa (UDPGlc), lo cual deriva en la formación de una película de celulosa en la interfaz aire-líquido (en forma de gel sobre la superficie de la bebida), proceso promovido por la presencia de oxígeno (Figura 2). El oxígeno permite el crecimiento de estas bacterias en condiciones controladas a partir de fuentes de carbono como glucosa, sacarosa, glicerol, e incluso etanol, con la consiguiente producción de celulosa (Villarreal *et al.*, 2018; Sievers *et al.*, 1995).



Figura 2. Consorcio de multimicrobiano de bacterias y levaduras (SCOBY). Imagen adquirida en laboratorio.

La interacción entre los géneros de levadura *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* (fermentación mixta) confiere a la bebida un complejo perfil aromático y sabores deseados (Sun, Gong, Jiang, & Zhao, 2014; Villarreal *et al.*, 2018).

1.1.2. Beneficios de la kombucha sobre la salud

Las propiedades de la kombucha están relacionadas con su compleja composición química, al contener metabolitos como ácidos orgánicos, antibióticos, compuestos fenólicos, vitaminas, aminoácidos, microelementos, entre otros (Jayabalan *et al.*, 2014; Marsh, O'Sullivan, Hill, Ross y Cotter, 2014). Entre algunos beneficios atribuidos a esta bebida, destaca su capacidad para regular el sistema inmune y los niveles de glucosa en la sangre (Dipti *et al.*, 2003).

La kombucha contiene además ácido láctico, relacionado con un buen funcionamiento del sistema digestivo, reducción de la secreción ácida, circulación sanguínea y regulación ácido-base a nivel celular (Malbasa, Loncar y Kolarov, 2002). Otro ácido presente en la kombucha es el glucónico, el cual, junto a determinados xenobióticos y compuestos fenólicos, contribuyen a mejorar la excreción de sustancias perjudiciales por los riñones, además de

ayudar al tratamiento de la osteoartritis (Jayabalan *et al.*, 2014; Nguyen, Nguyen, Nguyen, y Le, 2015; Yavari *et al.*, 2011).

1.1.2.1. Actividad antimicrobiana

Diferentes investigaciones han reportado el efecto antimicrobiano de la kombucha frente a diferentes especies de bacterias y levaduras (Tabla 1). Asimismo, sea relacionado un mayor periodo de fermentación con un mayor contenido de compuestos antimicrobianos, además de un mayor contenido de ácidos orgánicos, y por tanto, un menor pH, y por ende un mayor efecto inhibitorio, actuando todos estos factores de forma sinérgica (Battikh, Bakhrouf y Ammar, 2012; Sreeramulu, Zhu y Knol, 2001).

Tabla 1

Acción antimicrobiana de la kombucha contra diferentes tipos de bacterias y levaduras

Acción antimicrobiana contra diferentes tipos de bacterias y levaduras		
Gram positivas	Gram negativas	Levaduras
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Candida sake</i>
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida dubliniensis</i>
	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Candida albicans</i>
	<i>Campylobacter jejuni</i>	
	<i>Salmonella enteritidis</i>	
	<i>Salmonella typhimurium</i>	
	<i>Helicobacter pylori</i>	

Adaptado de Sreeramulu, Zhu y Knol (2000, 2001) y Greenwalt, Ledford y Steinkraus (1998).

Por su parte Battikh *et al.* (2012), evaluaron la actividad antimicrobiana de bebidas fermentadas análogas a la kombucha, a base de infusiones de tomillo (*Thymus vulgaris L.*),

hierba luisa (*Lippia citriodora*), romero (*Rosmarinus officinalis*), hinojo (*Foeniculum vulgare*) y menta piperita (*Mentha piperita*), obteniendo con la bebida fermentada a base de hierba luisa, una mayor actividad antimicrobiana frente a siete cepas bacterianas.

1.1.2.2. Actividad antidiabética

Srihari, Karthikesan, Ashokkumar y Satyanarayana (2013), evaluaron el efecto de la kombucha en roedores a los cuales se les indujo artificialmente diabetes mellitus. Al tratarlos con kombucha, a dosis de 6 mg por Kg de peso corporal por día, logrando revertir el daño causado, además de estimular una mayor secreción de insulina por parte de las células beta en el páncreas. Los investigadores sugirieron que estos beneficios estarían relacionados con la presencia de teaflavinas y tearubiginas, polifenoles del té presentes en la kombucha.

1.1.2.3. Actividad antioxidante

La kombucha también ha mostrado actividad antioxidante, por ejemplo, frente al estrés oxidativo en hepatocitos murinos, lo cual muestra su potencial frente a enfermedades hepáticas (Bhattacharya, Gachhui y Sil, 2011). Dado el origen de la bebida, elaborada a base de té, la actividad antioxidante está relacionada principalmente con los compuestos fenólicos, especialmente catequinas (Graham, 1992; Mukhtar y Ahmad, 2000).

Banerjee *et al.* (2010) observaron que la bebida kombucha KT4 (15 mg por Kg de peso corporal) tuvo un efecto positivo en la curación de úlceras, protegiendo a la mucosa gástrica, de manera similar al omeprazol (3 mg por Kg de peso corporal). El efecto fue atribuido a algunos ácidos orgánicos y a los compuestos fenólicos. Además, de mencionar que las infecciones producidas por bacterias, causantes de inflamación, podrían controlarse gracias al pH bajo de la bebida.

Por otro lado, Bhattacharya, Gachhui y Sil (2013) se compararon el efecto producido por la kombucha y el té negro no fermentado en ratas diabéticas tratadas con ALX (Alloxan, medicamento simulador de síntomas de diabetes), Las cuales presentaron pérdida de peso (28.12%), reducción de la insulina en plasma (61.34%) y aumento de la glucosa en sangre. Se observó que la dosificación de kombucha, a dosis de 150 mg de producto liofilizado por kilogramo por peso corporal durante 14 días, redujo los daños producidos por la ALX de forma más eficiente que el té negro no fermentado, lo cual estará relacionado con la presencia de moléculas antioxidantes producidas durante la fermentación. Además, de los posibles beneficios para el tejido pancreático de los roedores, entre otros mecanismos mediante la activación de la caspasa-3, enzima que permite regular la muerte celular programada.

Vitas, Cvetanović, Mašković, Švarc-Gajić y Malbaša (2018), elaboraron una bebida análoga a la kombucha a base de milenrama (*Achillea millefolium*), obteniendo resultados favorecedores en cuanto al poder antioxidante de la hierba, si bien no se observó un efecto antimicrobiano.

1.1.3. Análogos a la kombucha

1.1.3.1. Base tradicional de la kombucha: el té negro

Originalmente la kombucha se ha elaborado a base de infusiones de té negro, el cual le confiere actividad antioxidante (Banerjee *et al.*, 2010), debido a su contenido de compuestos fenólicos, principalmente catequinas (Graham, 1992; Mukhtar y Ahmad, 2000; Kim, Goodner, Park, Choi y Talcott, 2011; Naveeda *et al.*, 2018), entre otros, como lípidos, proteínas, β -caroteno, compuestos volátiles, etc. (Zhu, Sakulnaka y Wang, 2016; Naveeda *et al.*, 2018), los cuales le confieren beneficios sobre la salud como cardioprotectores,

reductores del colesterol, antioxidantes, antimicrobianos, antiinflamatorios y antihistamínicos.

Koch, Kukula-Koch y Komsta (2018) analizaron muestras de extractos de té negro de diferentes orígenes (Kenia, China, Japón, India, Irán, entre otros), observando una relación entre la capacidad para eliminar radicales libres y la presencia de compuestos fenólicos. Por su parte, Diker y Hascelik (1994) observaron actividad antimicrobiana del extracto de té negro frente a *Helicobacter pylori*, responsable de la ulceración gástrica, duodenal y péptica.

1.1.3.2. Hierbas como alternativas al té negro

Si bien la kombucha tradicionalmente se elabora a base de infusiones de té negro, en las secciones anteriores se ha evidenciado estudios en los cuales se ha elaborado bebidas análogas a la kombucha a base de infusiones de otras hierbas.

Muchas de esas hierbas son producidas en Perú, específicamente en la región La Libertad, no aprovechadas a nivel industrial, sino que su utilización se restringe a consumos locales en forma de infusiones, o para el tratamiento de enfermedades a través de la medicina tradicional. Tal es el caso de algunas hierbas mencionadas en las secciones previas, así como otras cuya aplicación en la elaboración de kombucha no ha sido aún reportada, por ejemplo, matico (*Buddleja globosa*), cedrón (*Aloysia citriodora*), molle (*Schinus molle* L.), etc.

Cedrón (*Aloysia citriodora*)

El cedrón es una hierba aromática que ha mostrado efecto antiespasmódico, antioxidante, antimicrobiano, expectorante, además de ser considerado como un calmante nervioso y estomacal, teniendo entre sus principales componentes compuestos fenólicos (Ragone,

Conforti, Volonté y Consolini, 2007; Alonso y Desmarchelier, 2005; Severin, Bruzzese, Di Sapio, Giubileo y Gattuso, 2005; Bilia, Giomi, Innocenti, Gallori, y Vincieri, 2008).

Se ha reportado para el cedrón un efecto inhibitorio moderado frente a *E. coli* y *S. typhimurium*, y alto frente a *B. cereus*, si bien dicho efecto es menor al mostrado por otras hierbas (Vieitez, Maceiras, Jachmanian y Albores, 2017).

Matico (*Buddleja globosa*)

El matico ha mostrado actividad antiinflamatoria, poder analgésico, anticonceptivo y antioxidante, además de prevenir enfermedades cardiovasculares. Entre sus componentes destacan triterpenos, diterpenos y compuestos fenólicos (Backhouse *et al.*, 2008; Fuentes, Sepulveda, Alarcon, Palomo y Fuentes, 2017).

Se ha reportado en el matico la presencia de flavonoides como luteolina, luteolina-7-glucósido, linarina y derivados del ácido cafeico, además de feniletanoides, esteroides, fenoles grasos, ésteres y terpenos (Fuentes *et al.*, 2017). Dichos compuestos además pueden actuar sinérgicamente como antibacterianos (Letelier y Ossandon, 2014).

Molle (*Schinus molle*)

El molle es un arbusto autóctono de Perú, al cual se le atribuyen actividades biológicas como antibacteriano, antioxidante, antifúngico, antiinflamatorio, e incluso insecticida (Taylor, 2005; Atti *et al.*, 2013; Abdel-Sattar, Zaitoun, Farag, El-Gayed y Harraz, 2010; Hosni *et al.*, 2011; Martins, Arantes, Candeias, Tinoco y Cruz, 2014). Ferrero, Werdin y Sánchez (2006) reportaron que el molle contiene taninos y otros flavonoides, alcaloides, saponinas esteroidales, esteroides, terpenos, entre otros. Otros estudios han reportado su capacidad antioxidante (Scalbert, Manach, Morand y Rémésy, 2005; Pintore *et al.*, 2009; Wei y

Shibamoto, 2010), efecto atribuido a compuestos monoterpenos como α -pineno, β -pineno, limoneno, β -mirceno, sabineno, terpinoleno y α - y β -felandreno (Ruberto y Baratta, 2000; Martins et al. 2014).

1.2. Formulación del problema

¿Es posible elaborar una bebida funcional análoga a la kombucha a partir de matico (*Buddleja globosa*), molle (*Schinus molle*) y cedrón (*Aloysia citriodora*)?

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Elaborar una bebida funcional análoga a la kombucha a partir de matico (*Buddleja globosa*), molle (*Schinus molle*) y cedrón (*Aloysia citriodora*).

1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar la mezcla óptima de matico, molle y cedrón que permita obtener una bebida análoga a la kombucha con la mayor capacidad antioxidante.
- Determinar la mezcla óptima de matico, molle y cedrón que permita obtener una bebida análoga a la kombucha con la mayor actividad antimicrobiana.
- Determinar la mezcla óptima de matico, molle y cedrón que permita obtener una bebida análoga a la kombucha con la mayor aceptabilidad sensorial.

1.4. Hipótesis

Sí es posible elaborar una bebida funcional análoga a la kombucha a partir de matico (*Buddleja globosa*), molle (*Schinus molle*) y cedrón (*Aloysia citriodora*).

