



Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y
Diseño del Estado de Jalisco, A.C.



**“Resistencia de microorganismos aislados de kombucha a
condiciones del tracto gastrointestinal *in vitro*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**Maestra en Ciencias en Innovación Biotecnológica con opción
terminal de Tecnología Agroalimentaria**

PRESENTA

LCA Mónica Aidee Guzmán Ortiz

Directora: Dra. Claudia Alvarado Osuna

Codirectora: Dra. Anahí Jobeth Borrás Enriquez

Codirector: Dr. Juan Campos Guillen

Asesor: Dr. Manuel Reinhart Kirchmayr

Asesor: Dr. Jorge Luis González Escobar

Zapopan, Jalisco. Enero del 2021

JUNTA DIRECTIVA

Directora de tesis: Doctora Claudia Alvarado Osuna

Co-directora: Doctora Anahí Borrás Enriquez

Co-director: Doctor Juan Campos Guillen

Asesor: Doctor Manuel Reinhart Kirchmayr

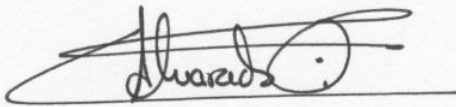
Asesor: Doctor Jorge Luis González Escobar

Guadalajara, Jalisco a 3 de Dic de 2020

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial del la estudiante **Mónica Aidee Guzmán Ortiz**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “RESISTENCIA DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE KOMBUCHA A CONDICIONES DEL TRACTO GASTROINTESTINAL IN VITRO” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por la estudiante para aspirar al grado de Maestra en ciencias en innovación biotecnológica con opción terminal en Tecnología Alimentaria durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 3 del mes de diciembre del año dos mil dieciséis.



Dra. Claudia Alvarado Osuna
Directora de tesis



Dra. Anahi Jobeth Borrás Enriquez
Co-directora de tesis



Dr. Juan Campos Guillén
Co-director de tesis



Dr. Manuel Reinhart Kirchmayr
Asesor



Dr. Jorge Luis González Escobar
Asesor



Guadalajara, Jalisco, a 17 de diciembre de 2020

CP/1571/2020

MÓNICA AIDEE GUZMÁN ORTIZ
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN
CIENCIAS EN INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA
NÚMERO DE MATRÍCULA 1803MB6425
PRESENTE

Por este medio le informo que el trabajo de tesis "**Resistencia de microorganismos aislados de kombucha a condiciones del tracto gastrointestinal in vitro**" desarrollado bajo la dirección del siguiente comité tutorial:

Dra. Claudia Alvarado Osuna. Directora de tesis
Dra. Anahí Jobeth Borrás Enríquez. Co-directora de tesis
Dr. Juan Campos Guillén Co-director de tesis
Dr. Manuel Reinhart Kirchmayr. Asesor
Dr. Jorge Luis González Escobar. Asesor

ha sido aprobado para su impresión definitiva y defensa correspondiente para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Innovación Biotecnológica.

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE


Mtra. Fátima Gabriela Ordóñez de la Cruz
Coordinadora de Posgrados



Av. Normalistas No. 800, Colinas de La Normal, CP. 44270, Guadalajara, Jal., México.
Tel: (33) 3345 5200 informes@ciatej.mx www.ciatej.mx



2020
LEONORA VICARIO
REPRESENTA MADRE DE LA PATRIA

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), institución que me brindó beca de manutención para llevar a cabo mis estudios de Maestría y la presente tesis.

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ), en donde se me brindó acceso a la infraestructura indispensable para el presente trabajo de investigación., así como el contacto con Investigadores de gran calidad humana y profesional quienes sin duda fortalecieron mi experiencia y aprendizaje.

A Casa Belot Co. empresa que inspiró el tema de investigación aquí plasmado. Gracias por la confianza y disponibilidad, por proveernos de muestras y compartir su conocimiento tan abiertamente con nosotras.

Gracias a mi tutora, la Doctora Claudia Alvarado Osuna, quien me guió con paciencia y compartió conmigo sus conocimientos, tiempo y confianza para que este proyecto se desarrollara con éxito. Gracias por la inspiración profesional y personal.

Esta tesis es un trabajo de equipo realizado con mi comité tutorial, la Dra. Anahí Borrás y los Doctores Juan Campos Guillen, Manuel Reinhart Kirchmayr y Jorge Luis González, quienes me apoyaron durante todo el proceso. Gracias por compartir sus saberes, por su accesibilidad y el tiempo dedicado que me brindaron para alcanzar este logro.

A mi padre, José Roberto Guzmán Burrola y a mi madre, Norma Aide Ortiz Santiesteban, mis grandes Maestros de vida, ejemplos de perseverancia y honestidad. Gracias por su amor incondicional. A mis hermanas y hermano, quienes siempre están acompañando mis pasos y que siempre van en mi corazón.

A Vaianu Bertin, padre de mi hija y amigo, por su acompañamiento en este proceso, por creer siempre en mí, por su amor, comprensión y paciencia. A Gaia, nuestra hija, quien es mi estrella polar, mi más grande inspiración y motivación, gracias.

A mis compañeros de maestría, quienes siempre creyeron en mí, que siempre estuvieron haciendo brillar mi proceso académico y personal. Gracias por el acompañamiento y por hacer de esta una experiencia preciosa.

A Arturo Moreno, quien con su amor y paciencia me ayudó a ver mi fuerza y a re-descubrir mi poder. Gracias por tu amor incondicional, por tu paciencia y tu confianza en mí.

Dedicatoria

El tiempo y esfuerzo invertidos y reflejados en este trabajo se los dedico a mi hija, Gaia, quien llena mi corazón de fuerza y amor para poder seguir mis sueños. Porque de todos mis Maestros y Maestras tú eres la más grande, de todos mis espejos eres el más claro y de todas mis creaciones eres la más divina. Espero ser fuente inagotable de inspiración como tu lo eres para mí.

Te amo.

I. ÍNDICE DE CONTENIDO

1. RESUMEN.....	13
2. INTRODUCCIÓN.....	15
3. ANTECEDENTES.....	17
3.1 Alimentos y bebidas funcionales.....	17
3.1.1 Clasificación.....	17
3.2 Probióticos.....	18
3.2.1 Viabilidad de probióticos a condiciones del TGI.....	19
3.2.1.1 Condiciones de la fase bucal.....	20
3.2.1.2 Condiciones de la fase gástrica.....	20
3.2.1.3 Condiciones de la fase intestinal.....	21
3.2.1.4 Características que mejoran la supervivencia de probióticos a condiciones del TGI.....	23
3.2.2 Mecanismos de acción de los probióticos.....	24
3.3 Kombucha.....	25
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	31
5. JUSTIFICACIÓN.....	32
6. HIPÓTESIS.....	33
7. OBJETIVOS.....	34
7.1 Objetivo general.....	34
7.2 Objetivos específicos.....	34
8. METODOLOGÍA.....	35
8.1 Esquema general de la metodología.....	35
8.2 Materiales.....	35
8.3 Métodos.....	37
8.3.1 Muestreo.....	37
8.3.2 Monitoreo ambiental y caracterización fisicoquímica.....	37
8.3.3 Análisis microbiológicos.....	37
8.3.3.1 Microbiología sanitaria.....	37
8.3.3.2 Identificación de microorganismos.....	37

8.3.3.3 Dinámica poblacional microbiana.....	39
8.3.4 Propiedades probióticas.....	39
8.3.4.1 Resistencia a condiciones del TGI <i>in vitro</i>	39
8.3.4.2 Formación de biopelícula en poliestireno.....	43
9. RESULTADOS.....	44
9.1 Monitoreo ambiental y caracterización fisicoquímica.....	44
9.2 Análisis microbiológicos.....	46
9.2.1 Microbiología sanitaria.....	46
9.2.2 Identificación de microorganismos.....	46
9.2.3 Dinámica poblacional.....	47
9.3 Propiedades probióticas.....	48
9.3.1 Resistencia de resistencia al TGI <i>in vitro</i>	48
9.3.1.1 Resistencia de levaduras a condiciones del TGI <i>in vitro</i>	49
9.3.1.2 Resistencia de bacterias a condiciones del TGI <i>in vitro</i>	52
9.3.2 Capacidad de formación de biopelícula.....	55
10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	57
10.1 Monitoreo ambiental y caracterización fisicoquímica.....	57
10.2 Microbiología sanitaria.....	58
10.3 Identificación de microorganismos.....	59
10.4 Dinámica poblacional microbiana.....	59
10.5 Resistencia a condiciones del TGI <i>in vitro</i>	61
10.5.1 Resistencia de levaduras a condiciones del TGI <i>in vitro</i>	61
10.5.2 Resistencia de bacterias a condiciones del TGI <i>in vitro</i>	64
10.6 Capacidad de formación de biopelícula.....	66
11. CONCLUSIONES.....	69
12. REFERENCIAS.....	70

II. ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Índice de cuadros

Cuadro 1	Microorganismos mayormente comercializados como probióticos.....	12
Cuadro 2	Concentraciones de electrolitos recomendadas para cada fase del TGI basadas en datos de humanos <i>in vivo</i>	13
Cuadro 3	Microorganismos que se han reportado presentes en kombucha y aquellos reconocidos como probióticos.....	18
Cuadro 4	Composición de los medios de cultivo para aislamiento de microorganismos de kombucha.....	24
Cuadro 5	Interpretaciones de scores obtenidos para la identificación de microorganismos de kombucha.....	26
Cuadro 6	Medios y condiciones de cultivo de microorganismos de kombucha	27
Cuadro 7	Composición de jugos simulados del TGI <i>in vitro</i>	28
Cuadro 8	Composición de las soluciones de electrolitos para la simulación de jugos del TGI <i>in vitro</i>	29
Cuadro 9	Calidad sanitaria de kombucha comercial.....	34
Cuadro 10	Aislamiento e identificación de microorganismos de kombucha.....	35
Cuadro 11	Microorganismos seleccionados para pruebas de resistencia al TGI <i>in vitro</i>	36
Cuadro 12	Porcentaje de supervivencia de levaduras a condiciones del TGI <i>in vitro</i>	38
Cuadro 13	Porcentaje de sobrevivencia de bacterias aisladas de kombucha a condiciones del TGI <i>in vitro</i>	41

Índice de figuras

Figura 1	Condiciones generales del TGI que pueden afectar la viabilidad de probióticos.....	13
Figura 2	Proceso de formación de biopelícula.....	14
Figura 3	Proceso de elaboración de kombucha a nivel industrial.....	17

Figura 4	Registros de temperatura y humedad ambientales durante 240 horas de fermentación.....	32
Figura 5	Comportamiento en la concentración de ácidos orgánicos y pH durante 240 horas de fermentación.....	33
Figura 6	Comportamiento de la concentración de azúcares reductores totales (ART) y °Brix durante 240 horas de fermentación.....	33
Figura 7	Dinámica de desarrollo durante 240 horas de fermentación de kombucha comercial.....	36
Figura 8	Comportamiento de la viabilidad de las levaduras durante la simulación del TGI <i>in vitro</i>	37
Figura 9	Comparación de la viabilidad de levaduras durante la simulación del TGI <i>in vitro</i> por fase.....	38
Figura 10	Porcentaje de reducción de viabilidad de levaduras a condiciones del TGI <i>in vitro</i> por fase de simulación.....	39
Figura 11	Comportamiento de la viabilidad de las bacterias durante la simulación del TGI <i>in vitro</i>	40
Figura 12	Comparación de la viabilidad de bacterias durante la simulación del TGI <i>in vitro</i> por fase.....	41
Figura 13	Porcentaje de reducción de viabilidad de bacterias a condiciones del TGI <i>in vitro</i> por fase de simulación.....	41
Figura 14	Formación de biopelícula por levaduras en microplaca de poliestireno..	43
Figura 15	Formación de biopelícula por BAL en microplaca de poliestireno.....	44
Figura 16	Formación de biopelícula por <i>S. hominis</i> en microplaca de poliestireno.	44

III. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Abreviatura/símbolo	Significado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APD	Agar papa dextrosa
ART	Azucres reductores totales
AT	Acidez titulable
BAA	Bacterias ácido acéticas
BAL	Bacterias ácido lácticas
BIF	Agar <i>Bifidobacterium</i>
BSH	Bile Salts Hydrolase
Ci	Cuenta inicial
Cf	Cuenta final
Cfb	Cuenta fase bucal
Cfg	Cuenta fase gástrica
Cfi	Cuenta fase intestinal
CV	Cristal violeta
D.O.	Densidad óptica
D.O.c.	Cut off de densidad óptica
EPS	Exopolisacáridos
g	Gramos
GYCA	Glucose yeast and chalk agar
h	Horas
HO	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>
HCl	Ácido clorhídrico
L	Litros
LF	<i>Lachancea fermentati</i>
LM	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
M	Molar
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption/ionization- Time of flight
mg	Miligramos
mL	Militros
MRS	Agar Man Rogosa and Sharpe
pH	Potencial de hidrógeno
PIAB	<i>Propionibacterium</i> agar
PM	<i>Pichia manshurica</i>
s. fan	Sobrevivencia de la fase anterior

SC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCOBY	Symbiotic consortium of bacteria and yeast.
SH	<i>Staphylococcus hominis</i>
SII	Síndrome de intestino irritable
TGI	Tracto gastrointestinal
U	Actividad enzimática
UFC	Unidades formadoras de colonia
WV	<i>Weisella viridiscens</i>
μL	Microlitro
μm	Micrometro
°C	Grados centígrados
°Brix	Grados Brix

1. RESUMEN

La kombucha es una bebida que ha ganado gran popularidad en los últimos años y que actualmente se comercializa con diversas marcas en México. Esta bebida es producida mediante la fermentación de una infusión azucarada de té (*Camellia sinensis*), la cual es inoculada con un consorcio simbiótico de bacterias y levaduras, denominado SCOBY (por sus siglas en inglés), el cual transfiere microorganismos potencialmente probióticos a la bebida. Los probióticos son microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades apropiadas confieren al huésped efectos saludables. Las condiciones del tracto gastrointestinal (TGI) pueden afectar la viabilidad de estos microorganismos, impidiendo que una cantidad adecuada llegue vivo al colon para ejercer los mecanismos del efecto benéfico. Por lo anterior, el objetivo de la presente tesis fue determinar la capacidad de resistencia a las condiciones del TGI de los microorganismos aislados en la kombucha producida a nivel industrial mediante una simulación continua *in vitro*, así como su habilidad de producir biopelícula.

Las características fisicoquímicas de la kombucha se monitorearon durante 240 horas (h) de fermentación. Al final de las 240 h de fermentación, la acidez titulable (AT) incrementó de 0.6 g/L a 1.9 g/L; el pH disminuyó de 4.1 a 3.0; la concentración de azúcares reductores totales (ART) decrementó de 8.82 g/100 mL a 4.22 g/100 mL; finalmente los °Brix disminuyeron de 12 a 5 °Brix.

Para conocer la calidad sanitaria de la kombucha al final de la fermentación se determinaron las concentraciones de mohos y levaduras, coliformes totales, fecales, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. La kombucha comercial estudiada tuvo una buena calidad sanitaria al presentar valores menores al límite de detección en grupos indicadores de contaminación fecal y ausencia de los patógenos analizados.

Se realizaron aislamiento y recuento de microorganismos de kombucha mediante sembrado en 6 diferentes agares. Se identificaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (SC), *Hanseniaspora opuntiae* (HO), *Lachancea fermentati* (LF), *Pichia manshurica* (PM), *Debaryomyces hansenii*, *Cryptococcus flavescens* así como las bacterias *Leuconostoc mesenteroides* (LM), *Weissella viridiscens* (WV), *Gluconobacter*

oxydans, *Staphylococcus hominis* (SH) y *Staphylococcus epidermis*. A las 240 h de fermentación las levaduras alcanzaron una concentración de 7 log (UFC/mL); las bacterias ácido-lácticas (BAL) de 6.69 log (UFC/mL) y las bacterias ácido-acéticas (BAA) de 6.02 log (UFC/mL).

Quince cepas fueron analizadas para conocer su capacidad de resistencia a las condiciones del TGI *in vitro* mediante la simulación de boca, estómago y colon. Las levaduras tuvieron un porcentaje de sobrevivencia entre 86.96 % y 95.61 %, siendo SC1, LF2 y HO2 las más resistentes; las bacterias fueron menos resistentes que las levaduras con porcentajes de sobrevivencia de 67.24 % a 88.26 %, siendo LM2 y LM3 las más resistentes. Con los datos obtenidos calculamos que una botella de 355 mL de la kombucha estudiada contiene aproximadamente 5.94×10^9 UFC de levaduras y 1.48×10^9 UFC de BAL capaces de llegar vivos al colon.

La capacidad de formar biopelícula puede darnos información sobre la capacidad de los microorganismos de colonizar y permanecer en el colon. Esta capacidad se analizó mediante un ensayo en microplaca de poliestireno por el método de tinción con cristal violeta al 0.1%. Las levaduras tuvieron mayor capacidad para formar biopelícula que las bacterias. Las levaduras PM1, SC3, HO1 y HO2 fueron fuertes productoras de biopelícula, SC2, LF2 y LF3 fueron moderadas productoras de biopelícula y SC1 fue débil productora. Todas las BAL estudiadas fueron débiles productoras de biopelícula, al igual que dos cepas de SH.