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA

1.5. Tipo de investigación

- 1.5.1. De acuerdo al fin que se persigue: Aplicada
- 1.5.2. De acuerdo a la naturaleza de los datos: Cuantitativa
- 1.5.3. De acuerdo al nivel: Explicativa
- 1.5.4. De acuerdo al diseño de investigación: Experimental pura

1.6. Materiales, instrumentos y métodos

1.6.1. Materiales consumibles

- Agua
- Molle
- Matico
- Cedrón
- Sacarosa
- Consorcio multimicrobiano para kombucha (SCOBY)

1.6.2. Reactivos químicos y medios de cultivo

- Hidróxido de sodio
- Fenolftaleína
- Reactivo Folin – Ciocalteu
- Carbonato de sodio
- Etanol
- Ácido gálico
- Reactivo DPPH

- Reactivo ABTS
- Persulfato de potasio
- Ácido ascórbico
- Caldo Salmonella-Shigella (SS)
- Agar Mueller Hinton

1.6.3. Material de laboratorio

- Frascos de vidrio de un 1 litro (fermentadores)
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- Tubos tipo falcon de 15 mL
- Matraz Erlenmeyer ámbar de 250 mL
- Cubetas para espectrofotómetro de 1 cm de paso de luz
- Placas Petri
- Asa bacteriológica

1.6.4. Equipos e instrumentos

- Centrífuga (FUNKE GERBER Nova-Safety, Alemania)
- Baño maría (MEMMERT WNB14, Alemania)
- pH metro (HANNA pHep®5 HI 98128, Estados Unidos)
- Equipo de titulación (ISOLAB, Alemania)
- Espectrofotómetro UV-Vis Vernier SVIS-PLUS (Vernier Software & Technology, Estados Unidos)
- Estufa de convección forzada (MaquiProcesos, HD08-07MP, Perú)
- Balanza analítica (OHAUS PA224C, Estados Unidos)
- Agitador magnético (ISOLAB 613.01.001, Alemania)
- Autoclave (Nacional, FV-3035, Perú)

- Utensilios varios

1.6.5. Softwares

- Statistica software version 7.0 (Statsoft, Oklahoma, USA)
- Statgraphics v.5 (Graphics Software Systems, Rockville, Estados Unidos)
- Microsoft Office

1.7. Técnicas e instrumentos de recolección y análisis de datos

1.7.1. Tratamiento de las materias primas

Las muestras de matico y cedrón fueron obtenidas del Mercado Mayorista de la ciudad de Trujillo, La Libertad, mientras que las hojas de molle se obtuvieron del centro poblado de Casmiche, provincia de Otuzco, La Libertad. Todas las hojas fueron obtenidas secas, realizándose una inspección visual para la selección de las mismas en base a su estado sanitario (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2003).

1.7.2. Diseño de mezclas

Se usó el programa Statistica versión 7.0. Se aplicó un Diseño de Mezclas Simplex-Centroide (Ortega, Bustamante, Gutiérrez y Correa, 2014), con el objetivo de encontrar la mezcla a base de molle, matico y cedrón (Tabla 2) con mejor capacidad antioxidante, actividad antimicrobiana y aceptación sensorial, a partir del análisis de los datos obtenidos. Se consideraron significativos los valores de $p < 0.05$ y con el mayor coeficiente de determinación (R^2) (Watawana, Jayawardena, Choo y Waisundara, 2016).

Tabla 2

Diseño Simplex-Centroide para las formulaciones a base de molle, matico y cedrón

Mezclas	Gramos
---------	--------

	Molle	Matico	Cedrón
C	0.00	0.00	0.00
1	5.00	0.00	0.00
2	0.00	5.00	0.00
3	0.00	0.00	5.00
4	2.50	2.50	0.00
5	2.50	0.00	2.50
6	0.00	2.50	2.50
7	3.33	0.83	0.83
8	0.83	3.33	0.83
9	0.83	0.83	3.33
10	1.67	1.67	1.67

1.7.3. Elaboración de las bebidas fermentadas

Se añadieron 5 gramos de cada mezcla de hierbas secas (100% de la mezcla) en 500 mL de agua a 80 °C previamente mezclada con sacarosa en frascos de vidrio previamente desinfectados con bisulfito de sodio al 5% (p/v), procediendo a tapar los frascos y dejando infundir la mezcla de hierbas hasta que la mezcla total alcance la temperatura ambiente.

La infusión fría se inoculó con el SCOBY a razón de 3% (p/v), tras lo cual se procedió a realizar la fermentación a una temperatura de 24±3 °C, durante 12 días en oscuridad (Jayabalan *et al.*, 2010).

1.7.4. Análisis fisicoquímico de las bebidas

1.7.4.1. Acidez total

Se determinó la acidez total de las bebidas, expresada como ácido acético (g/L), a medida que transcurrió el proceso fermentativo, mediante la siguiente metodología (Olivero, 2006):

Se tomó una alícuota de 5 mL de la muestra para llevarla a un matraz de 250 mL, disolviéndola con agua destilada hasta 10 veces su volumen, para proceder a titular con una

solución de NaOH 0.1 N, utilizando como indicador fenolftaleína. La fórmula utilizada para expresar la acidez total (g/L) como ácido acético es la siguiente:

$$\text{Acidez total (g/L ácido acético)} = \frac{G \times N \times \text{Eq.Ác.}}{\text{Muestra}} \times 100 \times 10 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

G = Volumen del gasto del NaOH (L)

N = Normalidad del NaOH

Eq. Ác. = Ácido equivalente de ácido acético (0.06)

1.7.4.2. Fenoles totales

Para la cuantificación de los fenoles totales se utilizó el método de Folin-Ciocalteu, el cual se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar ante agentes oxidantes, en base al procedimiento desarrollado por Gutiérrez (2000).

Tabla 3

Sistema de para determinar el contenido de fenoles totales

Reactivos	Cantidad
Muestra	30 µL
Agua destilada	1170 µL
Reactivo de Folin-Ciocalteu	75 µL
Solución de carbonato de sodio 20 %	225 µL

Luego se agitó, y se mantuvo en oscuridad por un periodo de 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se determinó la absorbancia de las muestras mediante espectrofotometría

UV-Vis a 765 nm de longitud de onda, tomando como referencia las absorbancias obtenidas a partir de patrones de ácido gálico entre 10 y 300 mg/L.

1.7.5. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante (CA) fue determinada en base al ensayo ABTS (Floegel, Kim, Chung, Koo y Chun, 2011). Se preparó el reactivo ABTS activo, mezclando con persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) 2.45 mM, mezclando ambos reactivos, y dejando reaccionar en oscuridad por un periodo de 12 a 16 horas a temperatura ambiente.

Para evaluar la capacidad antioxidante, se utilizaron cubetas de 1 cm de paso, en las cuales se colocaron las cantidades de reactivos indicadas en la Tabla 4:

Tabla 4

Sistema de para determinar la capacidad antioxidante según el método ABTS

Reactivos	Cantidad
Bebida fermentada	20 μ L
Agua destilada	710 μ L
Solución de ABTS activo	270 μ L

Se agitó y se mantuvo en oscuridad por un periodo de 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se aplicó la fórmula de Molyneux (2004) para determinar la capacidad de los compuestos fenólicos para neutralizar/inhibir al agente ABTS, expresada como el valor de eficiencia antioxidante (Q%) de cada extracto:

$$Q \% = 1 - \frac{Abs_{muestra}}{Abs_{ABTS}} * 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

- Ab_{muestra} : Absorbancia de la muestra.
- Ab_{ABTS} : Absorbancia de la solución de ABTS.

1.7.6. Capacidad antimicrobiana

La densidad del inóculo de bacterias se estandarizó por medio de una suspensión de sal de bario, agregando 0.5 mL de una solución de cloruro de bario 0.048 M a 99.5 mL de ácido sulfúrico 0.18 M, homogenizando con el fin de no perder la suspensión. Se utilizó el espectrofotómetro UV-Vis a 625 nm para verificar la densidad dentro de los valores aceptables. A un estándar de McFarland 0.5 le corresponde 0.08-0.10 de absorbancia.

Se preparó el medio Mueller Hinton de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Merck, Alemania), esterilizando en autoclave, y luego enfriando hasta alcanzar 45 °C, procediendo a distribuir en placas Petri a un grosor de 4 mm.

1.7.6.1. Inoculación

Mediante un asa bacteriológica se tomaron las colonias de bacterias y se inocularon en caldo SS, dejando a 35 °C hasta observar una ligera turbidez, ajustada por medio del caldo SS, comparando visualmente con la estándar Mc Farland 0.5.

Se introdujo el hisopo estéril en el inóculo bacteriano preparado en el paso anterior hasta cubrirlo totalmente. Se escurrió el hisopo dentro de las paredes del tubo, para luego sembrar en la placa con agar Mueller Hinton, deslizando el hisopo de forma paralela y uniforme por toda la superficie del agar, girando la placa en ángulos similares hasta distribuir la muestra de inóculo uniformemente.

Antes de introducir los discos control (antibiótico: ampicilina) en la placa, se dejó evaporar el líquido de la superficie por un periodo de 3 a 5 minutos. Estos discos fueron introducidos en el agar con la ayuda de una pinza estéril, haciendo una pequeña presión sobre los discos, con la finalidad de que se quedaran adheridos. Además, se colocaron los discos previamente sumergidos en cada una de las bebidas elaboradas a base de molle, matico y cedrón y fermentadas con el SCOBY. En total por cada placa se colocaron tres discos de cada mezcla más un disco de antibiótico como control.

Se procedió a incubar las placas en posición invertida a 35 °C durante 24 horas.

1.7.6.2. Lectura de placas

Se inspeccionaron las placas a fin de verificar la presencia de halos de inhibición. En caso de observar la formación de estos halos se miden los diámetros de los mismos, clasificando la sensibilidad de bacteria como sensible (S), intermedio (I) o resistente (R), en base a la Tabla 5:

Tabla 5
Categorización de la sensibilidad de la bacteria

Categorías	Diámetro de halo de inhibición (mm)
S	$DHI > D$
R	$DHI < d$
I	$d < DHI < D$

Adaptado de la Norma Técnica N° 30 (INS, 2002).

Donde:

D = Es el diámetro mayor generado por el antibiótico

d = Es el diámetro menor generado por el antibiótico

1.7.7. Análisis sensorial

El análisis sensorial se realizó con un panel de jueces entrenados, considerando las etapas de reclutamiento, selección y entrenamiento de jueces de acuerdo con la Norma ISO 8586:2012.

1.7.7.1. Reclutamiento

Se llevó a cabo el reclutamiento de 73 panelistas de la Universidad Privada del Norte, entre estudiantes, docentes y personal administrativo (universo aproximado de 13000 personas). Este valor fue calculado a partir de la fórmula para cálculo de muestra para una población finita (Aguilar, 2005).

$$n = \frac{N * Z^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z^2 * p * q} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

N = Total de la población

Z = 1.96 (usando una seguridad del 95%)

p = proporción esperada (5% en este caso = 0.05)

q = 1-p (0.95)

n = tamaño de muestra = 73

1.7.7.2. Selección

Se tuvo en cuenta competencias genéricas y específicas necesarias para realizar las diferentes pruebas, condiciones de infraestructura, implementos y la preparación-presentación correcta de las muestras. En este análisis se pretendió observar la sensibilidad de los jueces para percibir sabores diferentes.

La Prueba 1 consistió en una prueba triangular, mientras que la Prueba 2 fue una prueba dúo-trío (Figura 1). Teniendo en cuenta la Norma ISO 8586:2012, los resultados de las pruebas

permitieron seleccionar a 36 jueces, quienes acertaron ambas pruebas, y posteriormente fueron entrenados para valorar las bebidas fermentadas a base de molle, matico y cedrón.

1.7.7.3. Entrenamiento

En esta etapa se buscó desarrollar la capacidad para detectar, reconocer y describir los estímulos sensoriales del panel de jueces (ISO 8586:2012). Se procedió a realizar una serie de pruebas con el objetivo de estandarizar los criterios de evaluación por parte del panel.

Nombre:			
Edad:			
Ocupación:			
Prueba 1:			
¿Cuál es la muestra diferente?			
293	310	308	
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Prueba 2:			
¿Cuál de estas muestras es igual a la testigo?			
Testigo	A	B	
<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Descripción:			

Figura 3. Formato para test triangular y test dúo – trío.

1.7.7.4. Pruebas de análisis sensorial al panel entrenado

Las pruebas de análisis sensorial fueron realizadas con un panel de 36 jueces entrenados, entre estudiantes, personal administrativo y docentes universitarios con edades entre 18-60 años. La distribución de las muestras y la codificación de las muestras se realizaron al azar. Los jueces llenaron sus respuestas en el respectivo formato (Anexos 1, 2, 3, 4 y 5).

A. Prueba 1

En la primera prueba se evaluaron los parámetros: aceptabilidad aromática, acidez, amargor y aceptabilidad global, mediante una escala estructurada de 10 cm de longitud anclada con los términos de intensidad en los extremos, por ejemplo, "bajo" a la izquierda y "alto" a la derecha, y en el caso de la aceptabilidad global y aromática, “me disgusta” a la izquierda y “me encanta” a la derecha:

1. En el caso de la acidez, primero se hizo probar a los jueces una muestra de agua a la izquierda (sin acidez) y luego una muestra de agua con ácido cítrico a la derecha (acidez alta), con el fin de establecer una diferencia marcada entre sensaciones.
2. De la misma manera se realizó la evaluación del amargor, utilizando agua a la izquierda (sin amargor) y agua con café a la derecha (amargor alto).
3. En el caso de la aceptabilidad global y aromática, solo se les hizo evaluar las muestras en cuestión, teniendo como resultados, qué tanto les agradaron las bebidas y qué tan intensos percibieron los aromas de estas.

B. Prueba 2

En la segunda prueba se evaluaron las bebidas fermentadas en base al aroma de las tres infusiones de molle, cedrón y matico, cada una al 100% (pura), con el fin de que los jueces puedan distinguir cuanto de cada hierba hay en cada muestra analizada.

Para ello, antes de que evalúen las muestras, los jueces olieron unos frascos con la infusión de cada hierba. Luego, evaluaron las muestras registrando su valoración en la respectiva ficha, marcando sobre una línea de 10 cm, donde el extremo izquierdo indicaba un nivel bajo de la infusión en la muestra, y el extremo derecho, un nivel alto de la infusión en la muestra.

1.7.8. Análisis estadístico

Se usó el software Statistica 7.0 para evaluar los resultados obtenidos (Tabla 1). Se realizó un procedimiento de modelamiento matemático, aplicando un análisis de varianza (ANOVA), procediendo a validar el modelo obtenido por medio de su respectivo R^2 y valor p , con un nivel de significancia 5%, llegando a tener una referencia por el modelo con un mayor R^2 y con un p menor a 0.05. Posteriormente, se realizó un análisis de superficie de respuesta, el cual permitió elegir la mezcla óptima (Tabla 7).

Tabla 6
Caracterización de las mezclas

Muestra	Componente			Capacidad antioxidante (%)
	Molle (g)	Matico (g)	Cedrón (g)	
C	0.00	0.00	0.00	CAC
M1	5.00	0.00	0.00	CA1
M2	0.00	5.00	0.00	CA2
M3	0.00	0.00	5.00	CA3
M4	2.50	2.50	0.00	CA4
M5	2.50	0.00	2.50	CA5
M6	0.00	2.50	2.50	CA6
M7	3.33	0.83	0.83	CA7
M8	0.83	3.33	0.83	CA8
M9	0.83	0.83	3.33	CA9
M10	1.67	1.67	1.67	CA10

CAPÍTULO III. RESULTADOS

3.1. Prueba 1: Selección de las mezclas con mayor contenido fenólico y mejor aceptabilidad sensorial

Las figuras 4 a 7 muestran los resultados de los análisis fisicoquímicos (evolución del pH, °Brix y contenido de fenoles totales), así como de los análisis del contenido fenólico y actividad sensorial, en base a las cuales se seleccionaron las mejores mezclas para los análisis posteriores. Las formulaciones a base de molle, matico y cedrón utilizadas para la preparación de las bebidas se muestran en la Tabla 2.

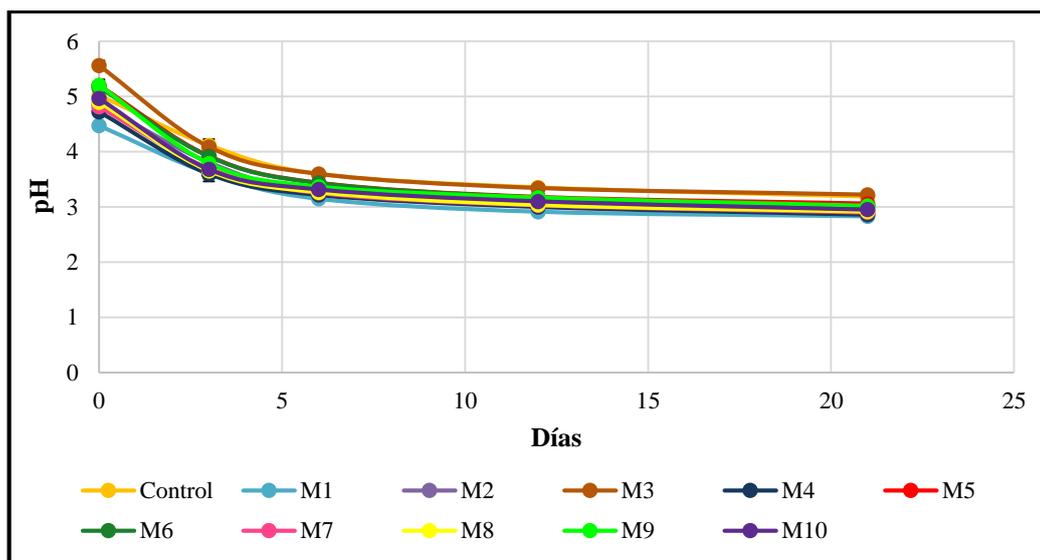


Figura 4. Evolución del pH de las bebidas fermentadas

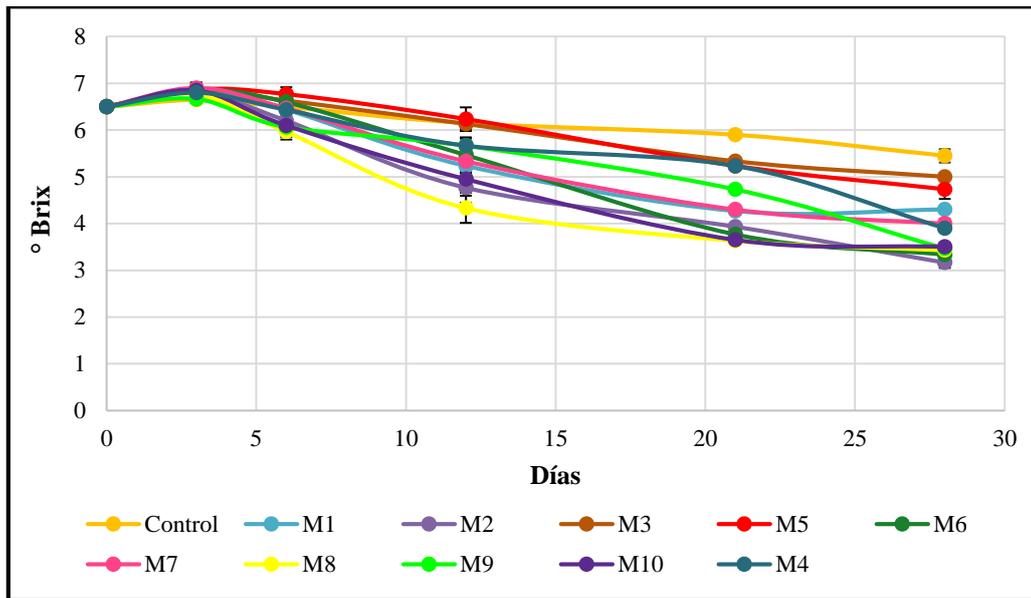


Figura 5. Evolución de azúcares fermentables (°Brix)

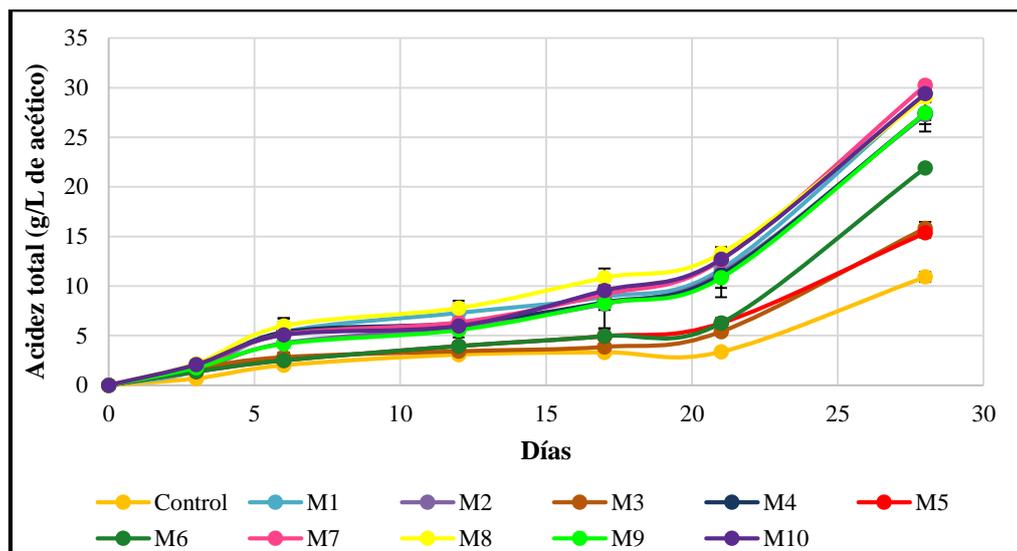


Figura 6. Acidez total expresada como ácido acético (g/L)

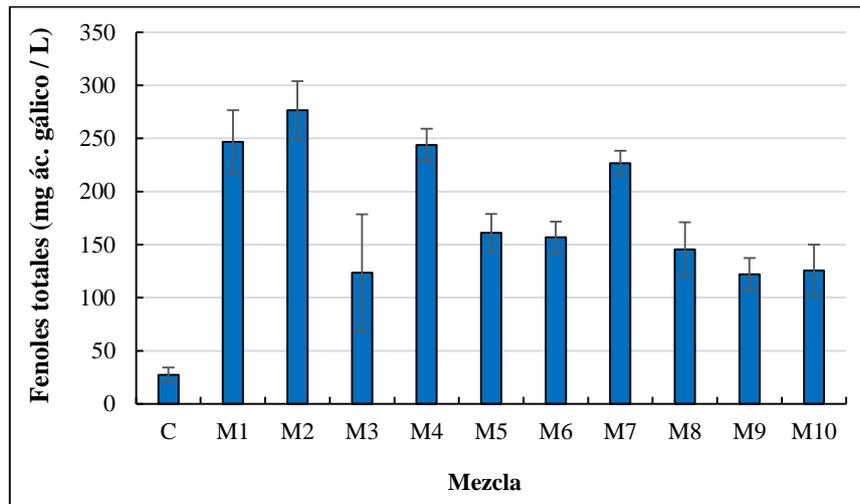


Figura 7. Contenido de fenoles totales (mg ác. gálico/L)

En las figuras 8 a 11 se muestran los resultados del análisis sensorial realizado con el fin de seleccionar las mezclas con mayor aceptabilidad sensorial.

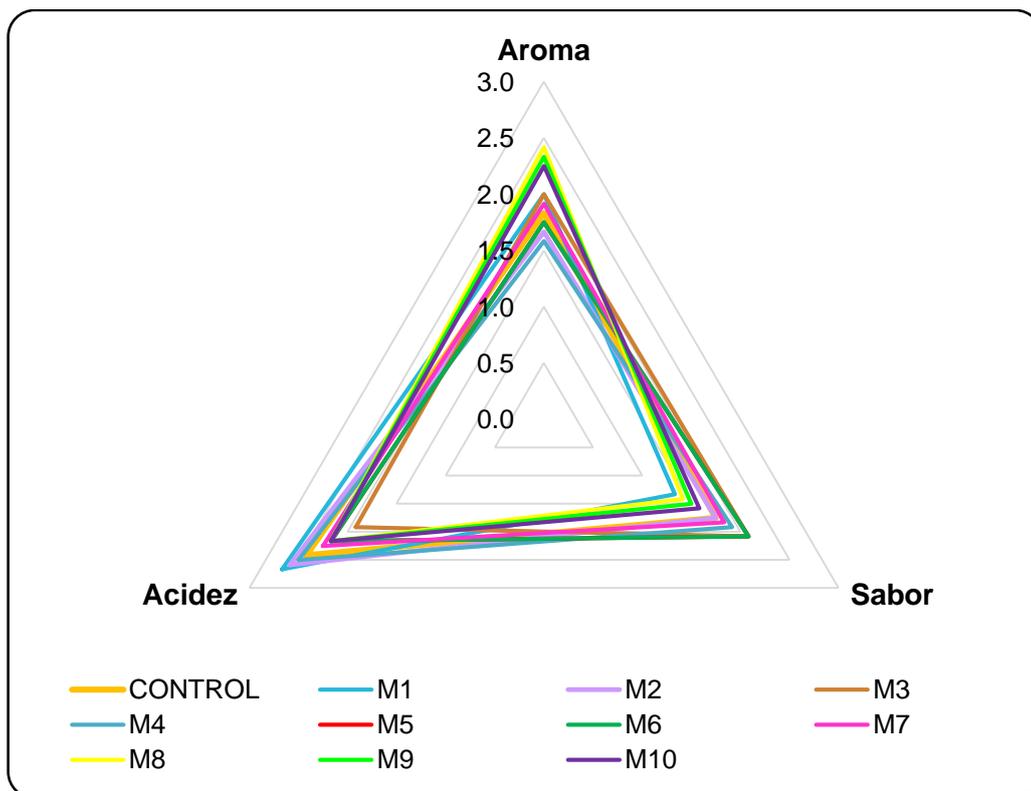


Figura 8. Resultados del análisis sensorial (aplicando prueba de Friedman)

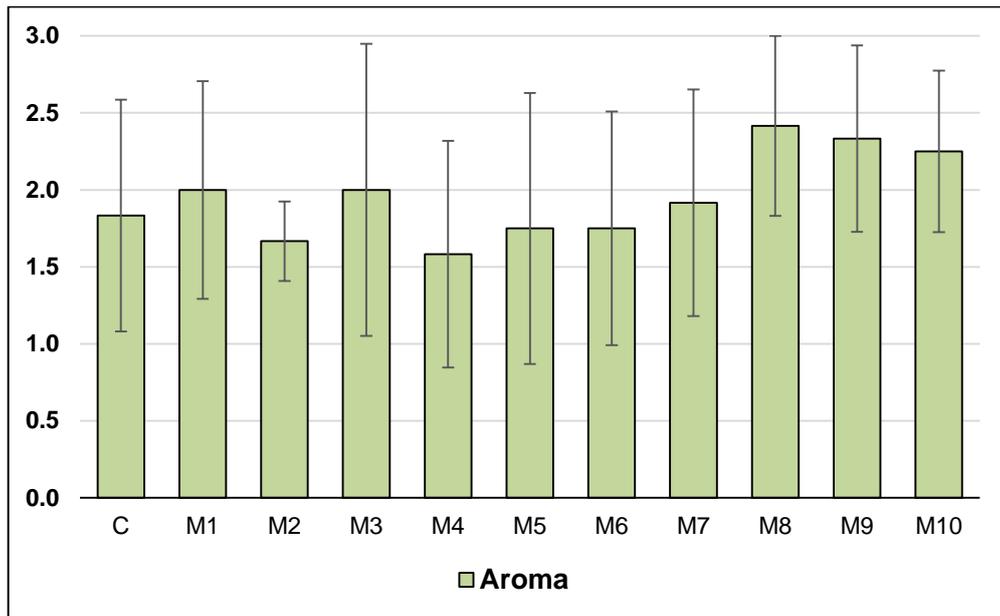


Figura 9. Resultados del análisis sensorial: aroma de las mezclas (aplicando prueba de Friedman)