El presente trabajo de investigación demuestra que la kombucha en estudio contiene microorganismos en cantidad apropiada para hacer el uso correcto de la declaración de propiedad “contiene probióticos”. Además, la concentración de microorganismos aislados de kombucha que son capaces de sobrevivir a las condiciones del TGI *in vitro* soporta un potencial probiótico.

2. INTRODUCCIÓN

La kombucha es una bebida fermentada tradicional de China que ha ganado una gran popularidad en los últimos años debido a sus beneficios para la salud. En 2019, el valor de su mercado fue de 1,670 millones de dólares y se estima que para el 2027 alcanzará un valor de 7,050,000 millones de dólares con un tasa de crecimiento anual de 19.7% (GVR, 2020). El proceso de elaboración del té de kombucha se basa en la inoculación de un consorcio simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY) contenido dentro de una matriz de exopolisacáridos microbianos. La inoculación del SCOBY provoca la fermentación de una infusión de té (*Camellia sinensis*) azucarada generalmente con sacarosa, y transferirá algunos de los microorganismos inmersos en él a la bebida. Entre los microorganismos comunmente encontrados son levaduras de los géneros *Saccharomyces*, *Dekkra*, *Lachancea* y *Hanseniaspora*, y bacterias de los géneros *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Oenococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Propionibacterium* (Coton *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 1996; Marsh *et al.*, 2013). Algunas especies de *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Saccharomyces* aislados de fuentes diferentes a la kombucha han sido ampliamente estudiadas por sus propiedades probióticas (Castro *et al.*, 2019; Gómez *et al.*, 2016; Kumura *et al.*, 2004; Lee & Kim, 2019; Nayak, 2011). Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se proporcionan en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del huésped (FAO & OMS, 2006). Estos microorganismos benéficos pueden estar contenidos en alimentos y bebidas. En bebidas comerciales se requiere una concentración de 1×10^6 a 1×10^9 UFC/porción de cepas probióticas para hacer un uso correcto a la declaración de propiedad "contiene probióticos". Esta concentración es requerida debido a que la viabilidad de los microorganismos puede verse afectada durante su paso por el tracto gastrointestinal (TGI), en donde se enfrentan a ambientes hostiles como cambios drásticos de pH, presencia de enzimas y sales biliares.

La capacidad de producir biopelícula es una propiedad deseable en un probiótico, debido a que se ha comprobado esta característica podría mejorar la sobrevivencia del microorganismo a las condiciones del TGI. Además, se ha demostrado que la biopelícula producida por algunos probióticos poseen propiedades inmunomoduladoras y la habilidad de inhibir el crecimiento de patógenos (Aoudia, 2016). Es por ello, que el objetivo de este estudio fue determinar la capacidad

de resistencia a las condiciones del TGI de los microorganismos aislados en la kombucha producida a nivel industrial mediante una simulación continua *in vitro*, así como su habilidad de producir biopelícula.

3. ANTECEDENTES

3.1 Alimentos y bebidas funcionales

Un alimento funcional es aquel que, al ser consumido en una cantidad habitual referente a una dieta, brinda un efecto benéfico relevante a la salud y/o riesgo de enfermedad. La funcionalidad de un alimento se puede lograr mediante la adición, remoción o modificación de uno o más de sus componentes y puede aplicarse a todos los miembros de una población o a poblaciones específicas (FUFOSE *et al.*, 2018). La primera evidencia escrita del uso de alimentos y bebidas funcionales se remonta al 1000 a.C. en China. En la literatura de la dinastía Han se refería comúnmente a los “alimentos medicina” (100 a.C.) y más recientemente, cerca del 1000 d.C. la dinastía Song los menciona como “alimentos especiales” (Tur & Bibiloni, 2016). Sin tener un concepto definido, el ser humano era consciente de los beneficios a la salud que brindaban algunos alimentos y bebidas fermentadas. Ejemplos de bebidas fermentadas con potencial probiótico son el tepache y pulque en México; el fermento de soja en Indonesia, el Kvas de Rusia, el kimchi coreano, el nato en Japón y el chucrut, la pasta miso y la kombucha en China. En los años ochenta, Japón se vuelve pionero en investigación y desarrollo de alimentos funcionales al fundar 86 programas bajo los temas “*Systematic analysis and development of food functions*”, “*Analysis of physiological regulation function of food*” y “*Analysis of functional foods and molecular design*”. Actualmente, el término japonés que incluye los diferentes tipos de alimentos que coadyuvan al bienestar humano es FOSHU: Food for Specified Health Use. Los alimentos FOSHU deben tener un sólido respaldo sobre su efectividad y seguridad; no debe contener en exceso ingredientes que afecten negativamente a la salud, como sal o azúcar (FUFOSE *et al.*, 2018).

3.1.1 Clasificación

Los alimentos funcionales pueden ser clasificados bajo varios criterios y un alimento puede cumplir uno o más de uno de estos. Los alimentos y bebidas funcionales pueden clasificarse de la siguiente manera:

- a) Tipo de alimento (lácteos, bebidas y cereales)
- b) Tipo de enfermedad que se espere prevenga o cure (diabetes, cáncer y colitis)

- c) Su efecto fisiológico (actividad antioxidante, digestibilidad y actividad anti-tumor)
- d) La categoría del compuesto bioactivo:
 - Compuestos orgánicos (vitaminas, antioxidantes, lípidos y prebióticos)
 - Compuestos inorgánicos (minerales)
 - Microorganismos (probióticos)
- e) Proceso de producción (fermentado, encapsulado y congelado)

3.2 Probióticos

En el siglo XX, Eli Metchnikoff notó que en las regiones de Bulgaria se consumían leches fermentadas más de lo habitual y relacionó este hecho con el incremento de la longevidad. Los trabajos de Metchnikoff fueron premiados con el Nobel de fisiología o medicina en 1908. Por su lado, Henry Tissier en 1906 observó que en la microbiota en heces de niños sanos se encontraban abundantes microorganismos, que hoy conocemos como *bifidobacterias*, mientras en niños enfermos estas eran escasas. Los conocimientos generados por ambos científicos, así como los de Fuller, Guarner y Schaafsma fueron fundamentales para la construcción del concepto de probióticos. La palabra probiótico fue acuñada en 1960 y significa “a favor de la vida” y hace referencia a “microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades apropiadas, confieren al huésped efectos saludables” (FAO & OMS, 2006). De este concepto se pueden enfatizar tres características fundamentales: la viabilidad de los microorganismos, su cantidad de consumo y el beneficio que proveen al huésped. En México no existe normatividad que regule parámetros específicos para la producción y comercialización de probióticos, ni en presentaciones farmacéuticas ni en alimentos y bebidas. Por otro lado, existe mucha información científica nacional e internacional, así como regulatoria internacional que da pautas para dirigir el presente trabajo. En el cuadro 1 se muestran algunas de las cepas que actualmente son más comercializadas como probióticas.

Cuadro 1. Microorganismos mayormente comercializados como probióticos

Grupo de microorganismo	Género y especie
Bifidobacterias	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. animalis</i> subsp. <i>Lactis</i> (Bb12), <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> , <i>B. longum</i> subsp. <i>Longum</i> (BB536).
Lactobacilos	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (La5), <i>L. casei</i> (Shirota), <i>L. 'caucasicus'</i> = <i>L. kefir</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. fermentum</i> (KLD), <i>L. gallinarum</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. johnsoni</i> (La1), <i>L. leichmanii</i> = <i>delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. paracasei</i> (F19), <i>L. plantarum</i> (299v), <i>L. reuteri</i> (SD2112), <i>L. rhamnosus</i> (GG), <i>L. sakei</i> , <i>L. salivarius</i> (UCC118), <i>L. sporogenes</i> = <i>Bacillus coagulans</i>).
Otras bacterias ácido lácticas	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i> (SF68), <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc. mesenteroides</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>S. macedonicus</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S thermophilu</i> .
Bacilos	<i>Bacillus cereus</i> (toyoi), <i>B. clausii</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. mesentericus</i> , <i>B. subtilis</i> .
Otras bacterias	<i>Clostridium butyricum</i> , <i>Escherichia coli</i> (Nissle1917), <i>Propionibacterium freudenreichii</i> .
Levaduras	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> subsp. <i>cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> subsp. <i>Boulardii</i> .

(Foligné, Daniel & Pot, 2013; Ouwehand, Salminen & Isolauri, 2002).

3.2.1 Viabilidad de probióticos y condiciones del TGI

Una de las principales características que debe tener un probiótico es la de ser capaz de sobrevivir a las condiciones del TGI hasta su llegada al órgano que está destinado. Existen probióticos destinados a la salud bucal, por lo que estos solo tendrán que ser capaces de vivir a las condiciones ahí encontradas. En el caso de alimentos y bebidas, se pretende que el beneficio se dé en estómago o colon, por lo que los probióticos deben ser capaces de sobrevivir a las condiciones de estos compartimentos y de permanecer el tiempo suficiente para ejercer el/los mecanismo(s)

de acción. En la figura 1 se resumen las condiciones generales del TGI y en el cuadro 2 se especifica la composición de sales en los jugos digestivos.

3.2.1.1 Condiciones de la fase bucal

La digestión de los alimentos comienza en la boca con un proceso mecánico llamado masticación el cual ocurre simultáneamente a la digestión química (acción de enzimas) (Minekus *et al.*, 2014). La masticación permite la trituración de los alimentos aumentando la superficie de contacto con la saliva y potenciando la digestión química. Las glándulas salivales secretan saliva compuesta por un 99.5% de agua, electrolitos, mucus y amilasa salival, enzima que degrada parcialmente el almidón y se deglute junto con el bolo (Mataix, 2005). La amilasa salival tiene un pH óptimo de actividad de 6.8, por lo que ésta es inhibida durante la etapa temprana de digestión en el estómago en donde el pH se encuentra entre 2 y 3. El tiempo ideal de masticación es de 5 minutos pero normalmente es de 2 minutos para alimentos sólidos, siendo para bebidas el tiempo de permanencia en boca insignificante (Minekus *et al.*, 2014). La mezcla resultante de la digestión bucal es el bolo.

3.2.1.2 Condiciones de la fase gástrica

En el estómago el bolo y todos sus componentes, incluidos los microorganismos, se enfrentan a un medio ácido (pH de 2-3) provocado por la secreción de ácido clorhídrico. La acidez del estómago es la primera defensa contra microorganismos patógenos provenientes de alimentos (Waterman, 1998). Por su lado, algunos microorganismos son capaces de llevar a cabo mecanismos que les permiten sobrevivir a la acidez del estómago. Un ejemplo es el patógeno *Helicobacter pylori*, causante de la gastritis, que es capaz de producir ureasa para degradar la urea a amonio y dióxido de carbono neutralizando los ácidos. Este mecanismo de sobrevivencia puede ser contrarrestado por algunas bacterias ácido-lácticas probióticas capaces de producir suficiente ácido láctico potenciando la acidificación del medio e inhibiendo la actividad de la ureasa, así como la proliferación de *H. pylori* (Komatsu *et al.*, 2016). El pH del estómago permite que el pepsinógeno se active convirtiéndose en pepsina, enzima que lleva a cabo la degradación de las proteínas (Mataix, 2005). La concentración de pepsina en el estómago durante la ingesta de alimentos es de 0.5 – 1.0 mg/mL, concentración que puede afectar algunas proteínas de la membrana celular y por ende la viabilidad de los microorganismos (Zhu *et al.*, 2006). En un

estado de salud, los líquidos permanecen en el estómago entre 0.5 a 1 hora dependiendo de su composición. La mezcla resultante de la digestión gástrica es el quimo.

3.2.1.3 Condiciones de la fase intestinal

Luego del ambiente ácido del estómago, las proteínas y carbohidratos han sido parcialmente digeridos. En el intestino delgado una serie de contracciones musculares mezclan el quimo con las secreciones intestinales en donde es neutralizado por la acción de carbonato, cambiando el pH a 6.5 – 7.5 (Mataix, 2005; Minekus *et al.*, 2014). Los ácidos biliares son moléculas anfipáticas derivadas del colesterol y producidas en el hígado, de donde son secretadas en sus formas conjugadas (unidos a un aminoácido) hacia la vesícula biliar para su almacenamiento. Desde la vesícula biliar, son secretados al interior del intestino delgado para realizar la digestión de lípidos y ayudar en la absorción de los productos de digestión. La bilis emulsiona la grasa para facilitar su digestión y tiene una fuerte actividad antimicrobiana, ya que provoca la desintegración de la membrana lipídica y causa daño en el ADN. Algunos microorganismos probióticos (p. ej. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*), así como patógenos y oportunistas (p. ej. *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* y *Zanthomonas maltophilia*) son capaces de hidrolizar sales biliares mediante la producción de la enzima BSH (por sus siglas en inglés: *Bile Salts Hydrolase*) aumentando su capacidad de sobrevivencia en el intestino (Pavlovic *et al.*, 2012). El jugo pancreático, compuesto por una mezcla de enzimas, terminan la digestión de proteínas, lípidos y almidón (Mataix, 2005).

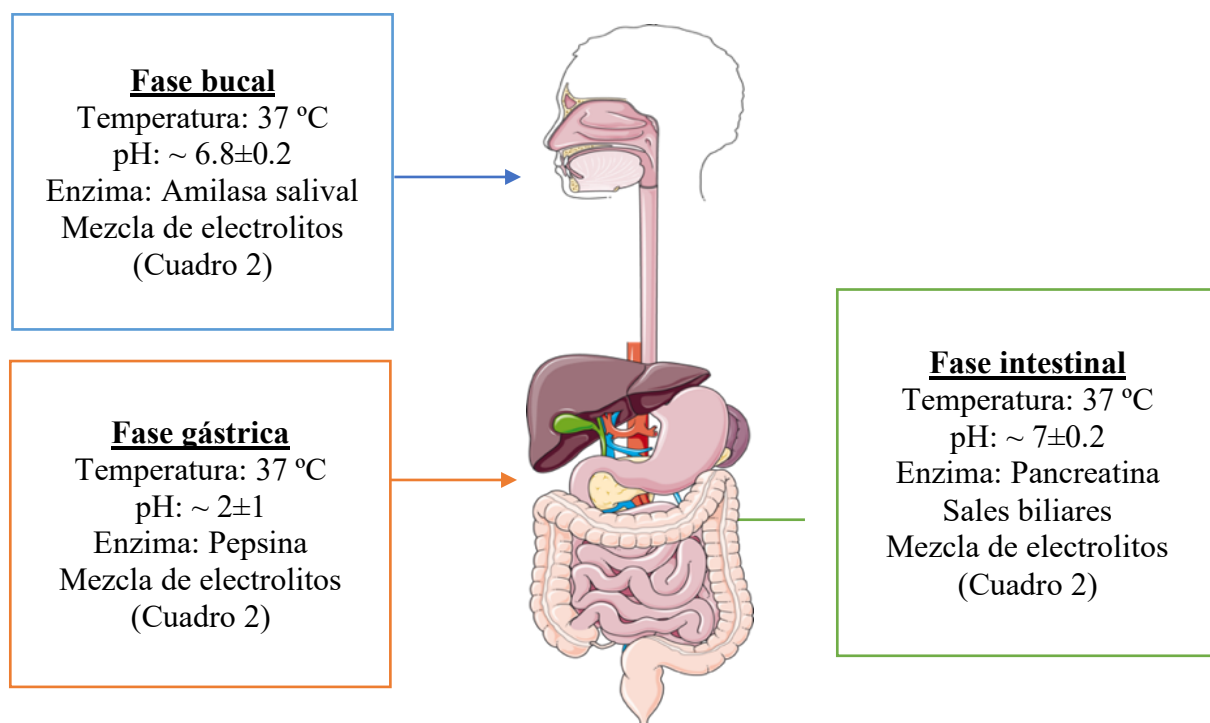


Figura 1. Condiciones generales del TGI que pueden afectar la viabilidad de probióticos.

Cuadro 2. Concentraciones de electrolitos recomendadas para cada fase del TGI basadas en datos de humanos *in vivo*

Componente	Fase bucal (mmol/L)	Fase gástrica (mmol/L)	Fase intestinal (mmol/L)
K⁺	18.8	7.8	7.6
Na⁺	13.6	72.2	123.4
Cl⁻	19.5	70.2	55.5
H₂PO₄⁻	3.7	0.9	0.8
HCO₃⁻, CO₃²⁻	13.7	25.5	85
Mg²⁺	0.15	0.1	0.33
NH₄⁺	0.12	1.0	-
Ca²⁺	1.5	0.15	0.6

Modificado de Minekus *et al.*, 2014

3.2.1.4 Características que mejoran la supervivencia de probióticos a condiciones del TGI

Con el objetivo de protegerse de condiciones adversas y distribuir nutrientes y oxígeno, algunos microorganismos tienen la capacidad de formar biopelículas, “comunidades estructuradas de células bacterianas inmersas en una matriz polimérica auto-producida y adherida a una superficie inerte o viva” (Costerton & Greenberg, 1999; Martínez *et al.*, 2018). Esta matriz polimérica está compuesta principalmente por exopolisacáridos (EPS) (Donlan, 2002). Los EPS forman una red tridimensional que permite la distribución de nutrientes, oxígeno y agua a microorganismos que se encuentran organizados y separados por canales o vacíos intersticiales (Lewandowski *et al.*, 1995). El proceso de formación de biopelícula se lleva a cabo en las siguientes 5 etapas:

- 1- Adherencia inicial
- 2- Adherencia irreversible (formación de EPS)
- 3- Formación de micro-colonias
- 4- Maduración
- 5- Dispersión

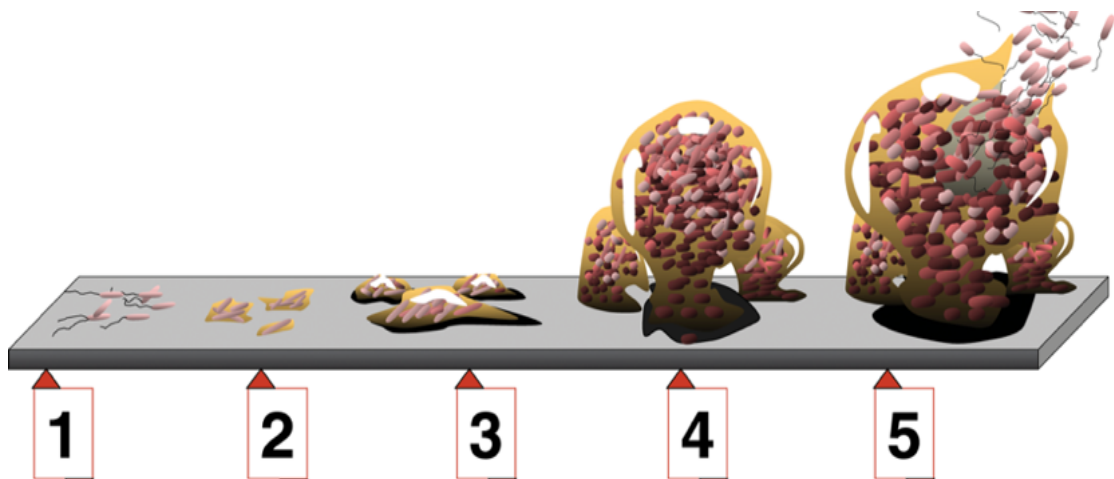


Figura 2. Proceso de formación de biopelícula (tomado de Monroe, 2007).

Estudios han sugerido que la capacidad fenotípica para producir biopelícula puede ser una característica a tener en cuenta al momento de seleccionar probióticos (Aoudia *et al.*, 2016) debido a que puede estimular la colonización y aumentar la permanencia de las bacterias benéficas en la mucosa del hospedero (Terraf *et al.*, 2012). Además, Yahav *et al.* (2018) demostraron que la biopelícula de exopolisacáridos formada por *Bacillus subtilis* puede proteger a probióticos durante su paso por el TGI mejorando su sobrevivencia hasta llegar al colon.

En la etapa temprana de formación de biopelícula se lleva a cabo la adherencia, proceso que está involucrado en la adhesión de los microorganismos a las células epiteliales y que involucra mecanismos no específicos y específicos. Las fuerzas físicas de atracción y repulsión (interacciones electrostáticas y de van der Waals) son mecanismos no específicos que impactan directamente en la hidrofobicidad de la superficie celular y con ello en la capacidad de adhesión. (Kos *et al.*, 2003). La capacidad de adhesión de los probióticos se ha relacionado con su mecanismo de acción contra patógenos por inhibición competitiva de los receptores o impedimento estérico (Tuomola, Ouwehand, & Salminen, 1999).

3.2.2 Mecanismos de acción de probióticos

La Asociación Mexicana de Gastroenterología, en concordancia con la ISAPP (*International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics*), menciona que para que un alimento o bebida pueda hacer uso adecuado de la declaración de propiedad “*contiene probióticos*”, su contenido de cepas bacterianas reconocidas como probióticos debe ser de al menos $1 \times 10^{6-9}$ UFC por porción (Valdovinos *et al.*, 2017). Los mecanismos mediante los cuales los probióticos ejercen un efecto benéfico a la salud del hospedero son diversos. Entre los más destacados se encuentran la producción de sustancias que impiden el crecimiento de microorganismos no deseados o patógenos y la modulación del sistema inmunitario (FAO & OMS, 2006). Además, se ha relacionado la capacidad de adhesión de los probióticos a las células epiteliales con su mecanismo de acción contra patógenos por inhibición competitiva de los receptores o impedimento estérico (Tuomola *et al.*, 1999). Se recomienda el uso de probióticos (cepas específicas) en población adulta para reducir significativamente diarrea asociada a antibióticos y aguda infecciosa; como tratamiento contra *H. pylori*; para evitar el estreñimiento crónico; en la reducción de síntomas provocados por SII (distensión, dolor abdominal y flatulencia); como

tratamiento contra intolerancia a la lactosa; en el mantenimiento de la remisión de la pouchitis después del tratamiento con antibióticos; prevención de infección por *Clostridium difficile*; prevención de enterocolitis necrosante en niños prematuros; se sugiere su uso en pacientes con esteatohepatitis y esteatohepatitis no alcohólica para mejorar la inflamación hepática y resistencia a la insulina; su uso en el tratamiento de encefalopatía hepática oculta y manifiesta, entre otros (Valdovinos *et al.*, 2017). Los mecanismos de acción son específicos para cada cepa y deben ser comprobados.

3.3 Kombucha

La kombucha es una bebida probiótica elaborada mediante la fermentación de la infusión azucarada de té *Camellia sinensis*. La fermentación es iniciada por inoculación de una biopelícula que contiene un consorcio simbiótico de bacterias y levaduras llamado “SCOBY”: *Symbiotic Consortium Of Bacteria and Yeast*. Su aprovechamiento como bebida curativa se remonta hacia el año 221 a.C, en China en donde era apreciada por la dinastía Qin, posteriormente, en el año 414 d.C., el Doctor Kombu lleva la bebida a Japón. Conforme se fueron abriendo las rutas comerciales, la kombucha llega a Rusia y durante el siglo XX es introducida a Alemania, Francia, norte de África e Italia. Es en Italia que alcanza una gran popularidad en consumo aproximadamente en el año 1950 (Jayabalan *et al.*, 2014). En Estados Unidos se comienza a producir de forma casera y en 1995 se funda la primera empresa familiar de kombucha bajo la marca GT, que distribuye kombucha en tiendas locales de productos saludables. En 2019 el valor de mercado global de kombucha fue de 1,670 millones de dólares y se espera aumente a 7,050 millones de dólares para el 2027 con una tasa de crecimiento anual de 19.7% (GVR, 2020). En México, se ha observado un surgimiento importante de empresas dedicadas a la producción de esta bebida. Hasta ahora se han identificado 13 marcas de kombucha y en Guadalajara cerca de 70 puntos de venta.

El proceso de producción de kombucha (Figura 3) inicia con la elaboración de una infusión de té negro y/o verde. La fermentación de la infusión azucarada da inicio con la inoculación del SCOBY y de un inóculo líquido. El inóculo líquido es una reserva, porción de un lote anterior de kombucha terminada, sin saborización y conservada en refrigeración. Los microorganismos adicionados con las inoculaciones comienzan a metabolizar los sustratos del té endulzado, dando

lugar a fermentaciones de tipo alcohólica, láctica y acética. Se ha visto que el consumo de la fuente de carbono incrementa linealmente durante la fermentación de la kombucha y de forma paralela se forman celulosa, ácido acético y etanol (Kallel *et al.*, 2012). Las levaduras llevan a cabo la hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa mediante la enzima invertasa. Posteriormente, ambos monosacáridos pueden ser utilizados como sustratos en la glucólisis produciendo piruvato, el cual durante la fermentación alcohólica es convertido a acetaldehído y luego a etanol por la enzima alcohol deshidrogenasa. Este proceso libera moléculas de CO₂ que se acumulan en el medio dando lugar a una bebida carbonatada. Otra parte de estos monosacáridos es utilizada para la producción de ácidos orgánicos y la biosíntesis de celulosa. La producción de ácidos disminuye el pH del medio permitiendo que las bacterias ácido-tolerantes se vuelven más abundantes. Las bacterias ácido acéticas (BAA) con capaces de transformar fructosa y etanol en ácido acético mediante la oxidación del etanol durante la fermentación acética en presencia de O₂. Algunos estudios han reportado la presencia de bacterias ácido-lácticas (BAL), las cuales pueden producir ácido láctico a partir del piruvato por medio de una lactato deshidrogenasa (Bergström, 2018; Chen y Liu, 2000; Kallel *et al.*, 2012).

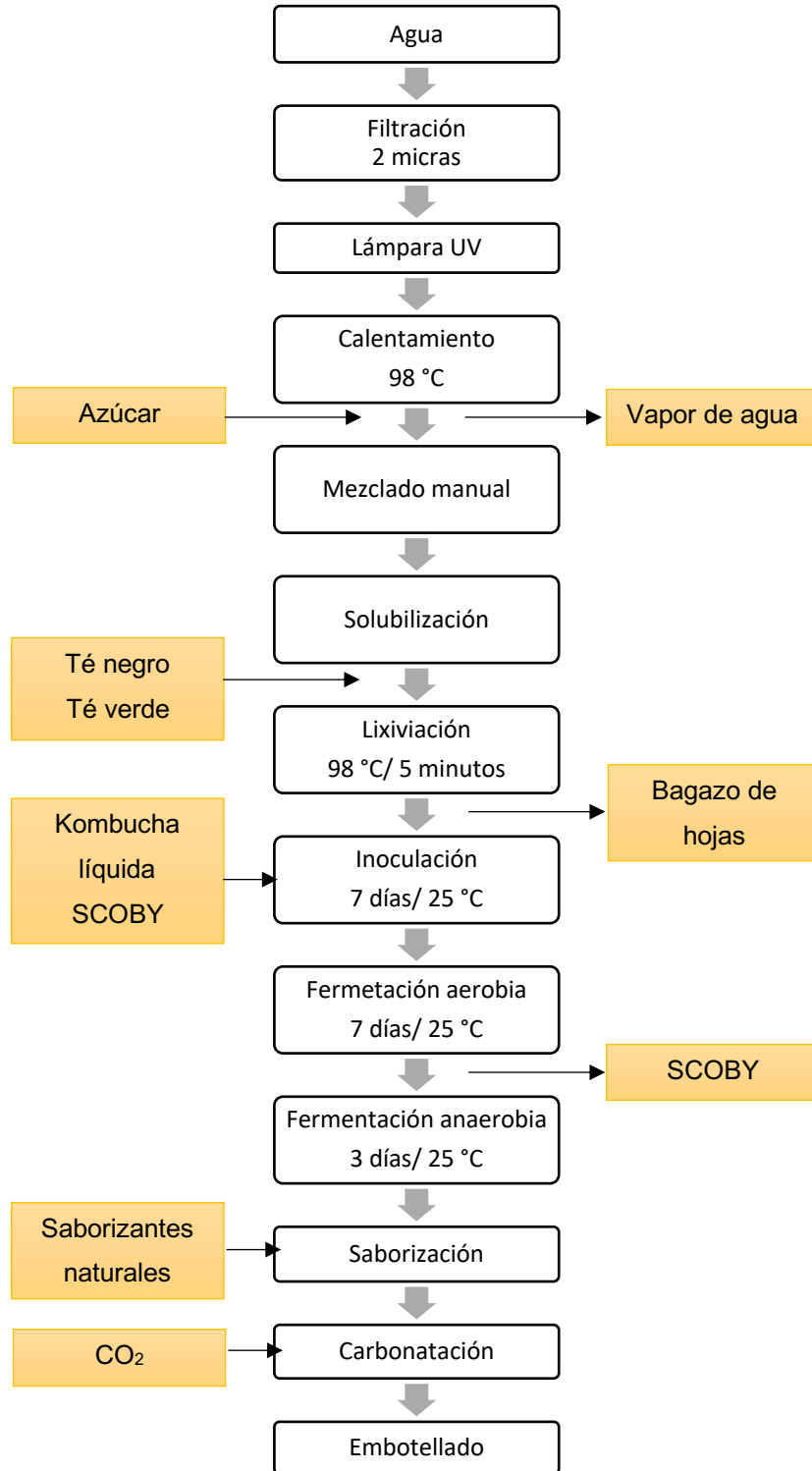


Figura 3. Proceso de elaboración de kombucha a nivel industrial.

Diversos estudios basados tanto en cultivos microbianos como en técnicas moleculares se han realizado para identificar la microbiota de la kombucha. La mayoría de estos estudios se han hecho en kombucha producida en laboratorio y se encontró solo un estudio que analizó la microbiota de kombucha de producción a nivel industrial (Coton *et al.*, 2017). En el cuadro 3 se enlistan los microorganismos comúnmente encontrados en la bebida y además se presenta la información sobre la capacidad probiótica de estas cepas de bacterias y levaduras aisladas de otras fuentes.

Cuadro 3. Microorganismos que se han reportado presentes en kombucha y aquellos reconocidos como probióticos.

Microorganismo	Presencia en kombucha	Capacidad probiótica reportada
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> sp.	Marsh <i>et al.</i> , 2014	Sí, aislada de granos de kefir (Xing <i>et al.</i> , 2017)
<i>Lactobacillus nagelii</i>	Coton <i>et al.</i> , 2017	No reportado
<i>Lactobacillus satsumensis</i>	Coton <i>et al.</i> , 2017	No reportado
<i>Leuconostoc</i>	Marsh <i>et al.</i> , 2014	<i>L. mesenteroides</i> aislados de de aguamiel, pulque y kimchi (Castro <i>et al.</i> , 2019; Giles <i>et al.</i> , 2016; Lee y Kim, 2019)
<i>Leutococcus</i>	Marsh <i>et al.</i> , 2014	No reportado
<i>Bifidobacterium</i>	Marsh <i>et al.</i> , 2014	Sí. Aislados de heces de infantes, nieve y cepa comercial. <i>B. bifidum</i> , <i>B. lactis</i> comercial (Chenoll <i>et al.</i> , 2011; Hekmat & McMahon, 1992; Invernici <i>et al.</i> , 2018)
<i>Propionibacterium</i>	Marsh <i>et al.</i> , 2014	Sí. Cepas comerciales, leche bronca y quesos (Chaia, Zárata, & Oliver, 1999; Huang & Adams, 2004)
<i>Oneococcus oeni</i>	Coton <i>et al.</i> , 2017	No reportado

<i>Acetobacter</i> sp.	Hesseltine 1965; Sievers <i>et al.</i> , 1995	No reportado
<i>Acetobacter aceti</i>	Sievers <i>et al.</i> , 1995	No reportado
<i>Acetobacter intermedius</i> , sp. nov	Boesch <i>et al.</i> , 1998	No reportado
<i>Acetobacter lovaniensis</i>	Coton <i>et al.</i> , 2017	No reportado
<i>Acetobacter</i> <i>nitrogenifigens</i>	Dutta & Gachhui, 2006	No reportado
<i>Acetobacter okinawensis</i>	Coton <i>et al.</i> , 2017	No reportado
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	Liu <i>et al.</i> , 1996; Sievers <i>et al.</i> , 1995	No reportado
<i>Acetobacter peroxydans</i>	Coton <i>et al.</i> , 2017	No reportado
<i>Acetobacter syzgil</i>	Coton <i>et al.</i> , 2017	No reportado
<i>Acetobacter tropicallis</i>	Coton <i>et al.</i> , 2017	No reportado
<i>Gluconoacetobacter</i> <i>europaeus</i>	Coton <i>et al.</i> , 2017	No reportado
<i>Gluconoacetobacter</i> <i>hansenii</i>	Coton <i>et al.</i> , 2017	No reportado
<i>Gluconoacetobacter</i> <i>liquefaciens</i>	Coton <i>et al.</i> , 2017	No reportado
<i>Gluconoacetobacter</i> <i>rhaeticus</i>	Coton <i>et al.</i> , 2017	No reportado
<i>Gluconoacetobacter</i> <i>saccharivorans</i>	Coton <i>et al.</i> , 2017	No reportado
<i>Gluconobacter cerinus</i>	Coton <i>et al.</i> , 2017	No reportado
<i>Gluconoacetobacter</i> <i>liquefaciens</i>	Coton <i>et al.</i> , 2017	No reportado
<i>Gluconobacter oxydans</i>	Coton <i>et al.</i> , 2017	No reportado
<i>Komagataeibacter</i> <i>xylinus</i>	Marsh <i>et al.</i> , 2014; Sievers <i>et al.</i> , 1995	No reportado

<i>Tantichaeroenia sakaeratensis</i>	Coton <i>et al.</i> , 2017	No reportado
<i>Allobaculum</i>	Marsh <i>et al.</i> , 2014	No reportado
<i>Candida boidinii</i>	Coton <i>et al.</i> , 2017	No reportado
<i>Dekkera bruxellensis</i>	Marsh <i>et al.</i> , 2014	No reportado
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Marsh <i>et al.</i> , 2014	No reportado
<i>Lachancea fermentati</i>	Marsh <i>et al.</i> , 2014; Chakravorty <i>et al.</i> , 2016	No reportado
<i>Pichia</i>	Marsh <i>et al.</i> , 2014	No reportado
<i>Saccharimycodes ludwiggi</i>	Sinisa <i>et al.</i> , 2001	No reportado
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Liu <i>et al.</i> , 1996; Sinisa <i>et al.</i> , 2001	Sí. Aisladas de fruta, queso azul y cepas comerciales (Fakruddin <i>et al.</i> , 2017; Kumura <i>et al.</i> , 2004; van der Aa Kühle <i>et al.</i> , 2005)
<i>Saccharomyces bisporus</i>	Sinisa <i>et al.</i> , 2001	No reportado
<i>Saccharomyces uvarum</i>	Coton <i>et al.</i> , 2017	No reportado
<i>Torulopsis sp</i>	Sinisa <i>et al.</i> , 2001	No reportado
<i>Wallemia sebi</i>	Marsh <i>et al.</i> , 2014	No reportado
<i>Hanseniaspora</i>	Marsh <i>et al.</i> , 2014	No reportado

Para determinar si un microorganismo es capaz de sobrevivir a estas condiciones, se han llevado a cabo estudios con métodos *in vitro*, continuos y discontinuos. En microorganismos aislados de kombucha se han realizados experimentos de resistencia a pH ácido y presencia de sales biliares con modelos discontinuos (Bogdan *et al.*, 2018; Puspawati & Arihanatana, 2016). Sin embargo, debido a que en condiciones fisiológicas el sistema digestivo es continuo, se considera que estos experimentos tienen limitaciones metodológicas y los resultados pueden ser difícilmente extrapolados a la realidad.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México existe un constante surgimiento de nuevas empresas, generalmente artesanales, dedicadas a la elaboración y comercialización de kombucha a nivel local. Una de las estrategias mercadotécnicas que ha impulsado el crecimiento de la industria de la kombucha es su comercialización como bebida fermentada, no pasteurizada (viva) y probiótica. Sin embargo, los estudios científicos hasta ahora realizados sobre el potencial probiótico responden a las características de kombucha producida en laboratorio, haciendo que los resultados sean difícilmente extrapolables a la realidad de producción a mayor escala. En este contexto, es claro que crear y fortalecer vínculos entre la industria local de kombucha en desarrollo y la comunidad científica es fundamental. De esta forma se facilitará la realización de estudios científicos que verifiquen dicha propiedad en la marca de kombucha que se pretende posicionar como probiótica. Esto, además de respaldar las estrategias de mercadotecnia, brindará información clara y verdadera al consumidor y aumentará su confianza en la marca.