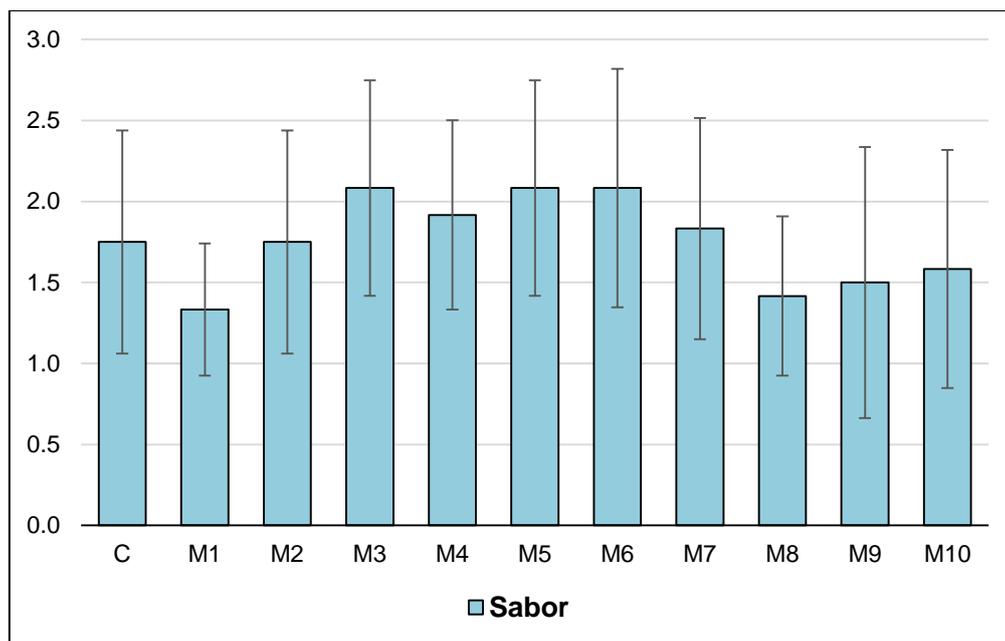


Figura 10. Resultados del análisis sensorial: sabor de las mezclas (aplicando prueba de Friedman)

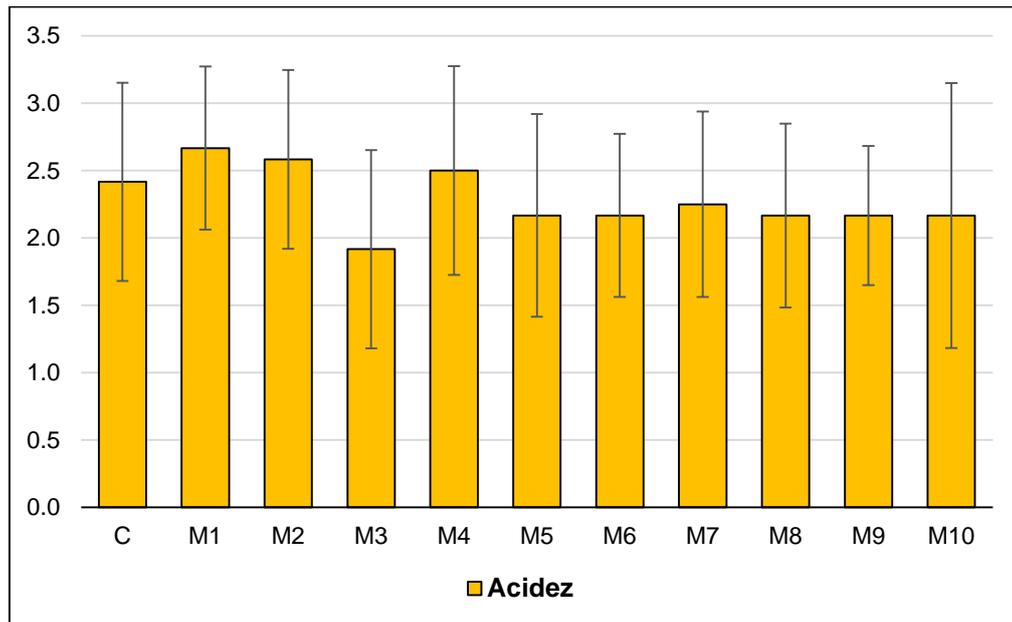


Figura 11. Resultados del análisis sensorial: acidez de las mezclas (aplicando prueba de Friedman)

3.2. Prueba 2

En esta prueba se observan los resultados obtenidos de la acidez total y el contenido fenólico de las muestras con mejor actividad sensorial y contenido fenólico, según lo observado de la Prueba 1.

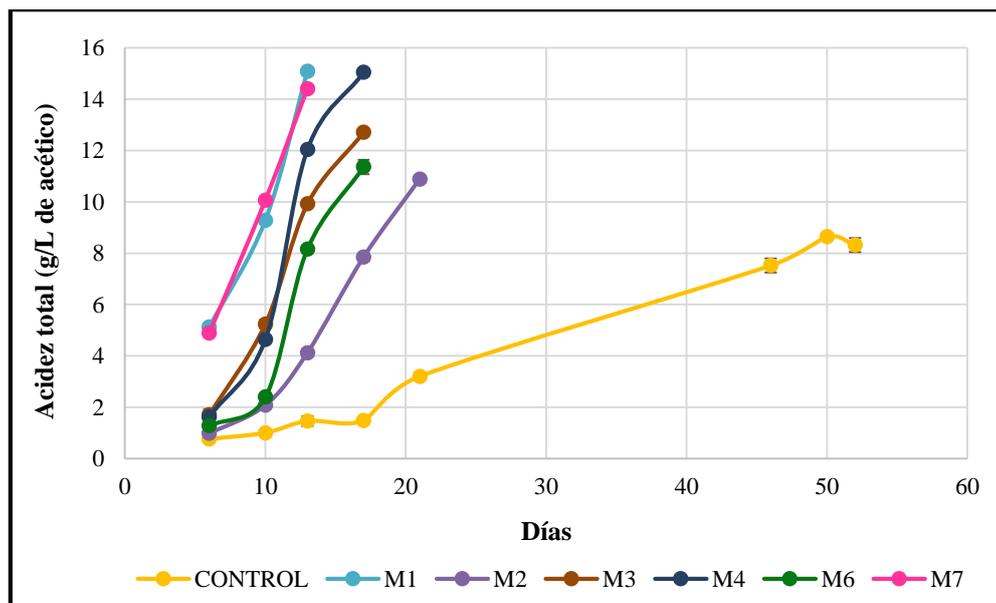


Figura 12. Acidez total expresada como ácido acético (g/L)

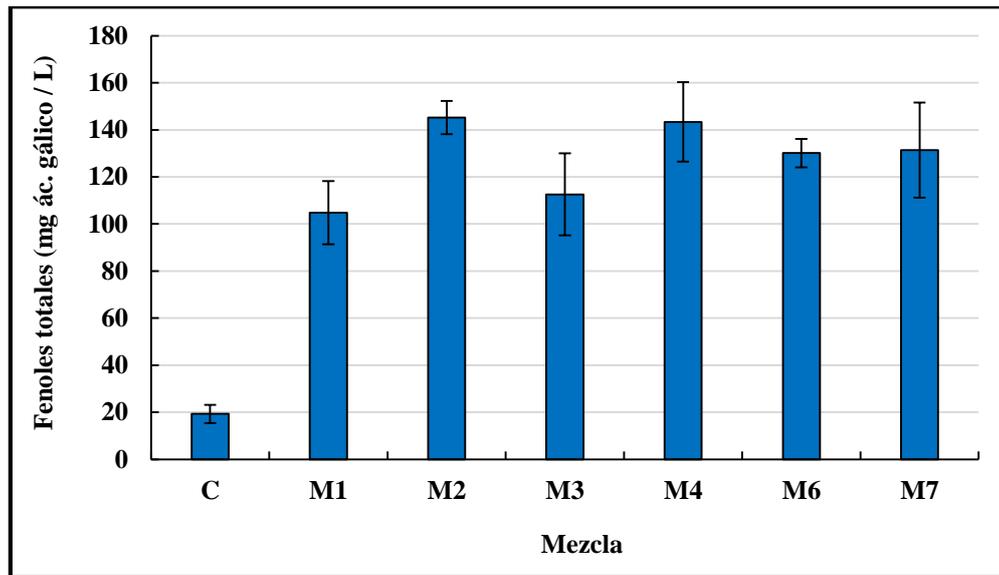


Figura 13. Contenido de fenoles totales (mg ác. gálico/L)

3.3. Prueba 3

En esta prueba además de los análisis realizados en las pruebas anteriores, se realizó la evaluación de la actividad antimicrobiana y de la capacidad antioxidante.

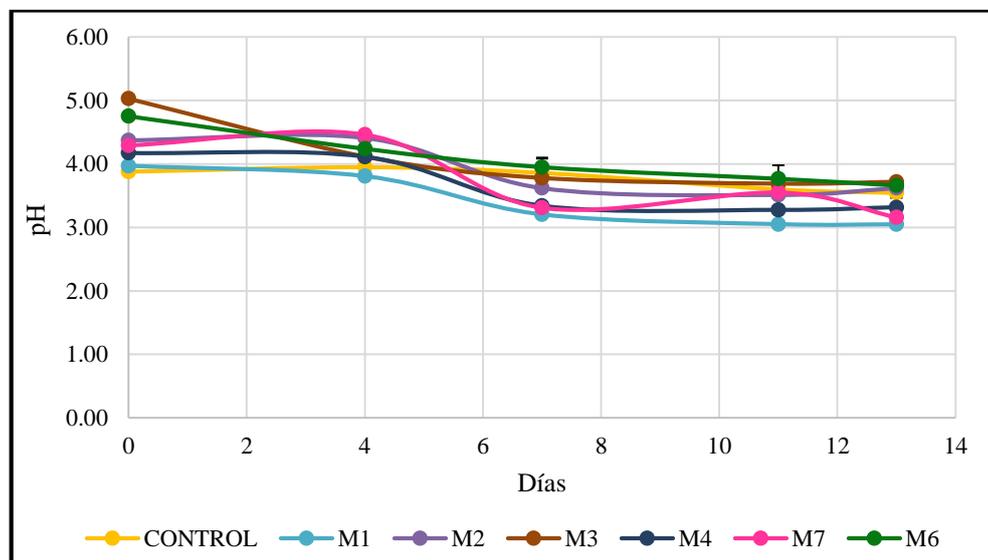


Figura 14. Evolución del pH de las bebidas fermentadas

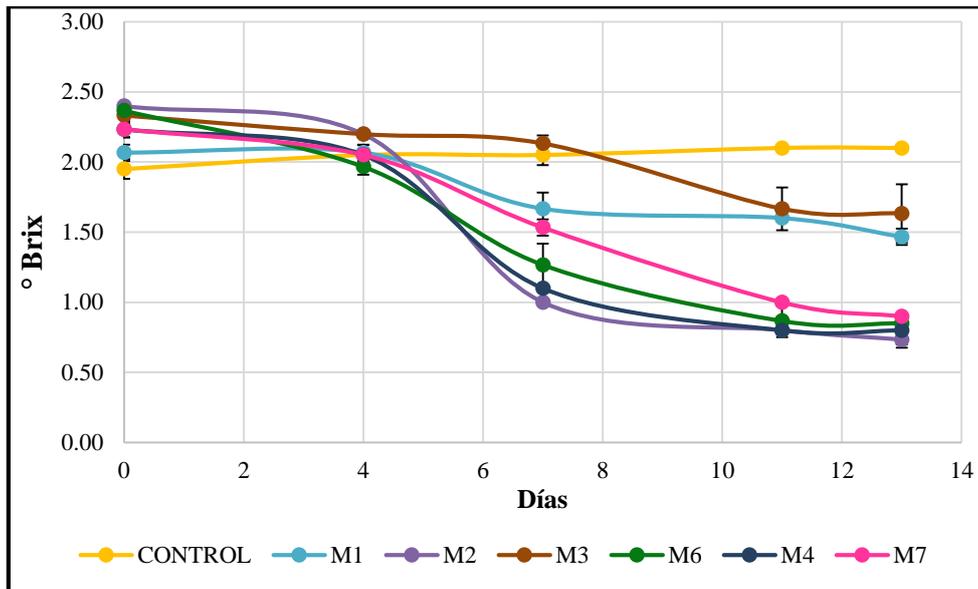


Figura 15. Evolución de azúcares fermentables (°Brix)