5. JUSTIFICACIÓN

La presencia de probióticos es una de las características que proporciona mayor valor agregado a la kombucha comercial. El contenido de microorganismos vivos en una bebida fermentada no garantiza el contenido de probióticos ni su efecto positivo a la salud de quien lo consume. La funcionalidad probiótica de la kombucha se define por la cantidad de microorganismos contenidos en ella que son capaces de llegar vivos al colon y que pueden ejercer los mecanismos necesarios para proveer un efecto positivo a la salud del hospedero. Para que los microorganismos lleguen vivos al colon, estos deben ser capaces de sobrevivir las condiciones fisiológicas de la boca, el estómago y el intestino, es decir, al TGI. En el TGI, todo alimento, bebida y sus componentes -incluidos los microorganismos- se enfrentan con amplios rangos de pH (acidez y alcalinidad), presencia de enzimas y de sales biliares. En esto radica la importancia de realizar pruebas científicas que permitan generar información sobre la capacidad de sobrevivencia al TGI de microorganismos de kombucha.

6. HIPÓTESIS

La bebida de kombucha comercial contiene microorganismos capaces de sobrevivir a las condiciones del TGI simuladas *in vitro* y de producir biopelícula.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

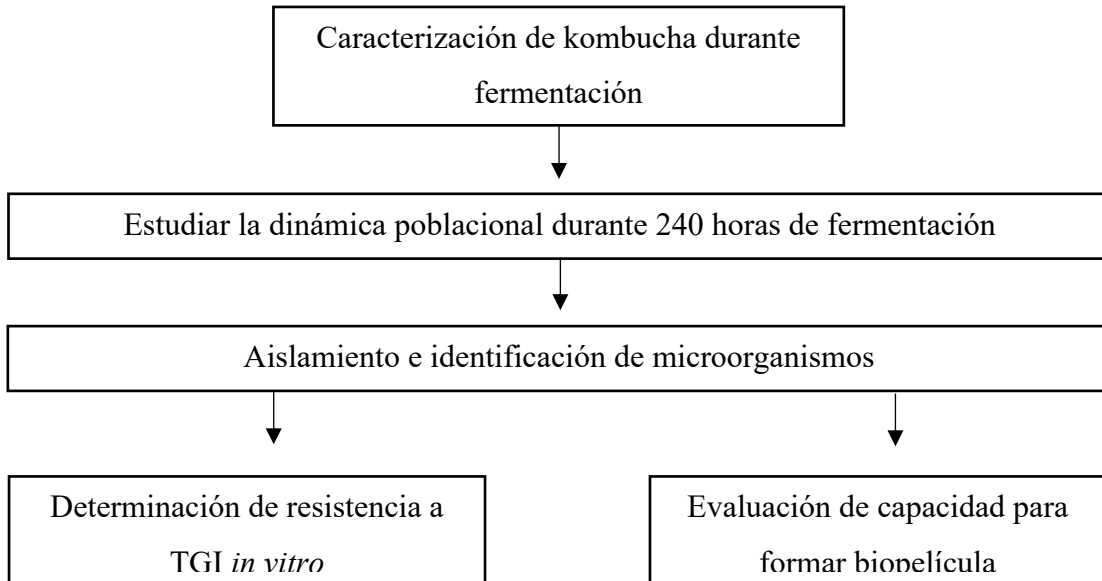
Determinar la capacidad de resistencia a las condiciones del TGI de los microorganismos aislados en la kombucha producida a nivel industrial mediante una simulación continua *in vitro*, así como su habilidad de producir biopelícula.

7.2 Objetivos específicos.

1. Monitorear las características fisicoquímicas y condiciones ambientales durante la fermentación de kombucha.
2. Analizar la dinámica de poblaciones microbianas de kombucha durante su fermentación.
3. Conocer la calidad sanitaria de la kombucha comercial en estudio.
4. Aislar e identificar microorganismos de kombucha con potencial capacidad probiótica.
5. Estudiar la capacidad de resistencia de aislados de kombucha seleccionados a condiciones simuladas continuas del TGI *in vitro*.
6. Evaluar la capacidad de formar biopelícula de una selección de microorganismos aislados de kombucha.

8. METODOLOGÍA

8.1 Esquema general de la metodología



8.2 Materiales

El té de kombucha se obtuvo de una empresa local en Guadalajara, Jalisco, México. Para el cultivo de microorganismos se utilizaron los siguientes medios de cultivos, Agar Papa Dextrosa (APD) de la marca DIFCO; Man Rogosa and Sharpe (MRS) de Sigma-Aldrich. Tres de los agares utilizados se elaboraron en el laboratorio: Glucose Yeast Chalk Agar (GYCA); Bifidobacterium Agar (BIF) y Propionibacterium Agar (PIAB). Los reactivos utilizados para los medios formulados fueron, para GYCA: agar bacteriológico (MCD LAB), peptona de caseína (SOLBIOSA), extracto de levadura (Sigma-Aldrich), glucosa (Sigma-Aldrich), carbonato de calcio (Fermont), etanol al 95%; BIF: agar base Columbia, glucosa (Sigma-Aldrich), lactulosa, riboflavina (Sigma-Aldrich), HCl cisteína (Sigma-Aldrich), ácido propiónico y; PIAB: agar bacteriológico, extracto de levadura, peptona de caseína (SOLBIOSA), lactato de sodio (Sigma-Aldrich), fosfato dipotásico (Jalmek), sulfato de magnesio (Jalmek). MRS, GYCA, BIF y PIAB fueron adicionados con natamicina (ZHEJIANG). La composición de los medios de aislamiento se muestra en el cuadro 4. Las soluciones de electrolitos se prepararon con KCl (Fermont), KH_2PO_4 (Fermont), NaHCO_3 (Fermont), NaCl (Fermont), $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$ (Sigma-Aldrich) y $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (Fermont). Las enzimas utilizadas fueron Amylase Licuamil® 1200 (ENMEX),

pepsina porcina 1:10,000 (Hycel) y pancreatina (Sigma-Aldrich). Las sales biliares se compraron en Sigma-Aldrich.

Cuadro 4. Composición de medios de cultivo para aislamiento de microorganismos de kombucha

Componente	MRS	APD	GYCA	BIF	PIAB
pH a 25 °C (± 0.2)	6.5	5.6	6.8	5.5	7.0
Base agar Columbia (g/L)				42.5	
Agar (g/L)	12	15	20		20
Almidón papa (g/L)		4			
Peptona universal (g/L)	10		3		
Extracto de carne (g/L)	5				
Extracto de levadura (g/L)	5		5		10
Caseína enzimática (g/L)					10
D(+) Glucosa (g/L)	20	20	30	2.5	
Lactulosa (g/L)				2.5	
Riboflavina (g/L)				0.01	
HCl-Cisteína (g/L)				0.5	
Lactato de sodio (g/L)*					10
Fosfato dipotásico (g/L)	2				0.25
Citrato de amonio (g/L)	2				
Acetato de sodio (g/L)	5				
Sulfato de magnesio (g/L)	0.1				0.05
Sulfato de manganeso (g/L)	0.05				
Carbonato de calcio (g/L)			10		
Tween 80 (mL/L)	1				
Etanol 95% (mL/L)			30		
Ácido propiónico (mL/L)				5	
Natamicina (g/L)	0.2		0.2	0.2	0.2

*Después de esterilizar. MRS: Agar Man Rogosa and Sharpe; APD: Agar papa dextrosa; GYCA: Glucose Yeast and Chalk Agar; BIF: Agar *Bifidobacterium*; PIAB: Agar *Propionibacterium*.

8.3 Métodos

8.3.1 Muestreo

Las muestras fueron proporcionadas por la empresa BCC, la cual comercializa kombucha embotellada en vidrio desde hace 6 años con inóculo original. Cuenta con marmitas de acero inoxidable y un sistema de producción semi-cerrado. Las muestras se tomaron antes de llegar a la etapa de saborización de forma estéril para evitar la interferencia de otras materias primas en el experimento.

8.3.2 Monitoreo ambiental y caracterización fisicoquímica

Durante un ciclo completo de siete días de fermentación aerobia (0-168 horas) y tres días de fermentación anaerobia (169-240 horas) se registraron temperatura y humedad con un termohigrómetro digital (Acurite®). Los sólidos solubles y pH fueron medidos a las 0, 72, 168 y 240 h con un refractómetro Aramox y potenciómetro Hanna, respectivamente. A las 0, 168 y 240 horas de fermentación se determinó la acidez titulable (AT) por el método volumétrico con hidróxido de sodio y fenoftaleína como indicador (A.O.A.C. 942.15). Los resultados se expresaron como g/100 mL de ácidos orgánicos. También se determinaron los azúcares reductores totales (ART) mediante el método Lane y Eynon descrito en la Norma Oficial Mexicana (NOM-086-SSA1-1994) y los resultados se expresaron como g/100 mL en peso.

8.3.3 Análisis microbiológicos

8.3.3.1 Microbiología sanitaria

Se llevaron a cabo análisis para el conteo de hongos y levaduras según lo descrito en la NOM-111-SSA1-1994. También se determinaron coliformes totales, coliformes fecales y la presencia o ausencia de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp se determinaron mediante el método descrito en la NOM-210-SSA1-2014.

8.3.3.2 Identificación de microorganismos

Se sometieron a identificación de 3 a 5 de cada una de las diferentes morfologías de colonia observadas en los cultivos en petri. La identificación de microorganismos se realizó mediante espectrometría de masas con desorción/ionización asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF: *Matrix- Assisted Laser Desorption/Ionization with Time Of Flight*) en

un equipo Microflex LT/SH MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) con el software MALDI-BIOTYPER RTC por el método de transferencia directa extendida (eDT) con lisis celular parcial por ácido fórmico. El protocolo para la identificación se describe a continuación:

1. Se aislaron microorganismos de kombucha mediante la siembra de diluciones seriadas por extensión en placa en los cinco medios sólidos anteriormente mencionados (cuadro 3) a temperatura, tiempo y atmósfera específicas (cuadro 5). Las colonias seleccionadas por morfología de colonia y celular se pasaron de medio al menos cuatro veces para conseguir colonias axénicas. La pureza fue verificada mediante tinción Gram.
2. Biomasa de colonias axénicas de cultivos de 24 horas se pasaron por duplicado en una placa MALDI TARGET de 96 spots de acero pulido.
3. Inmediatamente después se cubrieron con 1 μ L de ácido fórmico al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente.
4. Se cubrieron los spots con 1 μ L de 10mg/mL de HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico) mezclado en una solución estándar (acetonitrilo 50%, agua 47.5% y ácido trifluoroacético 2.5%). Se dejó secar a temperatura ambiente.
5. En el equipo, la biomasa se sometió a 240 disparos, lo que generó espectros de masas que fueron analizados con el software Biotyper 3.1 y comparados con la base de datos BDAL (Bruker Daltonics).

La confiabilidad de la interpretación se valoró según la puntuación obtenida como se muestra en el cuadro 5

Cuadro 5. Interpretación de scores obtenidos para la identificación de microorganismos de kombucha

Puntuación	Interpretación
2.300-3.000	Identificación a nivel de especie altamente probable
2.000- 2.299	Identificación de género segura
1.700-1.999	Identificación de género probable
0.000-1.699	Identificación no confiable

Para la conservación de las cepas aisladas se mezcló el caldo con crecimiento de 18 horas con glicerol al 50% y se almacenaron a -80 °C.

8.3.3.3 Dinámica poblacional microbiana

Las muestras se tomaron en condiciones asépticas a las 0, 72, 168 y 240 horas de fermentación. Se realizaron siete diluciones seriadas de las muestras de kombucha en agua peptonada (0.1% peptona + 0.85% NaCl). Para el conteo de las unidades formadoras de colonia por mL de kombucha se llevó a cabo el método Miles Misra mediante el sembrado de gotas calibradas (10 µl) de las diluciones seriadas. Las gotas que presentaron crecimiento de entre 20 y 100 colonias fueron seleccionadas para su conteo y expresión de resultados. La inoculación se llevó a cabo en cinco medios de cultivo sólidos: MRS, APD, GYCA BIF y PIAB (Cuadro 6) por tiempo, temperatura y atmósferas específicas (Cuadro 2) los resultados fueron expresados como unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) de kombucha.

Cuadro 6. Medios y condiciones de cultivo de microorganismos de kombucha

Microorganismo	Medio de cultivo	Condiciones de incubación (°C /tiempo/tipo de atmósfera)
Bacterias ácido lácticas	MRS + natamicina	37 / 48-72 h / anaerobia
Levaduras	APD	25 / 48 h / aerobia
Bacterias ácido acéticas	GYCA + natamicina	30 / 72 h / aerobia
<i>Propionibacterium</i>	PIAB + natamicina	30 / 11-14 días / anaerobia
Bifidobacterias	BIF + natamicina	35- 37 / 72 h / anaerobia

MRS: Agar Man Rogosa and Sharpe; APD: Agar Papa Dextrosa; GYCA: Glucose Yeast and Chalk Agar; BIF: Agar *Bifidobacterium*; PIAB: Agar *Propionibacterium*.

8.3.4 Propiedades probióticas

8.3.4.1 Resistencia a condiciones del TGI *in vitro*.

El proceso de selección de las cepas se basó en la evidencia bibliográfica científica que muestren un posible potencial probiótico de las cepas aisladas. Se realizó un método continuo y estático para la simulación de las condiciones gastrointestinales (fases oral, gástrica e intestinal), según lo propuesto por Minekus *et al.*, 2014 con algunas modificaciones. Las cepas seleccionadas de bacterias y levaduras fueron reactivadas durante un 18 horas en medios líquidos MRS y papa

dextrosa, respectivamente. Los jugos salivales, gástricos e intestinales fueron preparados mediante una mezcla de electrolitos, enzimas, agua y, en el caso del jugo intestinal, sales biliares (Cuadro 7). Para el ajuste de pH se utilizaron soluciones de HCl 1M y NaOH 1M. Un stock concentrado de electrolitos se preparó con cloruro de potasio (KCl), fosfato monopotásico (KH₂PO₄), bicarbonato de sodio (NaHCO₃), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl₂(H₂O)₆) carbonato de amonio ((NH₄)₂CO₃) (Cuadro 8). Todas las soluciones de enzimas se prepararon en agua destilada estéril. Las soluciones de enzimas se prepararon a las siguientes actividades enzimáticas: amilasa para la fase oral a 75 U/mL; pepsina para la fase gástrica a 2000 U/mL y de pancreatina para la fase intestinal a 100 U/mL. A la mezcla final de jugo intestinal se le agregó un 0.3% de sales biliares. Una solución de cloruro de calcio (CaCl₂) a 0.3 M se adicionó a la mezcla de todos los jugos simulados con el inóculo al final para evitar su precipitación. Todos los experimentos se realizaron en un ambiente estéril, los materiales y soluciones se esterilizaron en autoclave a excepción de las soluciones de enzimas que se esterilizaron por filtración (0.04 μm). Todos los experimentos fueron realizados por duplicado.

Cuadro 7. Composición de jugos simulados de TGI *in vitro*

Componente	Fase oral pH	Fase gástrica	Fase intestinal
	7.0 (%)	pH 3.0 (%)	pH 7.0 (%)
Medio líquido con cepa	50	50	50
Solución de electrolitos	35	37.5	27.5
Agua destilada/ HCl 1M ó NaOH 1M	9.75	4.25	2.75
Solución de CaCl ₂ 0.3M	0.25	0.25	1
Solución de amilasa (1500U/mL del volumen final)	5	-	-
Solución de pepsina (250U/mL del volumen final)	-	8	-
Solución de pancreatina (0.1% del volumen final)	-	-	12.5
Solución de sales biliares (0.3% del volumen final)	-	-	6.25

Cuadro 8. Composición de soluciones de electrolitos para la simulación de jugos del TGI

Componente	Stock concentrado	Electrolitos para JSS	Electrolitos para JGS	Electrolitos para JIS
	g/L	mL/L del stock concentrado		
KCl	37.3	30.2	13.8	13.6
KH ₂ PO ₄	68	7.4	1.8	1.6
NaHCO ₃	84	13.6	25	85
NaCl	117	-	23.6	19.2
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30.5	1	0.8	2.2
(NH ₄) ₂ CO ₃	48	0.12	1	-

JSS: Jugo salival simulado; JGS: Jugo gástrico simulado; JIS: Jugo intestinal simulado.