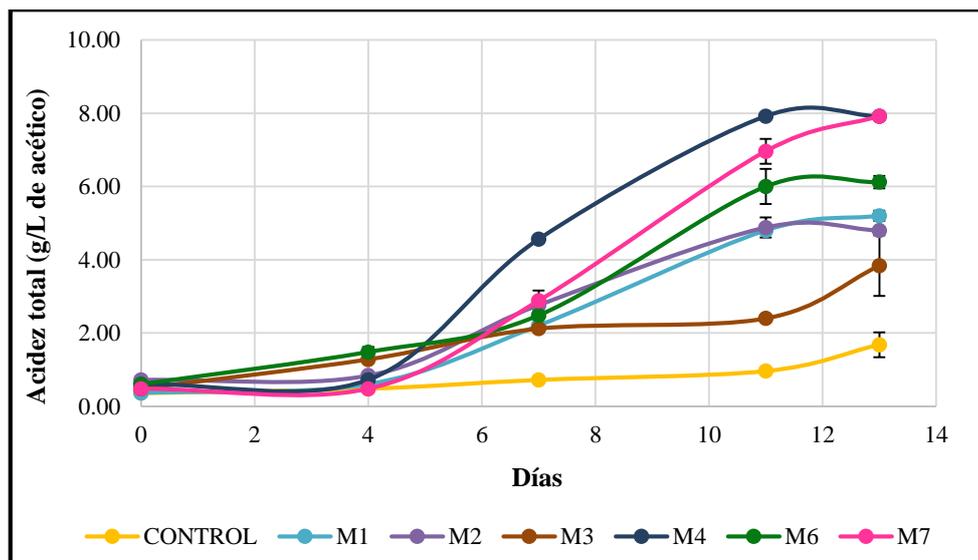


Figura 16. Acidez total expresada como ácido acético (g/L)

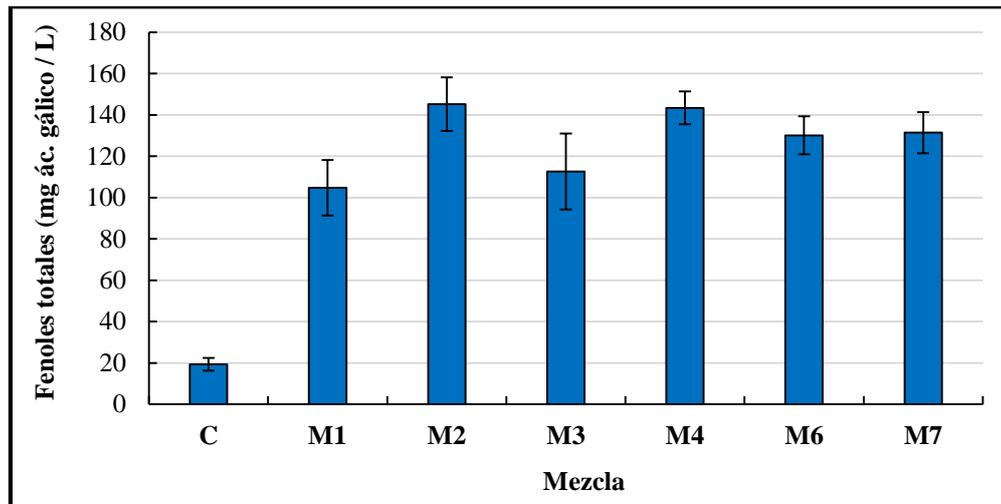


Figura 17. Contenido de fenoles totales (mg ác. gálico/L)

La figura 18 muestra los resultados de la capacidad antioxidante de las mezclas, evaluada mediante el método ABTS.

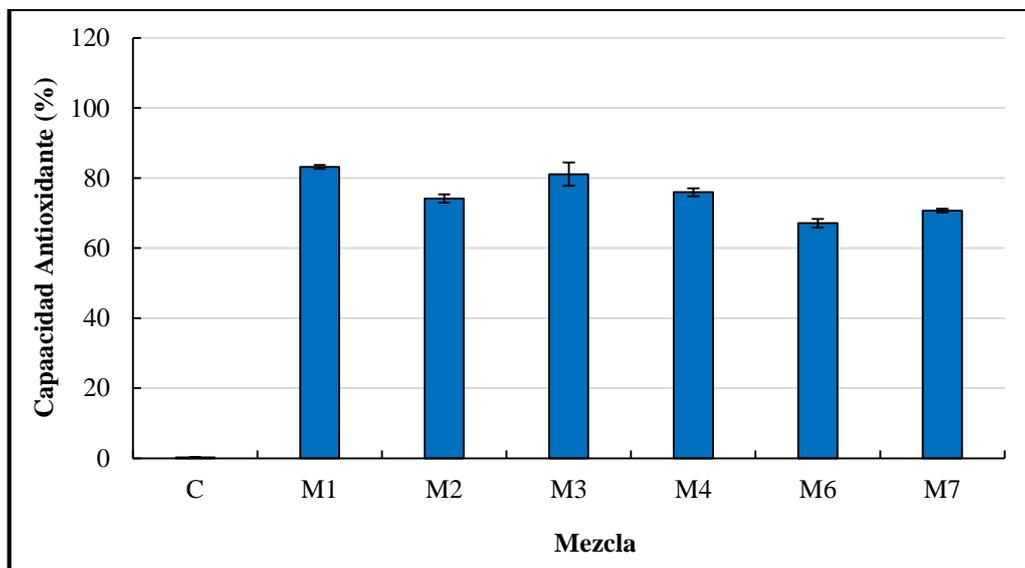


Figura 18. Capacidad antioxidante de las mezclas (método ABTS)

La Figura 20 muestra los resultados de la actividad antimicrobiana de las mezclas frente a las bacterias *Samonella spp.* y *Escherichia coli*.

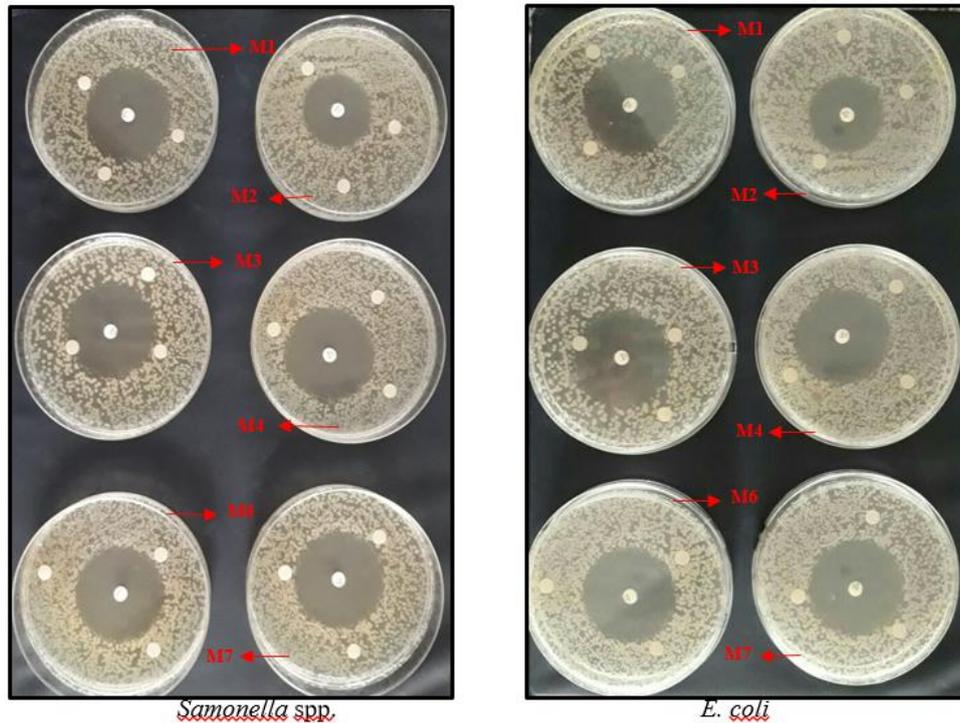


Figura 19. Placas cultivadas con *Samonella* spp. y *E. coli* para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión

3.4. Prueba 4

En la Figura 22 se muestran los resultados del contenido de fenoles totales de las infusiones azucaradas, sin fermentación, elaboradas en base a la Tabla 8.

Tabla 7
Composición de las infusiones de molle, matico y cedrón, además de té negro

Mezcla	Infusión			
	Molle (g)	Matico (g)	Cedrón (g)	Té (g)
C	0	0	0	0
Mo	5	0	0	0
Ma	0	5	0	0
Ce	0	0	5	0
T	0	0	0	5

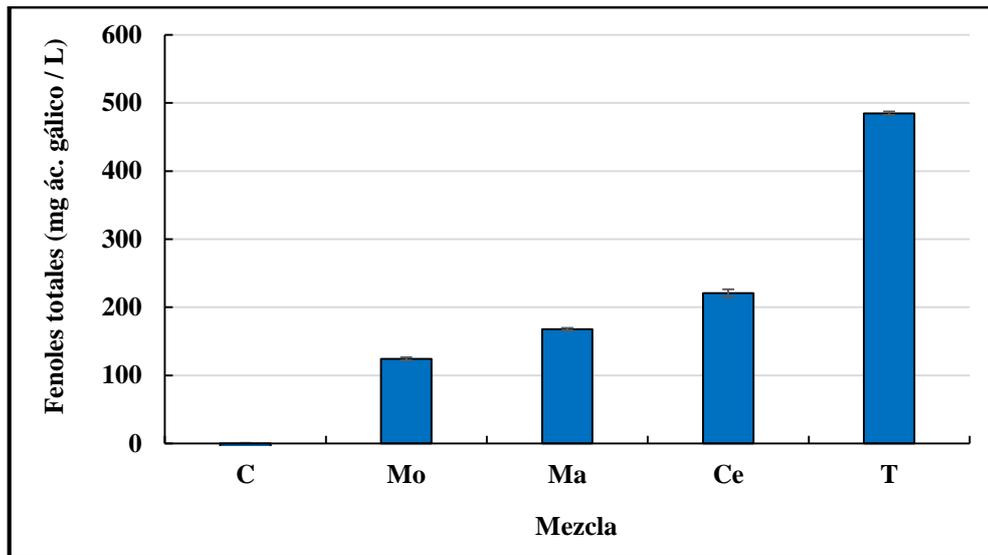


Figura 20. Contenido de fenoles totales (mg ác. gálico/L) en infusiones sin fermentación

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

4.1. Discusión

4.1.1. Prueba 1

Producción de ácidos orgánicos

De acuerdo con la Figura 4, el pH de las mezclas fue disminuyendo hasta alcanzar un valor en torno a 3.0, debido a la producción de ácidos orgánicos por el SCOBY (consorcio microbiano formado por bacterias y levaduras) (Sievers *et al.*, 1995).

En la Figura 6 se observa una mayor acidez final en las mezclas 1, 7 y 10, de las cuales las dos primeras contienen mayor proporción de molle (Tabla 2), las cuales además mostraron el pH más bajo al inicio del proceso fermentativo (Figura 4), lo cual estaría relacionado con la presencia de compuestos orgánicos en el molle como α -, β -felandreno, limoneno, β -mirceno, y elemol (Martins *et al.*, 2014; Doleski, Ferreira, Calil y Palermo, 2015).

Por el contrario, las mezclas 3 y 5, con mayor contenido de cedrón (especialmente la M3, 100% cedrón), mostraron la menor acidez al final del proceso fermentativo, lo cual podría estar relacionado con la presencia de compuestos que afectan el metabolismo de los microorganismos que forman el SCOBY, y por tanto, la síntesis de ácidos. La bibliografía reporta efecto antimicrobiano para el cedrón (Alonso y Desmarchelier, 2005), incluso con una acción moderada sobre bacterias patógenas como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, y una fuerte actividad sobre *Bacillus cereus* (Vieitez *et al.*, 2017).

Contenido de fenoles totales

En la Figura 7 se observa que las mezclas 1, 2, 4 y 7 presentaron un mayor contenido de fenoles totales (mg Equiv. ácido gálico/L). Cabe señalar que a excepción de la M2 (100%

matico), las otras mezclas presentaron un alto contenido de molle. Estudios previos han reportado la presencia de fenoles en hojas de molle, con capacidad antioxidante (Trejo, 2015; Pintore et al., 2009; Ferrero, Werdin y Sánchez, 2006). Además, las mezclas 2 y 4 también fueron elaboradas con alto contenido de matico, lo cual también contribuyó a la cantidad de fenoles determinadas en estas mezclas, ello debido a su contenido de flavonoides (luteolina, luteolina-7-glucósido, linarina y derivados del ácido cafeico), y otros compuestos fenólicos, con actividad antioxidante y antiinflamatoria (Fuentes *et al.*, 2017; Backhouse *et al.* 2008; Mensah *et al.*, 2001).

Por su parte, el cedrón, para el cual se han reportado la presencia de flavonoides (Ragone, Conforti, Volonté y Consolini, 2007; Alonso y Desmarchelier, 2005; Severin, Bruzzese, Di Sapio, Giubileo y Gattuso, 2005; Bilia, Giomi, Innocenti, Gallori, y Vincieri, 2008), no parece haber contribuido significativamente al contenido de fenoles totales (Figura 7), dado que en las mezclas 3, 5, 6 y 9, con alto contenido de esta hierba no se obtuvo un alto contenido de fenoles totales.

Aceptabilidad sensorial

Las figuras 8 a 10 muestran los resultados del primer análisis sensorial aplicado para seleccionar aquellas mezclas con mayor aceptabilidad sensorial respecto a aroma y sabor, además, de conocer a juicio de los panelistas cuáles eran más ácidas. Se obtuvo bajas puntuaciones en las mezclas 2, 4, 5 y 6, mientras que en sabor fueron calificadas con bajas puntuaciones las mezclas 1, 2, 8, 9, 10. Por su parte las mezclas 3, 9 y 10 fueron las calificadas con menor acidez, coincidiendo la mezcla 1 con lo obtenido en el análisis fisicoquímico de acidez total (Figura 6). No obstante, el análisis estadístico muestra que no

hay diferencia significativa entre los resultados de análisis sensorial, de modo que es difícil tomar una decisión solamente considerando estos parámetros.