Fase oral

Previo a llevar a cabo el experimento de la fase oral, la solución de electrolitos y el medio líquido con crecimiento de 18 h se precalentaron a 37 °C en baño María. El JSS y el caldo con cada cepa se mezclaron en un ratio de 50:50 (cuadro 7) y cuando fue necesario el pH se ajustó a 7.0. La simulación de fase oral se incubó en aerobiosis a 37°C durante 5 minutos. La mezcla luego de la incubación se denominó bolo.

Fase gástrica

Una alícuota de bolo fue inmediatamente mezclada con el JGS precalentado a 37 °C en una proporción 50:50. El pH se ajustó a 3.0 con HCl 1M (cuadro 7). La mezcla fue incubada durante 2 horas en anaerobiosis a 37 °C. La mezcla luego de la incubación se denominó quimo.

Fase intestinal

Una alícuota de quimo fue mezclada inmediatamente con el JIS precalentado a 37 °C en una proporción de 50:50 y se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 1M (cuadro 7). La mezcla fue incubada durante 2 horas en anaerobiosis a 37 °C. La toma de muestras para el análisis de resistencia a condiciones simuladas del TGI se tomaron en cuatro momentos: 1) Recuento inicial: En la mezcla de fase oral antes de la incubación; 2) después de la incubación de fase oral; 3) después de la

incubación de fase gástrica; 4) después de la incubación de fase intestinal. De cada muestra se sembraron diluciones seriadas por el método de Miles Misra en MRS y APS para bacterias láctica y levaduras, respectivamente. Los resultados fueron expresados en log UFC/mL. Las fórmulas utilizadas para la presentación de resultados fueron las siguientes:

$$\% \text{ sobrevivencia} = \frac{C_f}{C_i} * 100$$

En donde:

C_f= Cuenta final (log UFC/mL)

C_i= Cuenta inicial (log UFC/mL)

$$\% \text{ reducción Cuenta inicial a fase bucal} = \frac{C_{fb} - C_i}{C_{fb}} * 100$$

En donde:

C_{fb}= Cuenta fase bucal (log UFC/mL)

C_i= Cuenta inicial (log UFC/mL)

$$\% \text{ reducción fase bucal a fase gástrica} = \frac{C_{fg} - C_{fb}}{C_{fg}} * \%s. fan$$

En donde:

C_{fg}= Cuenta fase gástrica (log UFC/mL)

C_{fb}= Cuenta fase bucal (log UFC/mL)

% s. fan= % de sobrevivencia de la fase anterior

$$\% \text{ reducción fase gástrica a fase intestinal} = \frac{C_{fi} - C_{fg}}{C_{fi}} * \%s. fan$$

En donde:

C_{fi}= Cuenta fase intestinal (log UFC/mL)

C_{fg}= Cuenta fase gástrica (log UFC/mL)

% s. fan= % de sobrevivencia de la fase anterior

8.3.4.2 Formación de biopelícula en poliestireno

La capacidad para formar biopelícula se determinó mediante el método cristal violeta (CV) en microplacas de poliestireno según lo propuesto por Ren y cols. (2013) con algunas modificaciones. De 100 a 600 μL del caldo con un crecimiento de 18 h de los aislados se ajustaron a densidad óptica (D.O.) de 0.15 a 600 nm (D.O.600) por dilución con medio de cultivo líquido. En cada pocillo de las microplacas se agregaron un total de 160 μL del medio ajustado y medio líquido estéril como control. Las placas se sellaron y se dejaron incubar en agitación a 200 rpm durante 24 horas a 30 °C. Posteriormente, se realizó un lavado con tampón de fosfato salino (pH 7.2) tres veces para eliminar el medio y las células libres. Se llevó a cabo una tinción con solución acuosa de 0.1% de cristal violeta y se dejó reposar 20 minutos para después enjuagar tres veces más en la solución de tampón fosfato salino. Finalmente, se dejó reposar durante 30 minutos con etanol al 96%. La biopelícula disuelta en etanol se pasó a una nueva microplaca para evitar la intervención del tinte que pudiera haber sido absorbido por las paredes del poliestireno. La absorbancia se midió a 590 nm en un lector de microplaca BIO RAD xMark™ (Microplate Spectrophotometer). La capacidad de formar biopelícula de los aislados seleccionadas se clasificó, según Stepanovic *et al.*, (2000), en las categorías “No formadora de biopelícula”, “débil formadora de biopelícula”, “moderadamente formadora de biopelícula” o “fuerte formadora de biopelícula”. Para las clasificaciones, el *cut off* de la densidad óptica obtenida (D.O.c.) se define como tres desviaciones estándar sobre el promedio de la D.O. del control negativo (caldo MRS sin inocular). Los aislados se clasificaron de la siguiente manera: $D.O. \leq D.O.c$ = no formadora de biopelícula; $D.O.c. < D.O < (2*D.O.c)$ = débil formadora de biopelícula; $2*D.O.c. < D.O. \leq (4*D.O.c)$ = moderada formadora de biopelícula; $(4*D.O.c) < D.O.$ = fuerte formadora de biopelícula.

9. RESULTADOS

9.1 Monitoreo ambiental y caracterización fisicoquímica

Los registros de la temperatura ambiental durante 240 horas de fermentación se muestran en la figura 4. La temperatura ambiental a la cual se llevó a cabo el proceso de fermentación osciló entre 21 °C y 30 °C con un promedio de 24 °C. La humedad se mantuvo entre 69% y 74% con un promedio de 72%

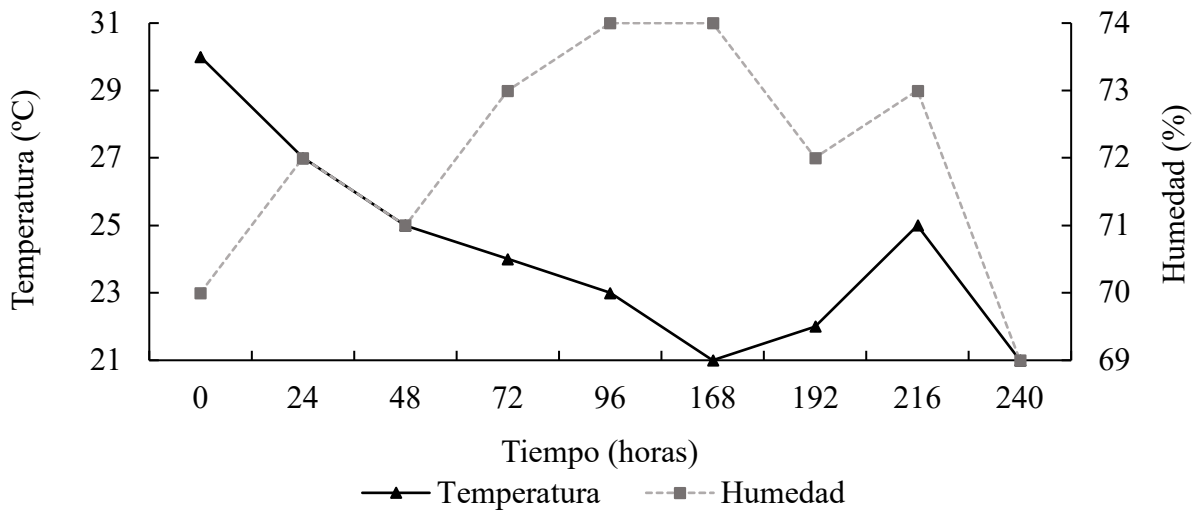


Figura 4. Registros de temperatura y humedad ambientales durante 240 horas de fermentación.

En la figura 5 se grafican los resultados de acidez titulable y pH y en la figura 6 los ART y °Brix, ambos durante 240 horas de fermentación de kombucha.

La acidez titulable (AT) incrementó un total de 1.3 unidades durante las 240 h de fermentación. Posterior a la adición de un inóculo líquido (kombucha fermentada de un lote anterior) la acidez titulable fue de 0.6 g/L. A las 168 h alcanzó los 1.9 g/L, valor que se mantuvo hasta las 240 h (final de la fermentación). El pH descendió un total de 1.1 unidades durante las 240 h de fermentación. La infusión de mezcla del té tuvo un pH de 6 (valor no graficado) y descendió a 4.1 con el inóculo líquido. Este valor descendió a 3.5 a las 72 h y a 3.3 a las 168 h. El pH al final de la fermentación fue de 3.0.

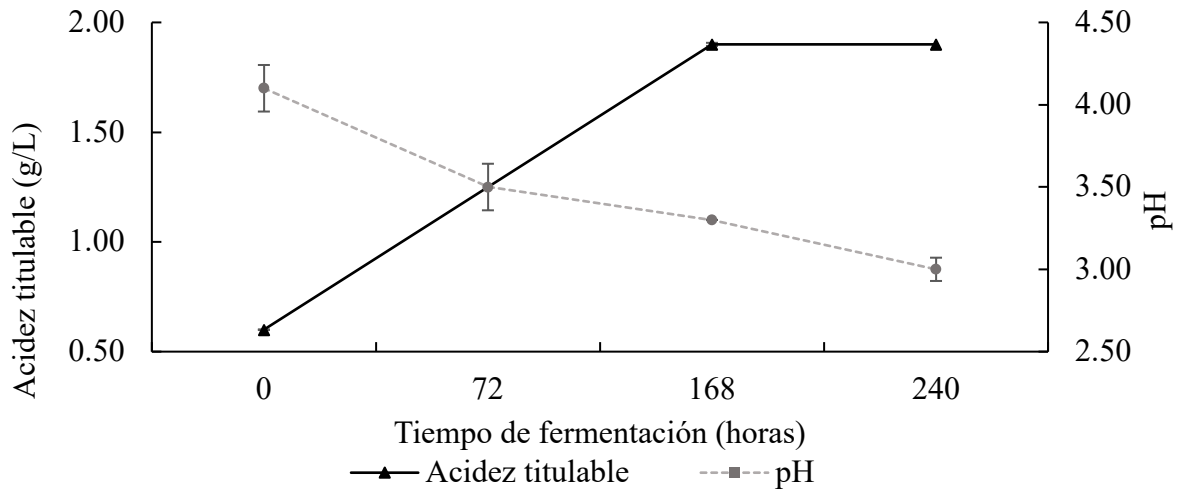


Figura 5. Comportamiento en la concentración de ácidos orgánicos y pH durante 240 horas de fermentación

En la figura 6 se muestran los resultados del contenido de azúcares reductores totales y °Brix durante las 240 h de fermentación para la elaboración de kombucha a nivel industrial. Los azúcares reductores totales decrementaron 4.6 unidades durante 240 horas de fermentación. Inicialmente alcanzaron un valor de de 8.82 g/100 mL, a las 168 h fue de 7.73 g/100 mL y de 4.22 g/100 mL al final de la fermentación. Los °Brix disminuyeron un total de 7 unidades durante las 240 horas de fermentación. Los °Brix luego de la adición de la sacarosa fue de 12 y disminuyó a 9 °Brix a las 72 h. A las 160 h el fermento alcanzó los 6 °Brix y al final de la fermentación a un valor de 5 °Brix.

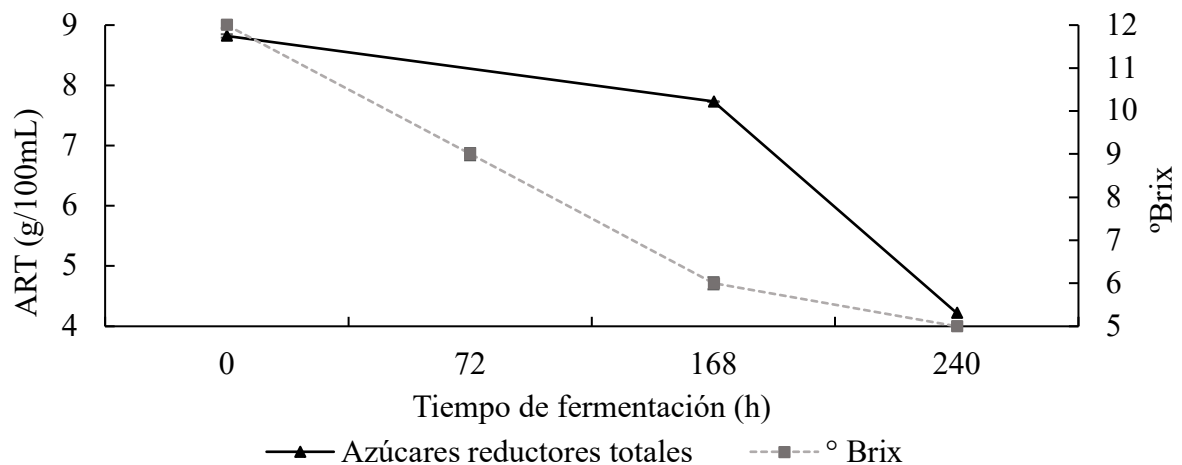


Figura 6. Comportamiento en la concentración de azúcares reductores totales (ART) y °Brix durante 240 horas de fermentación

9.2 Análisis microbiológicos

9.2.1 Microbiología sanitaria

Los resultados de calidad sanitaria de kombucha fueron contrastados con los límites para bebidas saborizadas no alcohólicas y con los de quesos madurados a falta de normativa que regule una bebida fermentada similar en México. El recuento de mohos como grupo indicador de prácticas higiénicas se encontró cercano a lo permitido (Cuadro 9). Por otra parte, las levaduras se observaron elevadas. Los indicadores de materia fecal, incluida la bacteria *Escherichia coli*, fueron inferiores al límite de detección del método. *Salmonella* spp. estuvo ausente en 25 mL de la bebida. Con base a los resultados se puede concluir que la kombucha presenta una buena calidad sanitaria.

Cuadro 9. Calidad sanitaria en kombucha comercial

Determinación	Resultado	Bebidas saborizadas no alcohólicas*	Quesos frescos, madurados y quesos de sueros**
Mohos (UFC/mL)	530	50	500
Levaduras (UFC/mL)	11 000 000	n.a.	
Coliformes totales (NMP/mL)	< 0,3	10	≤100
Coliformes fecales (NMP/mL)	< 0,3	n.a	n.a.
<i>Escherichia coli</i> (NMP/mL)	< 0,3	n.a	100***
<i>Salmonella</i> spp.	Ausente en 25 mL	Ausente en 25 mL	Ausente en 25 mL

* NOM-218-SSA1-2011; **NOM-243-SSA1-2010; ***para quesos frescos. n.a: no aplica.

9.2.2 Identificación de microorganismos

Se obtuvieron un total de 96 aislados en 3 medios de cultivo diferentes. Se identificó el % de los aislados que pertenecen a 11 especies. Se encontraron en APD cinco géneros de levaduras de la familia Saccharomycetaceae (*Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Lachancea*

fermentati, *Pichia manshurica* y *Debaryomyces hansenii*) y uno de la familia Tremellaceae (*Cryptococcus flavescens*). En el medio de aislamiento GYCA se encontró la presencia de *Gluconobacter oxydans* y *Staphylococcus hominis* y *Staphylococcus epidermis*. *Leuconostoc mesenteroides* y *Weissella viridiscens* se aislaron del medio MRS. No se identificó la presencia de propionibacterias ni bifidobacterias los medios PIAB y BIF, respectivamente, durante el tiempo y condiciones de incubación determinados (cuadro 6).

Cuadro 10. Aislamiento e identificación de microorganismos de kombucha

	Género y especie	Número de aislados
Levaduras	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	11
	<i>Lachancea fermentati</i>	12
	<i>Pichia manshurica</i>	1
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	2
	<i>Cryptococcus flavescens</i>	2
Bacterias	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	15
	<i>Weissella viridiscens</i>	1
	<i>Gluconobacter oxydans</i>	7
	<i>Staphylococcus hominis</i>	11
	<i>Staphylococcus epidermis</i>	1

9.2.3 Dinámica poblacional microbiana

Los microorganismos de interés identificados se agruparon en tres: Levaduras, bacterias ácido lácticas (BAL) y bacterias ácido acéticas (BAA). En el caso del medio GYCA en el que tuvimos, además del crecimiento de BAA, *S. hominis* y *S. epidermis*, se diferenciaron por morfología de colonia comprobada por morfología celular y se contaron únicamente las correspondientes a las BAA. En la figura 9 se muestra la dinámica poblacional de estos tres grupos de microorganismos durante un periodo completo de fermentación de kombucha (240 horas). La tendencia general fue de aumento en todas las poblaciones hasta el final de las 240 horas de fermentación. Las concentraciones iniciales fueron de 5.35 log de levaduras, 4.03 log de BAL y 3.30 log de BAA. Durante las 240 h de fermentación, las levaduras tuvieron un incremento total de 1.65 log, las

BAL de 2.66 log y las BAA de 2.72. Las concentraciones finales fueron de 7.00 log de levaduras, 6.69 log de BAL y 6.02 de BAA.