En tal sentido, a este nivel, se tomó como único criterio para seleccionar las mejores mezclas, el contenido de fenoles totales, eligiendo el control (C), las mezclas 1, 2 y 3 (con el fin de evaluar el efecto individual de cada hierba), y las mezclas 4 y 7 (mayor contenido de fenoles totales).

4.1.2. Prueba 2

Producción de ácidos orgánicos

En la Figura 12 se observa que las muestras M1 y M7 alcanzan una acidez alta, al igual que en el primer experimento (Figura 6). En tan sólo 13 días alcanzan 15.08 y 14.40 g/L de ácido acético, respectivamente, casi el doble de acidez que en la Prueba 1, lo cual estaría relacionado con la temperatura a la cual se llevaron a cabo las fermentaciones (enero de 2019, periodo de verano, SENAMHI, 2018), con incremento de la actividad metabólica del SCOBY (Escribano y Santos, 2012; Varela y Grotiuz, 2008).

Al comparar las figuras 6 y 12, se observa que la producción de ácidos orgánicos sigue una tendencia similar, evidenciando que la mezclas M1, M4 y M7 con la mayor acidez. Asimismo, en base a los comentarios recogidos de los panelistas, se tomó como criterio para finalizar el proceso fermentativo, el momento en el cual la acidez alcanzara entre 11 y 15 g de ácido acético/L, punto en el que la bebida fue calificada como agradable.

El mayor contenido de acidez en las mezclas M1, M4 y M7 está relacionada con la mayor producción de ácido glucónico y ácido acético por el SCOBY (Balentine *et al.*, 1997), de acuerdo con lo mostrado en la Figura 1. Se ha reportado que las catequinas presentes en el

té pueden actuar en sinergia con los ácidos orgánicos (Antony y Shankaranaryana, 1997; Hara *et al.*, 1995f), estimulando, entre otros procesos, una mayor síntesis de ácidos orgánicos, por intermedio de una mayor síntesis de etanol por las levaduras. Lo cual explicaría la mayor acidez observada en las mezclas M1, M4 y M7, teniendo en cuenta que las tres hierbas poseen compuestos fenólicos, como catequina y otros (Cáceres, 2018; Trejo, 2015; Skaltsa y Shammass, 1988; Carnat *et al.*, 1995; Zygadlo *et al.*, 1994; Carnat, Carnat, Fraisse y Lamaison, 1999; Alonso y Desmarchelier, 2005; Fuentes *et al.*, 2017; Backhouse *et al.* 2008; Mensah *et al.*, 2001).

Adicionalmente, investigaciones previas, como la de Jayavalan *et al.* (2016), reportan a las hojas del té como origen de ácidos presentes en la kombucha (acético, glucónico, glucurónico, cítrico, L-láctico, málico, tartárico, malónico, oxálico, succínico, pirúvico, entre otros), representando hasta un 0.5% del peso seco de los brotes de té fresco (Sanderson y Selvendran, 1965). Lo cual podría explicar la mayor acidez de las mezclas M1, M4 y M7, las cuales tienen como componente mayoritario a las hojas de molle, en concordancia con los resultados obtenidos en las figuras 4 y 6.

Contenido de fenoles totales

En cuanto al contenido fenólico de las mezclas (Figura 13), se repiten los resultados obtenidos en la Prueba 1, con el control (C) con el menor contenido. Ello indica el aporte de fenoles de las hierbas. Chu y Chen (2006) y Vitas *et al.* (2018) reportan un incremento del contenido fenólico en la kombucha durante el tiempo de fermentación, en comparación con las infusiones iniciales correspondientes, teniendo como explicación, además del aporte de los fenoles simples, la degradación de fenoles complejos por la actividad enzimática de las

bacterias y levaduras presentes en el SCOBY, entre otras reacciones de transformación química (Chu y Chen, 2006; Jayabalan *et al.*, 2016).

4.1.3. Prueba 3

Producción de ácidos orgánicos y contenido de fenoles totales

En las figuras 4 y 14 (Prueba 1 y 3, respectivamente), se observan los resultados de pH, evidenciando que los resultados en ambas pruebas coinciden, alcanzando un menor pH las mezclas M1, M4 y M7 en ambos casos. Similar tendencia se observa respecto al contenido a azúcares residuales, con las mezclas M2, M4, M6 y M7 entre las de menor °Brix. Así mismo, en concordancia con las pruebas 1 y 2 (figuras 6 y 12, respectivamente) se obtuvo mayor acidez con las mezclas M4 y M7.

En cuanto al contenido de fenoles totales, en concordancia con las pruebas 1 y 2 (figuras 7 y 13), las muestras M2, M4 y M7 fueron las que obtuvieron valores más altos (Figura 17).

Capacidad antioxidante

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se basa en su capacidad de neutralizar radicales como los superóxidos, peróxidos, entre otros (Chu y Chen, 2006; Fu *et al.*, 2014). Al respecto, se realizaron los análisis de capacidad antioxidante mediante los métodos ABTS y DPPH (figuras 18 y 19), mostrando los resultados en ambos métodos una tendencia similar, con una menor capacidad antioxidante las mezclas M2 y M6, además del control (C), mientras que las mezclas M1, M3, M4 y M7 mostraron la mayor capacidad antioxidante. Dentro de ellas, las mezclas M1, M4 y M7 son las que tuvieron una mayor proporción de molle, al cual se le ha reportado actividad antioxidante (Salazar, Pérez, López, Alanís, y Waksman de Torres, 2011; Guala, Elder, Pérez y Chiesa, 2009), atribuible a su contenido de

monoterpenos como α -pineno, sabineno, limoneno, β -mirceno, α - y β -felandreno (Martins, Arantes, Candeias, Tinoco y Cruz, 2014).

Actividad antimicrobiana

En la Figura 20 se observan las placas cultivadas con *Samonella* spp. y *E. Coli*, en las cuales es evidente el efecto antimicrobiano del antibiótico usado como control (ampicilina), con la formación de halos, mientras que los discos conteniendo las mezclas fermentadas a base de molle, matico y cedrón no mostraron la formación de halos de inhibición.

Los resultados obtenidos indicarían una insuficiente dosis de cada hierba, y de la presencia de los compuestos de estas hierbas reportadas en estudios previos con efecto antimicrobiano, dado que se ha reportado en el cedrón un efecto inhibitorio sobre *E. coli* y *Salmonella typhimurium* (Vieitez, Maceiras, Jachmanian y Albores, 2017), mientras que al molle también se le atribuye actividad antibacteriana (Atti *et al.*, 2013; Martins, Arantes, Candeias, Tinoco y Cruz, 2014).

De modo, que, en base a los resultados obtenidos, las bebidas fermentadas a base de molle, matico y cedrón, no presentan actividad antimicrobiana, al menos a las dosis utilizadas y frente a las bacterias *Samonella* spp. y *E. coli*.

4.1.4. Prueba 4

Finalmente, a fin de evaluar el efecto de la actividad enzimática del SCOBY sobre el contenido fenólico, en la Figura 21 se muestra el contenido de fenoles totales de las infusiones antes de ser sometidas al proceso fermentativo (Figura 1), lo que evidencia lo reportado previamente respecto al incremento del contenido de estos compuestos tras la fermentación (Chu y Chen, 2006; Jayabalan *et al.*, 2016; Vitas *et al.*, 2018), por acción de la

actividad enzimática del SCOBY, causante de la degradación de fenoles complejos presentes en las hierbas, entre otros procesos de transformación química.

4.2. Conclusiones

En base a los resultados obtenidos, las mezclas con mayor contenido de molle presentaron mayor síntesis de ácidos orgánicos, con un similar comportamiento en la evolución del pH y el consumo de azúcares. Además, las mezclas constituidas por molle y matico presentaron una mayor cantidad de fenoles totales, mientras que la mayor capacidad antioxidante se obtuvo en las mezclas con mayor proporción de molle. No obstante, ninguna de las mezclas mostró actividad antimicrobiana frente a las bacterias *Samonella* spp. y *E. coli*, lo cual indica que, bajo las condiciones de elaboración, estas bebidas no son aptas para conferir dicho efecto en caso de consumo humano.

REFERENCIAS

- Abdel-Sattar, E., Zaitoun, A., Farag, M., El-Gayed, S., y Harraz, F., (2010). Chemical composition, insecticidal and insect repellent activity of *Schinus molle* L. leaf and fruit essential oils against *Trogoderma granarium* and *Tribolium castaneum*. *Natural Product Research*, 24(3), 226-235. doi: 10.1080/14786410802346223.
- Alonso, J., y Desmarchelier, C. (2005). Plantas Medicinales Autóctonas de la Argentina: Bases Científicas para su Aplicación en Atención Primaria de la Salud. Recuperado de <https://taykacomunidad.files.wordpress.com/2017/07/plantas-medicinales-autoctonas-de-la-argentina.pdf>
- Antony, J., y Shankaranaryana, M. (1997). Polyphenols of green tea. *International Food Ingredients*, 5(1), 47-50.
- Atti, A.C., Rossato, M., Agostini, F., Atti, L., Dos Santos, P.L., Molon, R., Dellacassa, E., y Moyna, P., (2013). Chemical composition of the essential oils from leaves and fruits of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi from Southern Brazil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 12(1), 16-25. doi: 10.1080/0972060X.2009.10643686
- Backhouse, N., Delporte, C., Apablaza, C., Farias, M., Goity, L., Arrau, S., Negrete, R., Castro, C., y Miranda, H. (2008). Antinociceptive activity of *Buddleja globosa* (matico) in several models of pain. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(1), 160-165. doi: 10.1016/j.jep.2008.06.022
- Backhouse, N., Rosales, L., Apablaza, L., Goity, L., Negrete, R., Theodoluz, C., Rodríguez, J., y Delporte C. (2008). Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, *Buddlejaceae*. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(2), 263-269. doi: 10.1016/j.jep.2007.11.025
- Balentine, D., Wiseman, S., y Bouwens, L. (1997). The chemistry of tea flavonoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37(8), 693 -704. doi: 10.1080/10408399709527797

- Banerjee, D., Hassarajani, S., Maity, B., Narayan, G., Bandyopadhyaya, S., y Chattopadhyay, S. (2010). Comparative healing property of kombucha tea and black tea against indomethacin-induced gastric ulceration in mice: possible mechanism of action. *Food & Function*, 1(3), 284-293. doi: 10.1039/c0fo00025f
- Battikh, H., Bakhrouf, A., y Ammar, E. (2012). Antimicrobial effect of Kombucha analogues. *LWT - Food Science and Technology*, 47(1), 71–77. doi: 10.1016/j.lwt.2011.12.033
- Bauer-Petrovska, B., y Petrushevska-Tozi, L. (2000). Mineral and water-soluble vitamin contents in the kombucha drink. *International Journal of Food Science and Technology* 35, 201-205. Recuperado de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2621.2000.00342.x>
- Bellassoued, K., Ghrab, F., Makni-Ayadi, F., Van Pelt, J., Elfeki, A., y Ammar, E. (2015). Protective effect of kombucha on rats fed a hypercholesterolemic diet is mediated by its antioxidant activity. *Pharmaceutical Biology*, 53(11), 1699–1709. doi: 10.3109/13880209.2014.1001408
- Bhattacharya, S., Gachhui, R., y Sil, P. C. (2011). Hepatoprotective properties of kombucha tea against TBHP-induced oxidative stress via suppression of mitochondria-dependent apoptosis. *Pathophysiology*, 18(3), 221-234. doi: 10.1016/j.pathophys.2011.02.001
- Bhattacharya, S., Gachhui, R., y Sil, P. C. (2013). Effect of Kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 328-340. doi:10.1016/j.fct.2013.07.051
- Bigliardi, B., y Galati, F. (2013). Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends in Food Science & Technology*, 31(2), 118-129. doi: 10.1016/j.tifs.2013.03.006
- Bilia, A., Giomi, M., Innocenti, M., Gallori, S., y Vincieri, F. (2008). HPLC-DAD-ESIMS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon Bibliografía 163 verbena

- and evaluation of the antioxidant activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46, 463-470. doi:10.1016/j.jpba.2007.11.007
- Blanc, P. J. (1996). Characterization of the tea fungus metabolites. *Biotechnol Letters*, 18(2), 139-142. Recuperado de <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00128667>
- Browna, L., Caligiurib, S., Brownc, D., y Pierce, G. (2018). Clinical trials using functional foods provide unique challenges. *Journal of Functional Foods*, 45, 233–238. doi: 10.1016/j.jff.2018.01.024
- Cáceres, F. (2018). Formulación de una crema a base de extracto hidroalcohólico de las hojas de *Schinus molle* L. “molle”. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho, Perú.
- Carnat, A., Carnat, A.P., Chavignon, O., Heitz, A., Wylde, R., Lamaison, J.L., 1995. Luteolin 7-diglucuronide, the major flavonoid compound from *Aloysia triphylla* and *Verbena officinalis*. *Planta Medica* 61, 490. doi: 10.1055/s-2006-958152
- Carnat, A., Carnat, A.P., Fraisse, D., Lamaison, J.L., 1999. The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. *Fitoterapia* 70, 44–49. doi: 10.1016/S0367-326X(98)00016-1
- Chen, C., y Liu, B. Y. (2000). Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *The Journal of Applied Microbiology*, 89(5), 834-839. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11119158>
- Chu, S., y Chen, C. (2006). Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chemistry*, 98, 502–507. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.05.080
- Derkyia, N., Acheampong, M., Mwin, E., Tetteh, P., y Aidoo, S. (2018). Product design for a functional non-alcoholic drink. *South African Journal of Chemical Engineering*, 25, 85-90. doi: 10.1016/j.sajce.2018.02.002

- Diker, K. S., y Hascelik, G. (1994). The bactericidal activity of tea against *Helicobacter pylori*. *Letters in Applied Microbiology*, 19, 299-300. doi: 10.1111/j.1472-765X.1994.tb00459.x
- Dipti, P., Yogesh, B., Kain, A. K., Pauline, T., Anju, B., Sairam, M., Singh, B., Mongia, S.S., Kumar, G. I., y Selvamurthy, W. (2003). Lead-induced oxidative stress: beneficial effects of kombucha tea. *Biomedical and Environmental Sciences*, 16(3), 276-282. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14631833>
- Doleski, M., Ferreira, C., Calil, B., y Palermo, M. (2015). Composición química y actividad biológica del aceite esencial de *Schinus molle* L. *Revista Cubana de Farmacia* 49(1), 132-143. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/revcubfar/rcf-2015/rcf151m.pdf>
- Dufresne, C., y Farnworth, E. (2000). Tea, kombucha, and health: a review. *Food Research International*, 33, 409-421. doi: 10.1016/S0963-9969(00)00067-3
- Ebrahimi, A., Ghods, S., M., Keyghobadi, F., y Ebrahimi, M. (2017). Chemical composition of garlic fermented in red grape vinegar and kombucha. *Journal of Functional Foods*, 34, 347-355. doi: 10.1016/j.jff.2017.05.018
- Escribano, M., y Santos., C. (2012). Anthocyanin Copigmentation - Evaluation, Mechanisms and Implications for the Colour of Red Wines. *Current Organic Chemistry*, 16(6), 715-723. doi: 10.2174/138527212799957977
- Ferrero, A., Werdin, J., y Sánchez, C. (2006). Biological activity of *Schinus molle* on *Triatoma infestans*. *Fitoterapia*, 77(5), 381-383. doi:10.1016/j.fitote.2006.03.004
- Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I. y Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043-1048. doi: 10.1016/j.jfca.2011.01.008

- Fu, C., Yan, F., Cao, Z., Xie, F., y Lin, J. (2014). Antioxidant activities of kombucha prepared from three different substrates and changes in content of probiotics during storage. *Food Sciences Technology-Brazil*, 34, 123–126. doi: 10.1590/S0101-20612014005000012
- Fuentes, M., Sepulveda, C., Alarcon, M., Palomo, I., y Fuentes, E. (2017). Buddlja globosa (matico) prevents collagen-induced platelet activation by decreasing phospholipase C-gamma 2 and protein kinase C phosphorylation signaling. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 8(1), 66-71. doi: 10.1016/j.jtcme.2017.02.005
- Graham, H.N., (1992). Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Preventive medicine*, 21(3), 334-350. doi: 10.1016/0091-7435(92)90041-F
- Greenwalt, C. J., Ledford, R. A., y Steinkraus, K. (1998). Determination and Characterization of the Antimicrobial Activity of the Fermented Tea Kombucha. *LWT-Food Science Technology*, 31(3), 291-296. doi:10.1006/fstl.1997.0354
- Guala, M., Elder, H., Pérez, G., y Chiesa, A. (2009). Evaluación del Poder Antioxidante de Fracciones de Aceite Esencial Crudo de *Schinus molle* L. obtenidas por Destilación al Vacío. *Información Tecnológica*, 22(2), 83-88. doi: 10.1612/inf.tecnol.4024it.08
- Gutiérrez, L., Miranda, M., Varona, N., y Rodríguez, A. (2000). Validación de 2 métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (quercetina) en *Psidium guajaba*, L. *Revista Cubana de Farmacia*, 34(1), 1561-2988. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152000000100007
- Hara, Y., Luo, S., Wickremashinghe, R., y Yamanishi, T. (1995). IX. *Uses and benefits of tea*. *Food Reviews International*, 11(3), 527-542. doi: 10.1080/87559129509541057
- Hartmann, A. M., Burleson, L. E., Holmes, A. K., y Geist, C. R. (2000). Effects of chronic kombucha ingestion on open-field behaviors, longevity, appetitive behaviors, and organs in C57-BL/6 mice: a pilot study. *Nutrition*, 16, 755-761. doi: 10.1016/S0899-9007(00)00380-4

Hosni, K., Jemli, M., Dziri, S., Mrabet, Y., Ennigrou, A., Sghaier, A., Casabianca, H., Vulliet, E., Brahim, N., y Sebei, H., (2011). Changes in phytochemical, antimicrobial and free radical scavenging activities of the Peruvian pepper tree (*Schinus molle* L.) as influenced by fruit maturation. *Industrial Crops and Products*, 34(3), 1622-1628.
doi:10.1016/j.indcrop.2011.06.004

Instituto Colombiano de Normalización y Certificación (1997). Guía general para la selección, entrenamiento y seguimiento de evaluadores. Parte 1. Evaluadores seleccionados. NTC 4129. Recuperado de <https://tienda.icontec.org/wp-content/uploads/pdfs/NTC4661.pdf>

Instituto Colombiano de Normalización y Certificación (2004). Análisis sensorial. Metodología. Análisis secuencial. NTC 5278. Recuperado de <https://tienda.icontec.org/wp-content/uploads/pdfs/NTC5278.pdf>

Instituto Colombiano de Normalización y Certificación (2006). Análisis sensorial. Metodología. PRUEBA DUO-TRIO. NTC 3883. Recuperado el <https://tienda.icontec.org/wp-content/uploads/pdfs/NTC3883.pdf>

Instituto Colombiano de Normalización y Certificación (2008). Análisis sensorial. Metodología. PRUEBA TRIANGULAR. NTC 2681. Recuperado de <https://tienda.icontec.org/wp-content/uploads/pdfs/NTC2681.pdf>

Instituto Nacional de Salud (2002). Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Serie de Normas Técnicas N° 30.
Recuperado de
<http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%202.pdf>

Ismail, A. A., Bassyouni, R. H., Kamel, Z., y Gabr, S. M. (2015) Detoxification of Patulin by Kombucha tea culture. *CyTA - Journal of Food*, 14(2), 271-279. doi:
10.1080/19476337.2015.1096828

- Jayabalan, R., Baskaran, S., Marimuthu, S., Swaminathan, K., y Yun, S. E. (2010). Effect of Kombucha Tea on Aflatoxin B1 Induced Acute Hepatotoxicity in Albino Rats- prophylactic and Curative Studies. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 53(4), 407-416. doi: 10.3839/jksabc.2010.063
- Jayabalan, R., Chen P. N., Hsieh, Y. S., Prabhakaran, K., Pitchai, P., Marimuthu, S., y Yun, S. E. (2011). Effect of solvent fractions of Kombucha tea on viability and invasiveness of cancer cells-characterization of dimethyl 2-(2-hydroxy-2-methoxypropylidene) malonate and vitexin. *Indian Journal of Biotechnology*, 10(1), 75–82. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/268277223_Effect_of_solvent_fractions_of_kombucha_tea_on_viability_and_invasiveness_of_cancer_cells-Characterization_of_dimethyl_2-2-hydroxy-2-methoxypropylidene_malonate
- Jayabalan, R., Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., y Sathishkumar, M. (2014). A Review on Kombucha Tea—Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 538-550. doi: 10.1111/1541-4337.12073
- Jayabalan, R., Malbaša, R. V., y Sathishkumar, M. (2016). Kombucha Tea: Metabolites. *Fungal Metabolites*, 1-14. doi: 10.1007/978-3-319-19456-1_12-1
- Jayabalan, R., Marimuthu, S., y Swaminathan, K. (2007). Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*, 102(1), 392-398. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.05.032
- Kallel, L., Desseaux, V., Hamdi, M., Stocker, P., y Ajandous, E. (2012). Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. *Food Research International*, 49(1), 226-232. doi: 10.1016/j.foodres.2012.08.018

- Kim, Y., Goodner, K. L., Park, J. D., Choi, J., y Talcott, S. T. (2011). Changes in antioxidant phytochemicals and volatile composition of *Camellia sinensis* by oxidation during tea fermentation. *Food Chemistry*, 129, 1331-1342. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.05.012
- Koch, W., Kukula-Koch, W., y Komsta, L. (2018). Black Tea Samples Origin Discrimination Using Analytical Investigations of Secondary Metabolites, Antiradical Scavenging Activity and Chemometric Approach. *Molecules*, 23(3), 513. doi: 10.3390/molecules23030513
- Letelier, M., y Ossandon, E. (2014). Use of a standardised dry extract of leaves of *Buddleja globosa hope*, BG-126, for the treatment and prevention of gastrointestinal disorders caused by treatment with nitrofurantoin and other antimicrobials. Recuperado de <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2012100365&recNum=25&maxRec=126603&office=&prevFilter=&sortOption=&queryString=&tab=PCT+Biblio>
- Liu, C. H., Hsu, W. H., Lee, F. L., y Liao, C. C. (1996). The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation. *Food Microbiology*, 13, 407-415. doi:10.1006/fmic.1996.0047
- Malbasa, R. V., Loncar, E. S., y Kolarov, L. J. A. (2002). L-lactic, L-ascorbic, total and volatile acids contents in dietetic kombucha beverage. *Romanian Biotechnological Letters*, 7(5), 891-896. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/285137028_L-lactic_L-ascorbic_total_and_volatile_acids_contents_in_dietetic_kombucha_beverage
- Markov, S., Jerinic, V., Cvetkovic, D., Loncar, E., y Malbasa, R. (2003). Kombucha – functional beverage: Composition, characteristics and process of biotransformation. *Hem Ind*, 57(10), 456–462. doi: 10.2298/HEMIND0310456S
- Marsh, A. J., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2014). Fermented beverages with healthpromoting potential: Past and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 38(2), 113–124. doi:10.1016/j.tifs.2014.05.002

- Martins, M., Arantes, S., Candeias, F., Tinoco, M., y Cruz, J. (2014). Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(1), 485-492. doi: 10.1016/j.jep.2013.10.063
- Menrad, K. (2003). Market and marketing of functional food in Europe. *Journal of Food Engineering*, 56(2-3), 181-188. doi: 10.1016/S0260-8774(02)00247-9
- Mensah, A., Sampson, J., Houghton, P., Hylands, P., Westbrook, J., Dunn, M., Hughes, M., y Cherry, G (2001). Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing. *Journal of Ethnopharmacology*, 77(2-3), 219-226.
- Mo, H., Zhu, Y., y Chen, Z. (2008). Microbial fermented tea: a potential source of natural food preservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 124-130. doi: 10.1016/j.tifs.2007.10.001
- Molyneux, P. (2004). The use of a stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219. Recuperado de <http://www.thaiscience.info/Journals/Article/SONG/10462423.pdf>
- Mukhtar, H., y Ahmad, N. (2000). Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71(6), 1698S-1702S. doi: 10.1093/ajcn/71.6.1698S
- Naveeda, M., BiBib, J., Ali, A., Suheryanid, I., Kakare, I., Ali, S., FangFangg, X., Ali, S. K., Yunjuani, L., Ullah, M., Abd, M., Noreldinl, A., Zhixiangm, S., LiXiab, C., y XiaoHui, Z. (2018). Pharmacological values and therapeutic properties of black tea (*Camellia sinensis*): A comprehensive overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 100, 521-531. doi: 10.1016/j.biopha.2018.02.048
- Nguyen, N. K., Nguyen, P. B., Nguyen, H. T., y Le, P. H. (2015). Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional

- Kombucha for high-level production of glucuronic acid. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 1149-1155. doi:10.1016/j.lwt.2015.07.018
- OENO 53 (2000). Vinagres de vino - determinación del contenido en acidez fija. Recuperado de <http://www.oiv.int/public/medias/2805/oeno-53-2000-1.pdf>
- OENO 54 (2000). Vinagres de vino - determinación del contenido de acidez volátil. Recuperado de <http://www.oiv.int/public/medias/2699/oeno-54-2000.pdf>
- OIV-OENO 553 (2016). Analysis of volatile compounds in wines by gas chromatography. Recuperado de <http://www.oiv.int/public/medias/5159/oiv-ma-as315-27.pdf>
- OIV-OENO 56 (2000). Vinagres de vino - determinación del contenido de alcohol residual. Recuperado de <http://www.oiv.int/public/medias/2701/oeno-56-2000.pdf>
- OIV-OENO 59 (2000). Vinagres de vino - determinación del contenido en sustancias reductoras no volátiles. Recuperado de <http://www.oiv.int/public/medias/2811/oeno-59-2000-1.pdf>
- Olivero, R. (2006). Optimización del Proceso de Clarificación en la Elaboración de Vino de Naranja Criolla (*Citrus sinensis*) (tesis de maestría). Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico.
- Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación (2003). Manual Para la Preparación y Venta de Frutas y Hortalizas. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/006/Y4893S/y4893s08.htm#bm08>
- Ortega D., Bustamante M., Gutiérrez D. y Correa A. (2014). Mixture experiments in industrial formulations. *DYNA*, 82 (189) 149-156. doi: 10.15446/dyna.v82n189.42785
- Pérez, H. (2016). Nutracéuticos: componente emergente para el beneficio de la salud. *ICIDCA*, 40(3), 20-28. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/2231/223120665003.pdf>
- Pintore, G., Marchetti, M., Chessa, M., Sechi, B., Scanu, N., Mangano, G., y Tirillini, B., (2009). *Rosmarinus officinalis* L.: chemical modifications of the essential oil and evaluation of