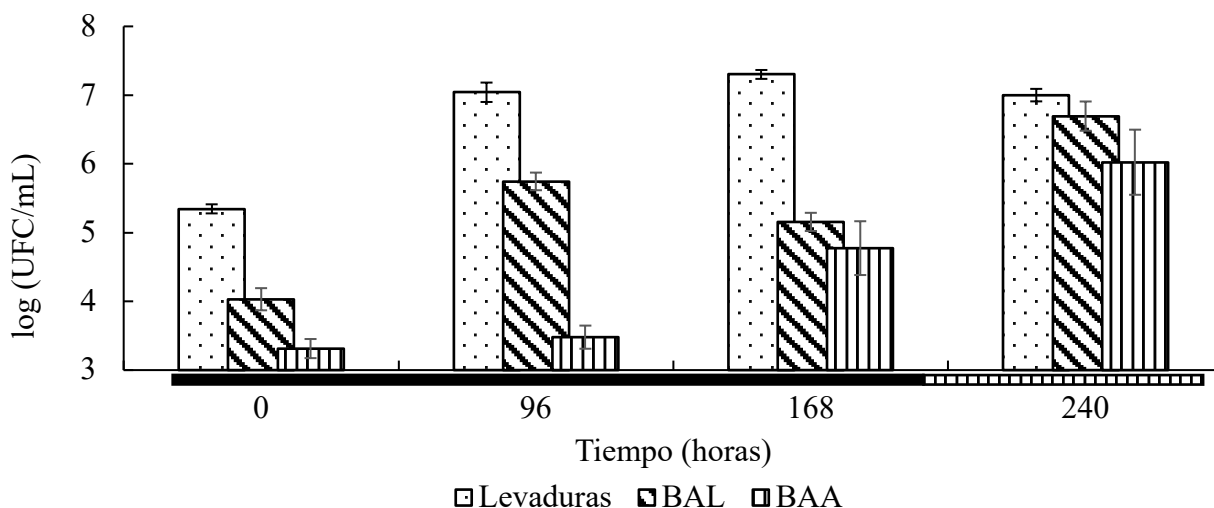


Figura 7. Dinámica de desarrollo microbiano durante 240 horas de fermentación de kombucha comercial. BAL: Bacterias ácido lácticas; BAA: Bacterias ácido acéticas. A pie del eje de las abscisas, líneas horizontales: fermentación anaerobia; líneas verticales: fermentación aerobia.

9.3 Propiedades probióticas

9.3.1 Resistencia a condiciones del TGI *in vitro*

En el cuadro 11 se presentan los diferentes géneros y especies de 9 levaduras y 6 bacterias seleccionados para el análisis de resistencia a condiciones del TGI *in vitro*; así como los códigos de identificación utilizados en este estudio para cada uno de los microorganismos seleccionados.

Cuadro 11. Microorganismos seleccionados para pruebas de resistencia al TGI *in vitro*.

	Género y especie	Código de ID
Levaduras	<i>Pichia manshurica</i>	PM1
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SC1, SC2, SC3
	<i>Lachancea fermentati</i>	LF1, LF2, LF3
	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	HO1, HO2
Bacterias	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	LM1, LM2, LM3
	<i>Weissella viridiscens</i>	WV1
	<i>Staphylococcus hominis</i>	SH1, SH2

9.3.1.1 Resistencia de levaduras a condiciones del TGI *in vitro*

Se realizó una simulación del tracto gastrointestinal *in vitro* de forma continua, es decir, un volumen determinado fue recuperado de la fase bucal para exponerla a la fase gástrica y finalmente a la fase intestinal. La figura 8 resume el comportamiento de la viabilidad de las levaduras durante la simulación del TGI en log UFC/mL. De un total de 9 levaduras, 3 mostraron una disminución significativa en su viabilidad entre la cuenta inicial y la fase bucal; 8 entre la fase bucal y la fase gástrica y 4 entre la fase gástrica y la intestinal. De forma general se observó una tendencia de reducción en la viabilidad de las levaduras al ser expuestas a la simulación del TGI. La viabilidad de PM1, SC1, SC2, LF2, HO1 y HO2 se mantuvo igual entre la cuenta inicial y la fase bucal, mientras en la de SC3, LF1 y LF3 se observó una diferencia. La fase gástrica mostró un efecto reductor significativo para todas las levaduras, con excepción LF1 que se mantuvo igual que en la fase bucal. La fase intestinal tuvo un efecto de reducción en la viabilidad de PM1, SC3, LF1 y HO1, mientras SC1, SC2, LF2, LF3 Y HO2 se mantuvieron constantes.

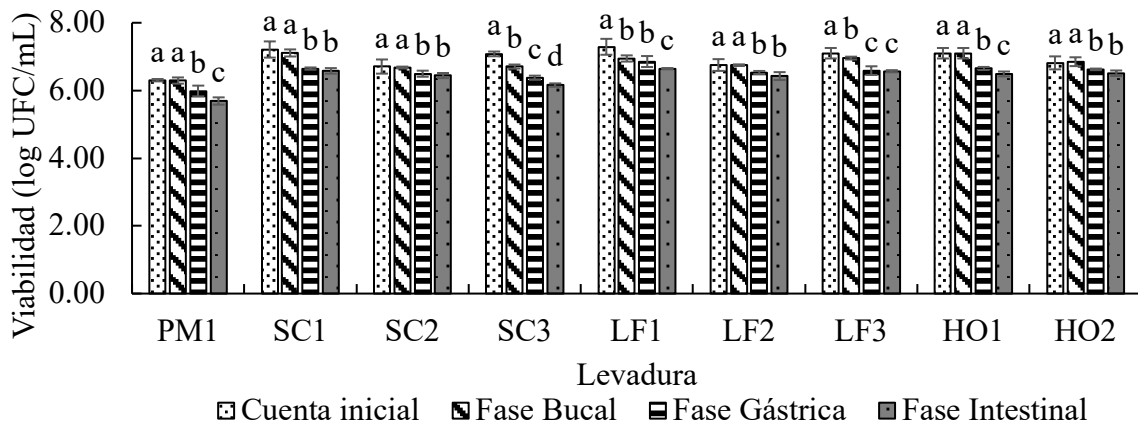


Figura 8. Comportamiento de la viabilidad de las levaduras durante la simulación del TGI *in vitro*. Los resultados se muestran como el promedio de los log UFC/mL de 6 réplicas. Las diferencias significativas se establecieron con un nivel de significancia $P > 0.05$ aplicando ANOVA con la prueba de Duncan. Dentro del mismo aislado, barras con la misma letra son estadísticamente iguales. PM: *Pichia manshurica*; SC: *Saccharomyces cerevisiae*; LF: *Lachancea fermentati*; HO: *Hanseniaspora opuntiae*.

En la figura 9 se puede observar el resultado de la viabilidad de las levaduras en cada fase de la simulación. Todas las levaduras tuvieron una cuenta inicial mayor a 6 log UFC/mL. PM1 tuvo una concentración inicial de 6.30 log UFC/mL; SC2, LF2 y HO2 con concentraciones iniciales de 6.71 a 6.82 log UFC/mL; el tercer grupo son SC3, HO1, LF3, SC1 Y LF1 con concentraciones

iniciales de 7.08 a 7.29 log UFC/mL. En todas las fases PM1 fue la de menor viabilidad al final del experimento. En la fase bucal HO1 y SC1 tuvieron la mayor viabilidad mientras LF1 fue la levadura de mayor viabilidad en las fases gástrica e intestinal.

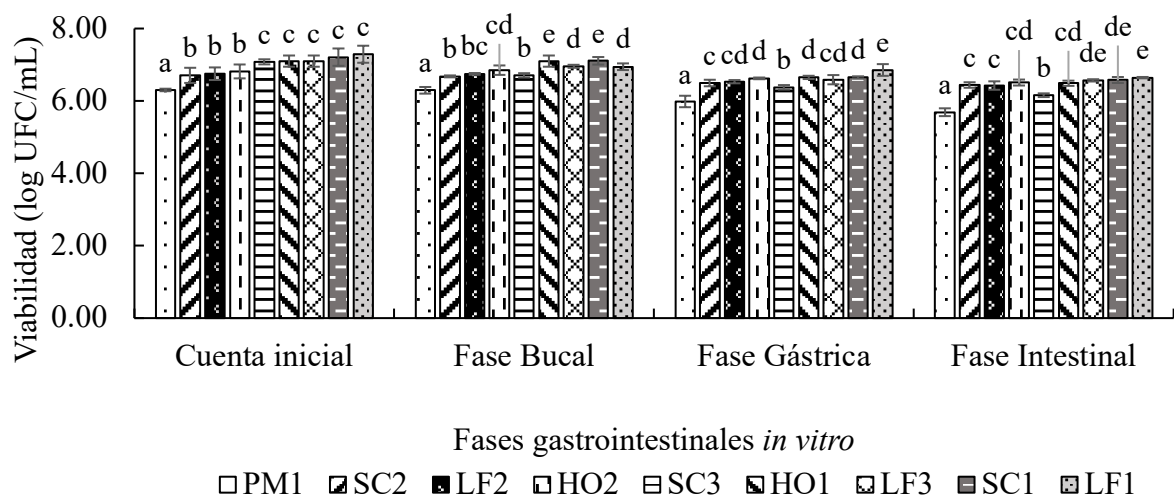


Figura 9. Comparación de la viabilidad de levaduras durante la simulación del TGI *in vitro* por fase. Los resultados de la viabilidad se muestran como el promedio de los log UFC/mL de 6 réplicas. Las diferencias significativas se establecieron con un nivel de significancia $P > 0.05$ aplicando ANOVA con la prueba de Duncan. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales entre diferentes levaduras en la misma fase. PM: *Pichia manshurica*; SC: *Saccharomyces cerevisiae*; LF: *Lachancea fermentati*; HO: *Hanseniaspora opuntiae*.

En el cuadro 12 se muestra el porcentaje de sobrevivencia de cada una de las levaduras, así como la concentración en log UFC/mL al final de la simulación. Las levaduras tuvieron un rango de sobrevivencia de 86.96% a 95.61% y concentraciones finales entre 5.70 y 6.65 log UFC/mL.

Cuadro 12. Porcentaje de sobrevivencia de levaduras a condiciones del TGI *in vitro*.

ID	Género y especie	Porcentaje de sobrevivencia (%)	Concentración final (log UFC/mL)
PM1	<i>Pichia Manshurica</i>	90.39	5.70±0.12 ^a
SC3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	86.96	6.16±0.05 ^b
LF2	<i>Lachancea fermentati</i>	95.00	6.44±0.07 ^c

SC2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	95.61	6.44±0.02 ^c
HO1	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	91.11	6.49±0.07 ^{cd}
HO2	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	95.16	6.51±0.04 ^{cd}
LF3	<i>Lachancea fermentati</i>	92.21	6.57±0.03 ^{de}
SC1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	90.67	6.59±0.06 ^{de}
LF1	<i>Lachancea fermentati</i>	90.61	6.65±0.01 ^e

Los resultados de la concentración final son el promedio de 6 réplicas ± desviación estándar. Las diferencias significativas se establecieron con un nivel de significancia $P > 0.05$ aplicando ANOVA con la prueba de Duncan. Resultados con diferente letra son estadísticamente diferentes.

En la figura 10 se muestra el porcentaje de reducción de viabilidad de las levaduras durante el experimento. La viabilidad de las levaduras SC3 y LF1 fue afectada en su mayoría durante la fase oral con un 5.27 % y 5.20 % de reducción. De un total de 9 levaduras evaluadas, 6 tuvieron un mayor porcentaje de reducción de viabilidad en la fase gástrica con un rango de 2.62 % y 6.62%. PM1 tuvo una ligera diferencia en la reducción de viabilidad en la fase intestinal (4.89 %) en comparación con su reducción en la fase gástrica (4.66 %).

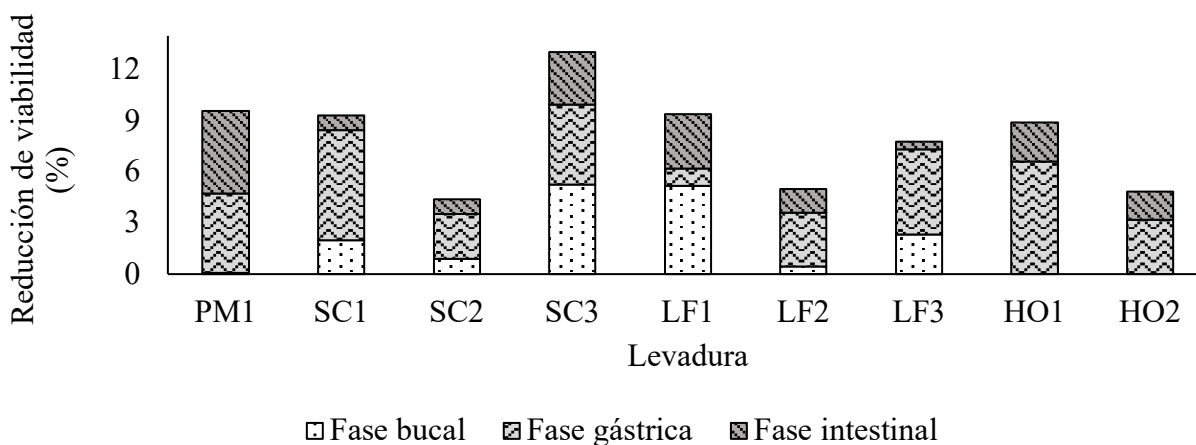


Figura 10. Porcentaje de reducción de viabilidad de levaduras a condiciones del TGI *in vitro* por fase de simulación. PM: *Pichia manshurica*; SC: *Saccharomyces cerevisiae*; LF: *Lachancea fermentati*; HO: *Hanseniaspora opuntiae*.

9.3.1.2 Resistencia de bacterias a condiciones del TGI *in vitro*.

En la figura 11 se muestran los resultados de la viabilidad en log UFC/mL de todos los aislados de bacterias por fase de simulación. La viabilidad de todos los aislados de *Leuconostoc mesenteroides* y *Weissella viridiscens* se mantuvo estable entre la cuenta inicial y la fase bucal, a diferencia de los dos aislados de SH que tuvieron diferencias significativas en la viabilidad de estas dos fases. Todas las bacterias, excepto LM3, tuvieron un efecto de reducción en su viabilidad significativo al exponerlas a la fase gástrica. Ambos aislados de *Staphylococcus hominis* fueron las bacterias más afectadas disminuyendo hasta una viabilidad de 0 en la fase gástrica. La simulación de la fase intestinal marcó una diferencia significativa en la viabilidad de todas las bacterias lácticas (LM1, LM2, LM3 y WV). Todas las bacterias lácticas (BAL) tuvieron diferencias en sus viabilidades entre las fases gástrica e intestinal. LM3 tuvo una diferencia significativa exclusivamente en la fase intestinal.

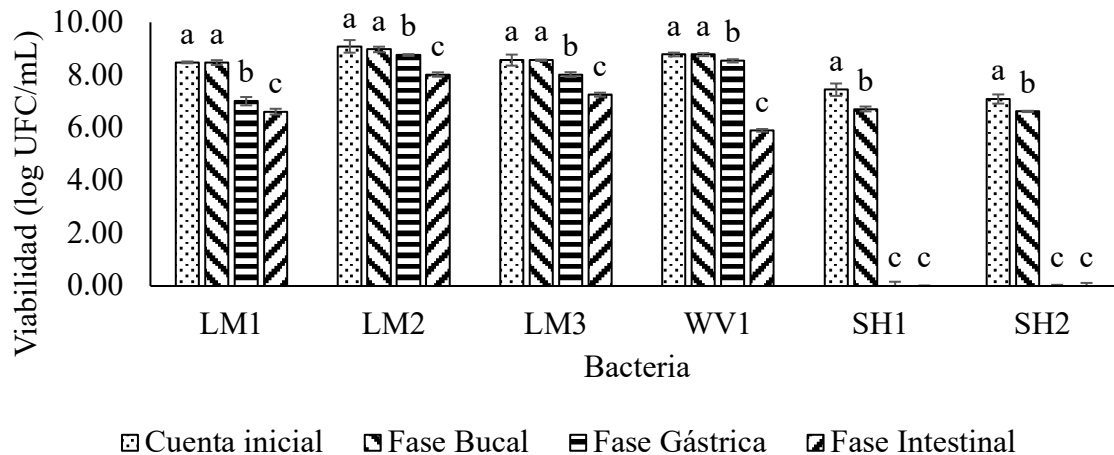


Figura 11. Comportamiento de la viabilidad de las bacterias durante la simulación del TGI *in vitro*. Los resultados se muestran como el promedio de los log UFC/mL de 6 réplicas. Las diferencias significativas se establecieron con un nivel de significancia $P > 0.05$ aplicando ANOVA con la prueba de Duncan. Dentro del mismo aislado, barras con diferente letra son estadísticamente iguales. LM: *Leuconostoc mesenteroides*; WV: *Weissella viridiscens*; SH: *Staphylococcus hominis*.

En la figura 12 se puede observar el resultado de la viabilidad de las bacterias en cada fase de la simulación. Las cuentas iniciales de las bacterias en este experimento oscilaron entre 7.15 a 9.08 log UFC/mL. LM2 fue la bacteria de mayor viabilidad en todas las fases. SH1 y SH2 fueron las

bacterias de menor concentración en la cuenta inicial y en la fase bucal. La viabilidad e SH1 y SH2 fue de 0 desde la fase gástrica.