- antioxidant and antimicrobial activity. *Natural Product Communication*, 4(12), 1685–1690. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20120107>
- Quintana, L., Gómez, S., García, A., y Martínez, N. (2016). Conformación de un panel de jueces en entrenamiento para el análisis sensorial de licores de cacao obtenidos de diferentes modelos de siembra. *Ciencias Agrícolas*, 12(2), 220-227. doi: 10.18041/entramado.2016v12n2.24212
- Ragone, M., Sella, M., Conforti, P., Volonté, M., y Consolini, A. (2007). The spasmolytic effect of *Aloysia citriodora*, Palau (South American cedron) is partially due to its vitexin but not isovitexin on rat duodenum. *Journal of Ethnopharmacology*, 113 (2), 258-266. doi:10.1016/j.jep.2007.06.003
- Reiss, J. (1994). Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Z Lebensm Unters For*, 198 (3), 258–61. Recuperado de <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01192606>
- Rizner, A., Hadolin, M., Knez, Z., y Bauman, D. (2000). Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chemistry*, 71(2), 229-233. doi: 10.1016/S0308-8146(00)00161-8
- Rodríguez-Leyva, D., Weighell, W., Edel, A. L., LaVallee, R., Dibrov, E., Pinneker, R., Maddaford, T., Ramjiawan, B., Aliani, M., Guzman, R., y Pierce, G. (2013). Potent anti-hypertensive action of dietary flaxseed in hypertensive patients. *Hypertension*, 62, 1081–1089. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02094
- Ruberto, G. y Baratta, M.T. (2000) Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*, 69(2), 167-174. doi: 10.1016/S0308-8146(99)00247-2

- Sanderson, G., y Selvendran, R. (1965) The organic acids in tea plants. A study of the non-volatile organic acids separated on silica gel. *Journal Science of Food Agriculture*, 16, 251–258. doi: 10.1002/jsfa.2740160504
- Salazar, R., Pérez, L., López, J., Alanís, B., y Waksman de Torres, N. (2011). Antimicrobial and Antioxidant Activities of Plants from Northeast of Mexico. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 1-6. doi: 10.1093/ecam/nep127
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287–306. doi: 10.1080/1040869059096
- SENAMHI (2018). Promedio de temperatura normal para Trujillo. Recuperado de <https://senamhi.gob.pe/?p=pronostico-detalle&localidad=0005>
- Servicio Forestal y de Fauna Silvestre (2012). Boletín electrónico de precios de productos maderables y no maderables I trimestre 2012. Recuperado de <https://www.serfor.gob.pe/wp-content/uploads/2016/03/BoletinItri2012-.pdf>
- Severin, C., Bruzzese, D., Di Sapio, O., Giubileo, M., y Gattuso, S. (2005). Regeneración in vitro de plantas de *Aloysia citriodora* Palau (Verbenaceae). *Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias – UNR*, 8, 61-66. Recuperado de [http://www.cienciasagronomicas.unr.edu.ar/revista/articulos/RIFCA-2005_a5\(08\)061-066.pdf](http://www.cienciasagronomicas.unr.edu.ar/revista/articulos/RIFCA-2005_a5(08)061-066.pdf)
- Shah, N., y Prajapati, J. B. (2013). Effect of carbon dioxide on sensory attributes, physico-chemical parameters and viability of Probiotic *L. helveticus* MTCC 5463 in fermented milk. *Journal of Food Science and Technology*, 51(12), 3886-3893. doi: 10.1007/s13197-013-0943-9
- Sievers, M., Lanini, C., Weber, A., Schuler-Schmid, U., y Teuber, M. (1995). Microbiology and fermentation balance in a Kombucha beverage obtained from a tea fungus fermentation.

Systematic and Applied Microbiology, 18(4), 590-594. doi: 10.1016/S0723-

2020(11)80420-0

Skaltsa, H., Shamma, G., 1988. Flavonoides from *Lippia citriodora*. *Planta Medica* 54(5), 465.

doi: 10.1055/s-2006-962505

Sreeramulu, G., Zhu, Y., y Knol, W. (2000). Kombucha fermentation and its antimicrobial activity.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(6), 2589-2594. doi: 10.1021/jf991333m

Sreeramulu, G., Zhu, Y., y Knol, W. (2001). Kombucha fermentation and its antimicrobial activity.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(6), 2589-2594. Recuperado de

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10888589>

Srihari, T., Karthikesan, K., Ashokkumar, N., & Satyanarayana, U. (2013). Antihyperglycaemic

efficacy of Kombucha in streptozotocin-induced rats. *Journal of Functional Foods*, 5(4),

1794-1802. doi:10.1016/j.jff.2013.08.008

Sun, S. Y., Gong, H. S., Jiang, X. M., y Zhao, Y. P. (2014). Selected non-Saccharomyces wine

yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae* on alcoholic

fermentation behaviour and wine aroma of cherry wines. *Food Microbiology*, 44(5), 15–

23. doi: 10.1016/j.fm.2014.05.007

Taylor L. (2005). *The Healing Power of Rainforest Herbs. A Guide to Understanding and Using*

Herbal Medicinals. New York, EE.UU: Square One Publishers.

Teoh, A. L., Heard, G., y Cox, J. (2004). Yeast ecology of Kombucha fermentation. *International*

Journal of Food Microbiology, 96(2), 119-126. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.020

Thakur, M., y Sharma, R. K. (2017). Development of probiotic pomegranate beverage and its

physico-chemical and microbial characterization. *International Journal of Pure & Applied*

Bioscience, 5(1), 35-41. doi: 10.18782/2320-7051.2488

- Trejo, S. (2015). *Efecto antidiarreico del extracto hidroalcohólico de las hojas de Schinus molle L. “molle”* (tesis de pregrado). Universidad de Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Perú.
- Varela, G., y Grotiuz, G. (2002). Fisiología y metabolismo bacteriano. *Cefa. 1*, 43–58. Recuperado de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/FisiologiayMetabolismoBacteriano.pdf>
- Velicanski, A., Cvetkovic, D., y Markov, S. (2013). Characteristics of Kombucha fermentation on medicinal herbs from *Lamiaceae* family. *Romanian Biotechnological Letters*, 18(1), 8034-8042. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/267032775_Characteristics_of_kombucha_fermentation_on_medicinal_herbs_from_Lamiaceae_family
- Vieitez, I., Maceiras, L., Jachmanian, I., y Albores, S. (2017). Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 133(1), 58-64. doi:10.1016/j.supflu.2017.09.025
- Villarreal, S., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J., y Taillandier, P. (2018). Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of Food Science*, 83(3), 580-588. doi:10.1111/1750-3841.14068
- Vitas, J. S., Malbasa, R. V., Grahovac, J. A., y Loncar, E. S. (2013). The antioxidant activity of kombucha fermented milk products with stinging nettle and winter savory. *CI&CEQ*, 19(1), 129–39. doi: 10.2298/CICEQ120205048V
- Vitas, J., Cvetanović, A., Mašković, P., Švarc-Gajić, J., y Malbaša, R. (2018). Chemical composition and biological activity of novel types of kombucha beverages with yarrow. *Journal of Functional Foods*, 44, 95-102. doi:10.1016/j.jff.2018.02.019
- Wang, K., Gan, X., Tang, X., Wang, S., y Tan, H. (2010). Determination of d-saccharic acid-1,4-lactone from brewed kombucha broth by high-performance capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, 878 (371-374). doi: 10.1016/j.jchromb.2009.12.003

- Watawana, M., Jayawardena, N., Choo, C., y Waisundara, V. (2016). Application of the Kombucha ‘Tea Fungus’ for the enhancement of antioxidant and starch hydrolase inhibitory properties of ten herbal teas. *Food Chemistry*, 209, 304-311. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.04.130
- Wei, A., Shibamoto, T., 2010. Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 58(12), 7218–7225. doi: 10.1021/jf101077s
- Yamada, Y., Yukphan, P., Vu, H. T. L., Muramatsu, Y., Ochaikul, D., Tanasupawat, S., y Nakagawa, Y. (2012). Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae). *The Journal of General and Applied Microbiology*, 58(5), 397–404. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23149685>
- Yang, Z., Zhou, F., Ji, B., Li, B., Luo, Y., Yang, L., y Li, T. (2010). Symbiosis between microorganisms from kombucha and kefir: potential significance to the enhancement of kombucha function. *Applied Biochemical Biotechnology*, 160, 446-455. doi: 10.1007/s12010-008-8361-6
- Yavari, N., Assadi, M. M., Moghadam, M. B., y Larijani, K. (2011). Optimizing glucuronic acid production using tea fungus on grape juice by response surface methodology. *Australian Journal of Basic Applied Science*, 5, 1788-1794. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/224858805_Optimizing_Glucuronic_Acid_Production_Using_Tea_Fungus_on_Grape_Juice_by_Response_Surface_Methodology
- Yavari, N., Mazaheri, A. M., Larijani, K., & Moghadam, M. B. (2010). Response surface methodology for optimization of glucuronic acid production using kombucha layer on sour cherry juice. *Australian Journal of Basic Applied Science*, 4(8), 3250-3256. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/215770840_Response_Surface_Methodology_fo

r_Optimization_of_Glucuronic_Acid_Production_Using_Kombucha_Layer_on_Sour_Che
rry_Juice

Zhu, F., Sakulnak, R., y Wang, S. (2015). Effect of black tea on antioxidant, textural, and sensory properties of Chinese steamed bread. *Food Chemistry*, 194, 1217-1223. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.08.110

Zygadlo, J.A., Lamarque, A.L., Maestri, D.M., Guzman, C.A., Lucini, E.I., Grosso, N.R., Ariza Espinar, L., 1994. Volatile constituents of *Aloysia triphylla* (L'Herit.). *Britton Journal Essential Oil Research*, 6, 407–409. doi: 10.1080/10412905.1994.9698409

ANEXOS

ANEXO 1. Hojas secas para la preparación de las infusiones



ANEXO 2. Tratamiento térmico de las infusiones, previo a la inoculación con el SCOBY



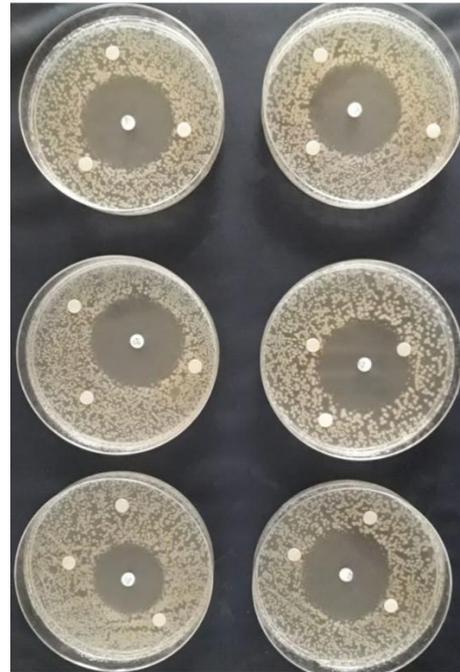
ANEXO 3. SCOBY utilizado como inóculo, y frasco con infusión en fermentación



ANEXO 4. Análisis sensorial (Prueba 1) para la selección de mezclas con mayor aceptabilidad sensorial



ANEXO 5. Análisis de capacidad antimicrobiana frente a *E. coli*



ANEXO 6. Formatos del análisis sensorial

NOMBRE:

EDAD:

FECHA:

PRUEBA 2: Marcar sobre cada línea de acuerdo con la percepción del atributo.

Ficha 1 – Aceptabilidad aromática	
M1	Me disgusta ————— Me encanta
M2	Me disgusta ————— Me encanta
M3	Me disgusta ————— Me encanta
M4	Me disgusta ————— Me encanta
M6	Me disgusta ————— Me encanta
M7	Me disgusta ————— Me encanta
M8	Me disgusta ————— Me encanta

Ficha 2 – Acidez	
M1	Bajo ————— Alto
M2	Bajo ————— Alto
M3	Bajo ————— Alto
M4	Bajo ————— Alto
M6	Bajo ————— Alto
M7	Bajo ————— Alto
M8	Bajo ————— Alto

Ficha 3 – Amargor

M1	_____	_____
	Bajo	Alto
M2	_____	_____
	Bajo	Alto
M3	_____	_____
	Bajo	Alto
M4	_____	_____
	Bajo	Alto
M6	_____	_____
	Bajo	Alto
M7	_____	_____
	Bajo	Alto
M8	_____	_____
	Bajo	Alto

Ficha 4 – Aceptabilidad global

M1	_____	_____
	Me disgusta	Me encanta
M2	_____	_____
	Me disgusta	Me encanta
M3	_____	_____
	Me disgusta	Me encanta
M4	_____	_____
	Me disgusta	Me encanta
M6	_____	_____
	Me disgusta	Me encanta
M7	_____	_____
	Me disgusta	Me encanta
M8	_____	_____
	Me disgusta	Me encanta

ANEXO 7. Formato de análisis sensorial

NOMBRE:

EDAD:

FECHA:

PRUEBA 2: Marcar sobre cada línea de acuerdo con la percepción de cada olor.

M1

Molle	_____	_____
	Bajo	Alto
Matico	_____	_____
	Bajo	Alto
Cedrón	_____	_____
	Bajo	Alto

M2

Molle	_____	_____
	Bajo	Alto
Matico	_____	_____
	Bajo	Alto
Cedrón	_____	_____
	Bajo	Alto

ANEXO 8. Análisis sensorial final