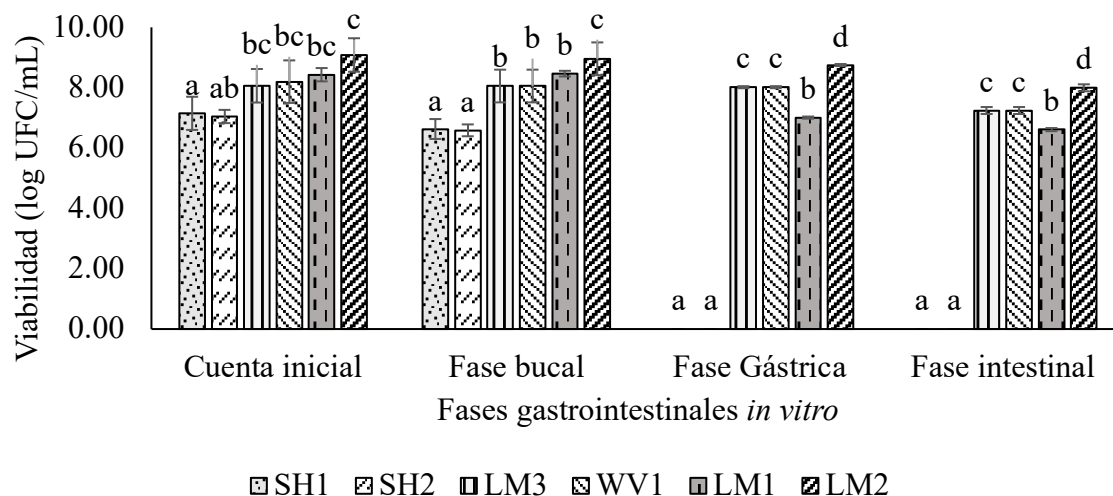


Figura 12. Comparación de la viabilidad de bacterias durante la simulación del TGI *in vitro* por fase. Los resultados de la viabilidad se muestran como el promedio de los log UFC/mL de 6 réplicas. Las diferencias significativas se establecieron con un nivel de significancia $P > 0.05$ aplicando ANOVA con la prueba de Duncan. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales entre diferentes bacterias en la misma fase. SH: *Staphylococcus hominis*; LM: *Leuconostoc mesenteroides*; WV: *Weissella viridiscens*.

En el cuadro 13 se presentan los porcentajes de sobrevivencia de cada una de las bacterias, así como la concentración en log UFC/mL al final del experimento. Al final de la simulación todas las BAL tuvieron sobrevivieron entre 67.24% y 88.26% y concentraciones finales entre 5.9 a 8.02 log UFC/mL.

Cuadro 13. Porcentaje de sobrevivencia de bacterias aisladas de kombucha a condiciones del TGI *in vitro*.

ID	Género y especie	Porcentaje de sobrevivencia (%)	Concentración final (log UFC/mL)
SH1	<i>Staphylococcus hominis</i>	0	0 ^a
SH2	<i>Staphylococcus hominis</i>	0	0 ^a
WV1	<i>Weissella viridiscens</i>	67.24	5.90 ^b

LM1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	77.99	6.61 ^c
LM3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	84.70	7.26 ^d
LM2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	88.26	8.02 ^e

Los resultados de la concentración final son el promedio de 6 réplicas \pm desviación estándar. Las diferencias significativas se establecieron con un nivel de significancia $p > 0.05$ aplicando ANOVA con la prueba de Duncan. Resultados con diferente letra son estadísticamente diferentes.

En la figura 13 se presenta el porcentaje de reducción de las bacterias estudiadas por fase. De un total de 6 bacterias analizadas, 3 tuvieron una mayor reducción en la fase gástrica y 3 en la fase intestinal. La fase oral fue la menos agresiva para todas las bacterias (figura 13).

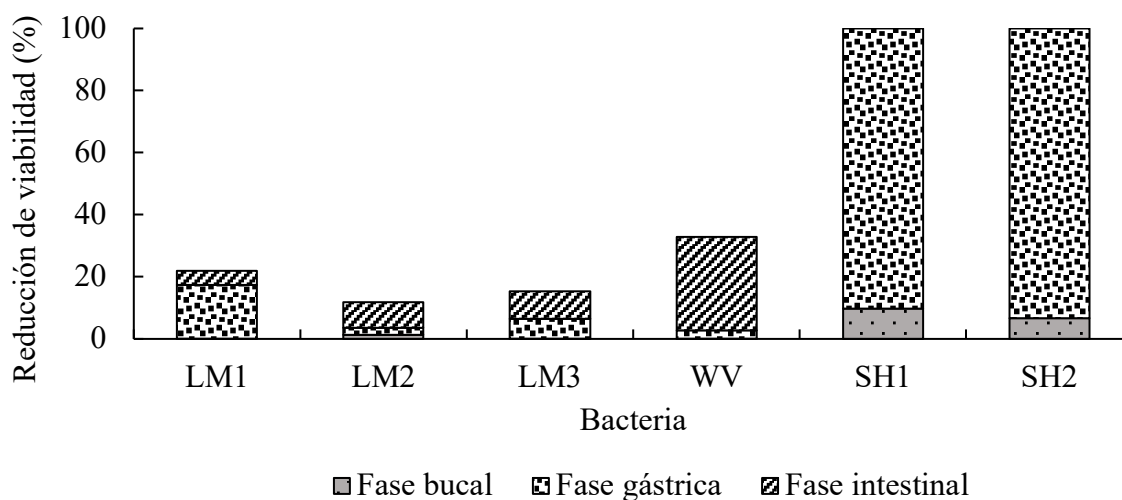


Figura 13. Porcentaje de reducción de viabilidad de bacterias a condiciones del TGI *in vitro* por fase de simulación. LM: *Leuconostoc mesenteroides*; WV: *Weissella viridiscens*; SH: *Staphylococcus hominis*.

9.3.2 Capacidad de formación de biopelícula

En la figura 14 se muestran la capacidad de levaduras aisladas de kombucha para formar biopelícula en placa de poliestireno. Según su capacidad para producto biopelícula, 4 levaduras se clasifican como fuertes productoras; 2 como moderadas y 1 como es débil productora. SC1 no produjo biopelícula en poliestireno.

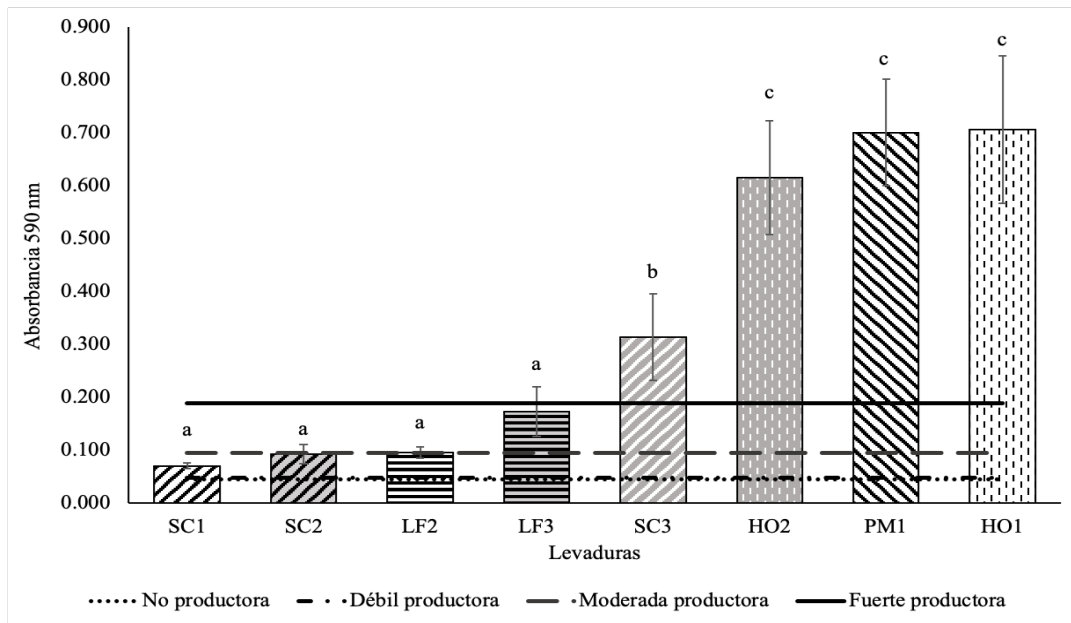


Figura 14. Formación de biopelícula por levaduras en microplaca de poliestireno. Los resultados son el promedio de las absorbancias de 5 réplicas. Las diferencias significativas se establecieron mediante ANOVA con un nivel de significancia de $p > 0.05$ con la prueba de Duncan. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales. PM: *Pichia manshurica*; SC: *Saccharomyces cerevisiae*; LF: *Lachancea fermentati*; HO: *Hanseniaspora opuntiae*.

En la figura 15 se muestran los resultados de la capacidad productora de biopelícula de las BAL y en la figura 16 de los aislados de *S. hominis*. Todas las BAL aquí estudiadas se clasifican como moderadas productoras de biopelícula, mientras las *S. hominis* fueron débiles productoras.

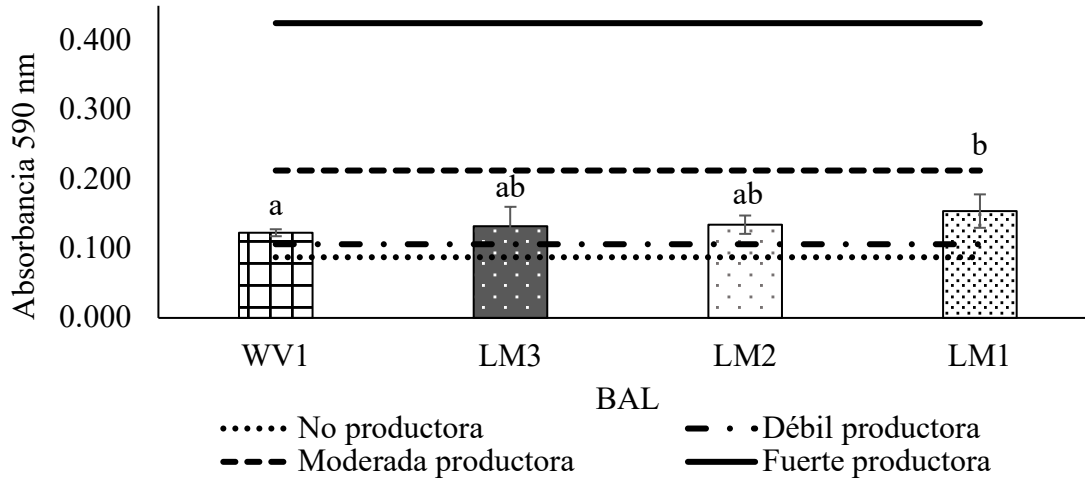


Figura 15. Formación de biopelícula por BAL en microplaca de poliestireno. Los resultados son el promedio de las absorbancias de 5 réplicas. Las diferencias significativas se establecieron mediante ANOVA con un nivel de significancia de $p > 0.05$ con la prueba de Duncan. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales. LM: *Leuconostoc mesenteroides*; WV: *Weissella viridiscens*.

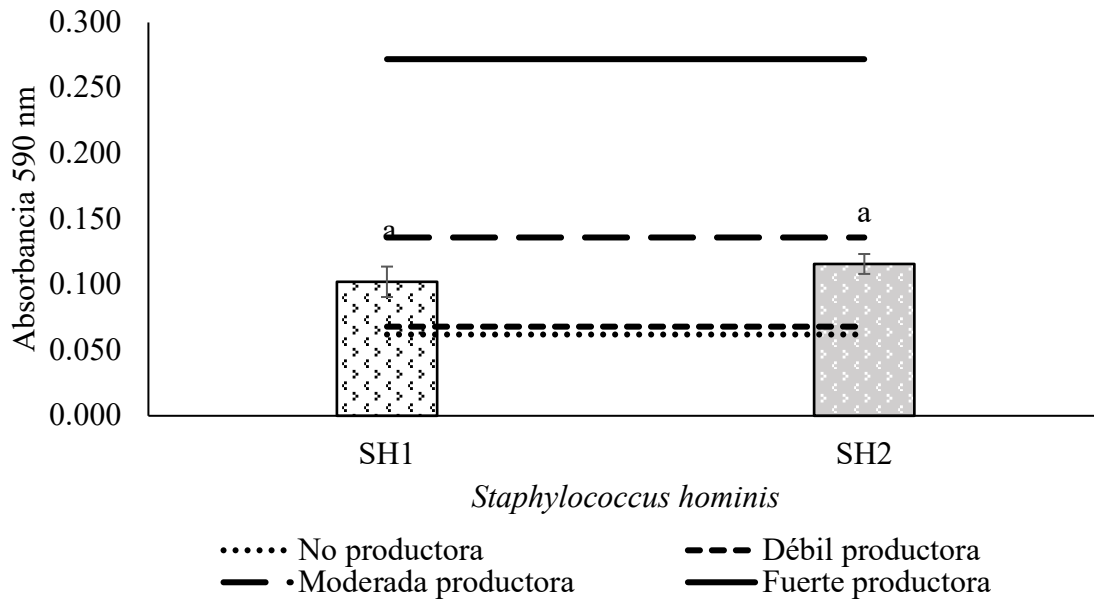


Figura 16. Formación de biopelícula por *S. hominis* en microplaca de poliestireno. Los resultados son el promedio de las absorbancias de 5 réplicas. Las diferencias significativas se establecieron mediante ANOVA con un nivel de significancia de $p > 0.05$ con la prueba de Duncan. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales. SH: *Staphylococcus hominis*.

10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

10.1 Monitoreo ambiental y caracterización fisicoquímica

La temperatura y humedad durante la fermentación corresponden a la temporada de lluvias en Guadalajara. Dichos factores no se controlan en el área de fermentación por lo que están dadas por las condiciones ambientales así como la ventilación del espacio, el aislamiento térmico del área y el calor producido por la maquinaria y la misma fermentación. Los resultados de AT (acidez titulable) y pH se encuentran en la figura 6. La AT de la mezcla de té con el inóculo líquido fue de 0.6 g/L y subió 0.13 g/L alcanzando una AT de 1.9 g/L a las 168 h, valor que se mantuvo hasta al final de la fermentación a las 240 h. El incremento en la AT corresponde a la generación de ácidos orgánicos por el metabolismo de microorganismos fermentadores. Los resultados coinciden con los de Neffe *et al.* (2017) quienes elaboraron kombucha con 10% de sacarosa y una mezcla de té verde y té negro. Los resultados de la cuantificación de ácidos al final de la fermentación en su estudio fueron de 1.6 g/L de ácido acético y 0.7 g/L de la mezcla de otros cinco ácidos, que dan un total de 2.34 g/L. En otro experimento, Loncar *et al.* (2006), determinaron que una kombucha fermentada con 6.6% de sacarosa a 22 °C con 10% de inóculo líquido, tuvo una acidez total expresada como ácido acético de 2.0 g/L. Por otro lado, los resultados obtenidos en este estudio contrastan con lo encontrado por Jayabalan *et al.* (2007) que reportan una concentración de ácidos dependiente del tipo de té utilizado (verde o negro) en kombucha elaborada con 10% sacarosa y 10% de inóculo líquido. La suma de las concentraciones de ácidos acético, D-glucorónico y láctico en dicho estudio fue de 4.52 g/L al día 9 de kombucha fermentada con té verde y de 5.22 g/L con té negro. Esta discrepancia podría deberse a factores como la diferencia de poblaciones microbianas del SCOBY y el té utilizado (Jayabalan *et al.*, 2007; Loncar *et al.*, 2006). De los ácidos orgánicos producidos durante la fermentación, se ha reportado el acético como el de mayor concentración; seguidos por los ácidos quínico, oxálico, málico, cítrico, D-glucorónico y láctico (Jayabalan *et al.*, 2007; Neffe *et al.*, 2017). El pH de la infusión azucarada de té fue de 6.5 y decreció 2.4 unidades al adicionar 10% del inóculo líquido, alcanzando un pH de 4.1. Ese decremento inicial se debe a que el inóculo líquido que le es adicionado tiene un pH de ~3.0, resultado de una prolongada fermentación. El decremento total de pH desde el inicio hasta el final de la fermentación fue de 1.1 unidades. El pH final de la kombucha analizada fue de 3.0, valor que coincide con estudios anteriores (Chen & Liu, 2000;

Neffe *et al.*, 2017). Un pH de ~3.0 es utilizado como valor de referencia para determinar el fin del proceso y se ha comprobado que la calidad sensorial de la kombucha a este pH es adecuada (Loncar *et al.*, 2006; Neffe *et al.*, 2017). La fuente de carbón más utilizada en kombucha es la sacarosa que está asociada con los sólidos solubles de la kombucha representados por °Brix. Los resultados de concentración de ART y °Brix se muestran en la figura 7. Luego de la adición de la sacarosa y del 10% del inóculo líquido se obtuvo un valor inicial de 12 °Brix, los cuales disminuyeron 7 unidades a un total de 5 °Brix a las 240 h. Los °Brix se utilizan de forma rutinaria en la industria de bebidas para determinar la cantidad de azúcar disuelta tomando en cuenta que 1 °Brix representa 1 g de sacarosa en 100 mL. El valor inicial en el proceso de elaboración de kombucha coincide con el 10% de sacarosa adicionada a la bebida más la del 10% del inóculo líquido. En este sentido, el valor inicial de sacarosa disminuye de 12 g/100 mL a 5 g/100 mL, que corresponde a un 41%. Estos resultados se acercan a lo reportado por Loncar y colaboradores (2006) quienes calcularon una reducción en la concentración de sacarosa entre ~33 y 70% según las variables de tiempo, temperatura y concentración del inóculo líquido. Por otro lado, los azúcares reductores totales se mantuvieron estables en un valor de 4 g/100 mL hasta las 168 horas y disminuyeron a 2.08 g/100 mL al final de la fermentación.

10.2 Microbiología sanitaria

Las condiciones fisicoquímicas alcanzadas durante la fermentación mantuvieron un medio adecuado para el desarrollo de bacterias y levaduras. En tema de inocuidad alimentaria, los hongos y levaduras son indicadores de higiene durante el proceso de elaboración. La concentración de levaduras en la kombucha superó el límite máximo de los parámetros microbiológicos establecidos por la normatividad mexicana para bebidas. Lo anterior se explica con la variedad de microbiota autóctona que pertenece a la bebida fermentada, misma que no presenta un proceso de pasteurización; sin embargo, para este estudio, la concentración de levaduras no puede ser utilizado como indicador de contaminación. La concentración de coliformes totales, coliformes fecales, *E. coli* y *Salmonella* están asociadas a la contaminación por materia fecal. Todos los indicadores de materia fecal fueron inferiores al límite de detección del método. *Salmonella* spp., patógeno transmitido por alimentos, estuvo ausente en 25 mL de la bebida (cuadro 8).

Los alimentos y bebidas fermentados no pasteurizados son un claro ejemplo de la aplicación de la tecnología de barreras. La cual inicia con las buenas prácticas de manufactura e higiene en el proceso de producción de kombucha, limitando el crecimiento de los microorganismos específicos contenidos en los inóculos. Estos microorganismos son por sí mismos la primer barrera para el desarrollo de microorganismos no deseados como degradadores de la calidad o patógenos (Rahman, 2007). Se ha demostrado sensibilidad de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus epidermis*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella spp*, *Helicobacter pylori* y *Listeria monocytogenes* al incubarlos en presencia de kombucha (Sreeramulu, *et al.*, 2000). Los microorganismos deseados presentes en el SCOBY y en el inóculo líquido se incrementan gracias al uso de los di y monosacáridos produciendo ácidos orgánicos. El efecto bacteriostático de la kombucha se asocia con la presencia de ácido acético así como con otros compuestos antimicrobianos que aún no se han identificado (Sreeramulu *et al.*, 2000).

10.3 Identificación de microorganismos

Los microorganismos que se reportan en el cuadro 9 coinciden con las publicaciones de diversos autores que han identificado poblaciones microbianas en kombucha por técnicas moleculares y basadas en cultivo (Coton *et al.*, 2017; Marsh *et al.*, 2014). Todas las levaduras encontradas están asociadas con los procesos fermentativos, incluyendo kombucha y otras bebidas fermentadas como el vino y la cerveza (Coton *et al.*, 2017; Marsh, *et al.*, 2014; Milla *et al.*, 2013). Se encontró la presencia de bacterias ácido lácticas (BAL) *Leuconostoc mesenteroides* y *Weissella viridiscens*. Las BAL han sido encontradas en otras bebidas y alimentos fermentados de origen láctico y no láctico como el kefir, tuba y tepache (De La Fuente *et al.*, 2015; Simova *et al.*, 2002). *Gluconobacter oxydans* es una bacteria ácido acética que ha sido reportada como la responsable de la generación del SCOBY (Jia *et al.*, 2004; Valera *et al.*, 2015). *Staphylococcus hominis* es una bacteria reportada como inofensiva y se encuentra en la piel de brazos y piernas ausente de vellos en humanos y otros animales (Sung *et al.*, 2010).

10.4 Dinámica poblacional microbiana

Las levaduras, al igual que en varios estudios (Chen y Liu, 2000; Neffe *et al.*, 2017) fue la población de mayor concentración durante toda la fermentación y alcanzó una densidad máxima

de 7.3 log (UFC/mL) a las 168 horas, manteniéndose estable durante el resto de la fermentación (figura 9). Las levaduras durante su metabolismo hidrolizan la sacarosa en monosacáridos y producen etanol que son sustratos esenciales para el crecimiento de BAA (Cvetkovic *et al.*, 2008). En el caso del grupo de las BAA se observa un incremento constante hasta llegar a 6.02 log (UFC/mL) al final de la fermentación (figura 9). El resultado discrepa con el estudio realizado por Chen y Liu (2000) quienes reportan concentraciones de BAA de 3 a 4 logaritmos en diferentes muestras de kombucha entre los 6 y 14 días de fermentación. Las BAA son bacterias aerobias estrictas, por lo que su crecimiento en una fase anaerobia no es de esperarse. Lo anterior podría explicarse al estudiar la forma en que se lleva a cabo el proceso para realizar la fermentación anaerobia. Después de las 168 horas la bebida es impulsada por una bomba acoplada a una manguera hacia el segundo tanque de fermentación, en donde pasará 72 horas más en fermentación anaerobia. Durante esta manipulación podría haber incorporación de oxígeno lo que permitiría que las BAA continuaran su crecimiento durante la etapa tardía del proceso. El aumento de BAA entre las 0 y 96 h fue de 0.17 log, mientras los incrementos mas importantes de estas poblaciones fueron entre 96 y 168 h con 1.29 log y muy cercano al aumento entre las 168 y 240 h (fermentación anaerobia), que fue de 1.25 log. Los estudios hasta ahora encontrados sobre el comportamiento poblacional durante la fermentación de kombucha se han realizado con muestras de la bebida sin aplicación de anaerobiosis. Los resultados obtenidos sobre el crecimiento de las BAA en fermentación anaerobia fueron de utilidad para la empresa para corregir dicho inconveniente.

En condiciones aerobias las BAA producen ácido acético, originando la acidificación del medio (Chen & Liu, 2000; Kallel *et al.*, 2012). Dicha acidificación pudo propiciar un medio ideal para permitir que otras bacterias ácido tolerantes como las BAL se desarrollaran. El mayor incremento de las BAL fue de 1.71 log durante las primeras 96 horas (figura 9), desencadenando por la disponibilidad de nutrientes y gracias a su naturaleza anaerobia facultativa, lo que le permite su tolerancia al oxígeno. Al final del proceso este grupo se pudo beneficiar por el aumento de glucosa que la población de levaduras dejó disponible alcanzando una densidad final de 6.69 logaritmos.

10.5 Resistencia a condiciones del TGI *in vitro*.

La kombucha se ha considerado como una bebida funcional gracias a su contenido en probióticos. En este contexto, el estudio de la dinámica poblacional podría marcar una pauta para una mejor manipulación del proceso en dirección al desarrollo de las comunidades microbianas probióticas. Las bacterias son los microorganismos con más estudios de actividad probiótica, sin embargo también se han reportado algunas levaduras con dicho efecto (Bonatsou *et al.*, 2018; Castro *et al.*, 2019; Castro *et al.*, 2015; Fakruddin *et al.*, 2017; Gómez *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2005; Lara *et al.*, 2019; Le & Yang, 2018; Nayak, 2011; Shukla *et al.*, 2014). Una característica para poder considerar a un microorganismo probiótico es que se mantenga vivo al final de su paso por el TGI. En este estudio las levaduras tuvieron una mayor sobrevivencia que las bacterias, ya que hubo *staphylococcus* (no lácticas) que cuya viabilidad redujo totalmente (SH1 y SH2), mientras el menor porcentaje de sobrevivencia en levaduras fue de 86.96% al final de la simulación. Las BAL sobrevivieron entre 67.24% y 88.26%.

10.5.1 Resistencia de levaduras a condiciones del TGI *in vitro*.

Mediante los experimentos llevados a cabo se obtuvieron resultados sobre la capacidad que tienen algunos microorganismos aislados de kombucha a sobrevivir al TGI *in vitro*. A continuación, se comparan y discuten los porcentajes totales de sobrevivencia de cada una de las levaduras, así como los porcentajes de reducción en cada una de las tres fases simuladas del TGI *in vitro*.

En la presente investigación *P. manshurica* tuvo una sobrevivencia de 90.39% con reducción de viabilidad de 4.66 % en la fase gástrica y 4.89 % en la fase intestinal. Estos resultados son similares a los obtenidos en tres cepas aisladas de la fermentación de aceite de oliva por Bonatsou *et al.* (2018) quienes reportaron porcentajes de sobrevivencia de 78.4 % a 82.5 % y reducciones que van del 7.3 % a 10 % en la fase gástrica y de 8.9 % a 10.5 % en la fase intestinal. Las diferencias observadas entre los aislados de Bonatsou *et al.* y los nuestros podría atribuirse a la aplicación de diferentes parámetros de pH y tiempo en las fases simuladas. En la fase gástrica se aplicaron menor pH (pH 2.0) y mayor tiempo de exposición (2.5 h) comparados con los nuestros (pH 3.0; 2 h). Mientras en la fase intestinal tanto el pH como el tiempo de exposición fueron mayores (pH 8.0; 3.5 h) comparados con nuestros parámetros (pH 7.0; 2 h). En un estudio de transcriptoma realizado en *Pichia anomala* sometida a un estrés por acidez (pH de 3.0 con HCl),

se encontró una alta expresión de genes de la bomba de protones en la membrana celular. También se observó la expresión de subunidades de la ATPasa vacuolar que actúan en conjunto con la bomba de protones para desacidificar el citosol. Todo este proceso tiene un alto costo energético y en algún momento la producción de ATP es insuficiente para mantener otras necesidades metabólicas, provocando la muerte celular. Sin embargo, esta levadura expresó enzimas relacionadas con la generación de energía a través de la cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa, procesos que generan en la mitocondria gran cantidad de ATP con alta eficiencia, mejorando su sobrevivencia. En *P. anómala*, es de destacar la presencia del Complejo I que genera el 40% del gradiente electroquímico necesario para la conversión de ADP a ATP en la mitocondria (Fletcher *et al.*, 2015).

Saccharomyces cerevisiae es considerado como un organismo generalmente reconocido como seguro (GRAS). La sobrevivencia de los aislados de *S. cerevisiae* se encontró en el rango de 86.96 % a 95.16 %, resultados similares a las cepas más resistentes de *S. cerevisiae* reportadas por Bonatsou *et al.* (2018). La viabilidad de SC3 se vio mayormente reducida en la fase bucal con una disminución de 5.27 %, mientras las viabilidades de SC1 y SC2 redujeron mayormente durante la fase gástrica con 6.46 % y 2.62 %, respectivamente. Al igual que en el caso de *P. manshurica*, las viabilidades de seis aislados de *S. cerevisiae* analizados por Bonatsou *et al.* (2018) resultaron mayormente afectadas en la simulación de la fase intestinal (pH 8.0; 3.5 h), por lo que el contraste entre resultados podría deberse a la diferencia en las condiciones de experimentación. Se ha observado que *S. cerevisiae* en un medio con bajo pH, al contrario de *P. manshurica*, no sobreexpresa los genes encargados de codificar para ATPasas vacuolares, por lo que la respiración no es su principal mecanismo para reducir el estrés por acidificación. Se ha visto que *S. cerevisiae* es capaz de modificar la membrana celular para evitar el estrés por acidificación extracelular con HCl; por ejemplo, evitando la entrada de hierro a la célula, el cual se vuelve tóxico a un pH < 3.0. Además, una menor concentración de hierro en la célula provoca su administración hacia las rutas metabólicas más importantes para sobrevivir a tales condiciones, permitiendo el ahorro de energía (Fletcher *et al.*, 2017). Una de las rutas metabólicas que son dependientes de hierro y que, contrariamente, se ha visto sobre-expresada en condiciones de acidez, tanto por ácidos orgánicos como inorgánicos, es la que sintetiza ergosterol (Fletcher *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2018). El ergosterol es un esteroide que se encuentra en la membrana celular de eucariontes y provee de impermeabilidad a la célula. También se ha comprobado la

modificación de la composición de membranas mediante la acumulación de triacilglicerolos y la degradación de ésteres (Guo *et al.*, 2018). Una previa adaptación de los microorganismos aislados de kombucha por el gradual descenso de pH causado por la generación de ácidos orgánicos durante la fermentación podría ser un factor que mejora la sobrevivencia de estos. En este sentido, se ha observado que una adaptación a pH bajos con ácidos orgánicos evita la separación de las células durante el proceso de división celular, lo que promueve la formación de estructuras multicelulares reduciendo el radio de difusión del ácido al interior de la célula. También ante ácidos orgánicos, se fortifica la pared celular e incrementa la degradación de ácido láctico (Fletcher *et al.*, 2017).

El aislado de *L. fermentati* LF1 tuvo una sobrevivencia de 90.61 %, LF2 fue el aislado más resistente de esta especie con un 95 % y LF3 sobrevivió en un 92.21 %. La viabilidad de LF1 se redujo mayormente en la fase bucal con un 5.20 %, mientras las viabilidades de LF2 y LF3 se vieron más afectadas en la fase gástrica con 3.17 % y 5.0 % de reducción, respectivamente. Se ha reportado en *L. fermentati* aislada de kombucha una sobrevivencia de 85 % a 93 % al exponerla a un pH de 3.0 (con HCl) durante 48 h (Bellut, *et al.*, 2020). Estos porcentajes de sobrevivencia son muy similares a los obtenidos en el presente trabajo durante la simulación gástrica. La alta sobrevivencia de *L. fermentati* a medios ácidos puede estar asociada a su capacidad para producir grandes cantidades de ácido láctico lo que hace que esté adaptada a la constante exportación de protones de la célula. Además, se ha demostrado que la capacidad de sobrevivencia de *L. fermentati* es menor a un pH de 3 con ácido láctico en comparación con la encontrada al mismo pH con HCl. Esta diferencia en el efecto de diferentes ácidos se asocia a sus propiedades químicas. El ácido láctico tiene un Pka de 3.86, mientras el del HCl es de -6.2; esto implica que la cantidad de ácido láctico necesario para llegar al pH de 3 es mayor que el de HCl, además de que la mayoría del ácido láctico a estas condiciones se encuentra en su forma protonada. Los ácidos en su forma protonada entran por difusión pasiva a la célula, en donde se encuentran con un pH más alto provocando su desprotonación (Bellut, *et al.*, 2020). Ante esta situación la célula debe exportar el proton y el anión, productos de la disociación del ácido, con un alto costo energético, limitando otras actividades metabólicas esenciales e induciendo a la muerte de la célula. Al ser el HCl un ácido fuerte por su Pka, resulta más difícil que acidifique el interior de la célula a un pH de 3.0.

Los aislados de *H. opuntiae* investigados en el presente estudio tuvieron sobrevivencias de 91.11 % y 95.16 % para HO1 y HO2, respectivamente. Ambos aislados de *H. opuntiae* fueron mayormente afectados en la fase gástrica con reducciones de 6.62 % y 3.19 %. Lara y colaboradores (2019) reportaron que *H. opuntiae* aislada de chile guajillo fermentado espontáneamente ha demostrado sobrevivir a las condiciones del TGI *in vitro*. Se ha demostrado en *H. opuntiae* capacidad antioxidante y de reducción de colesterol, así como actividad antimicrobiana contra *Salmonella entérica* ser. Typhimurium y *Candida albicans*, sugiriendo que es una cepa de importante potencial probiótico (Lara-Hidalgo *et al.*, 2019). Dicha cepa también se ha estudiado como probiótico para otros animales comprobando la estimulación de sistema inmune y su actividad contra infecciones por *Vibrio splendidus* (Ma *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2014).

De las 9 levaduras expuestas a las condiciones simuladas del TGI *in vitro*, 6 presentaron una mayor pérdida de viabilidad en la fase gástrica con reducciones desde 2.62 % a 6.62%. Según lo demostrado en este trabajo y en otros estudios ya mencionados, el bajo pH del estómago es uno de los factores que más afectan la viabilidad de los microorganismos durante su paso por el TGI. La decadencia en la viabilidad de las levaduras por efecto del pH ácido depende de la capacidad de cada una de las levaduras para ejercer mecanismos que le permitan mantener la homeostasis del pH intracelular (Beales, 2004). Como se ha discutido anteriormente, entre estos mecanismos se encuentran la restricción de entrada de protones a través de membranas altamente impermeables; la generación de gradientes quimiosmóticos mediante ATPasas de potasio; modulación del tamaño de los canales de membrana; activación de la bomba de protones y la modulación de la composición de ácidos grasos en membrana (Guan & Liu, 2020). Además, una previa adaptación de microorganismos a bajo pH por su exposición a los ácidos orgánicos producidos durante la fermentación de kombucha pueden brindar una ventaja a los probióticos para sobrevivir a la acidez del estómago.

10.5.2 Resistencia de bacterias a condiciones del TGI *in vitro*

A continuación, se presentan la comparación y discusión de la capacidad de sobrevivencia de las bacterias durante la simulación, así como la reducción en cada una de las tres fases del TGI *in vitro*.

L. mesenteroides y *W. viridiscens* son bacterias BAL. Los aislados de *L. mesenteroides* LM1, LM2 y LM3 tuvieron una sobrevivencia de 77.9 %, 88.26 % y 84.70 %, respectivamente. Giles *et al.*, (2016) reportan sobrevivencias de 48.33 % a 74.98 % y en dos cepas de *L. mesenteroides* aisladas de pulque luego de una exposición a un pH de 2.5 y concentraciones de 0.3 % y 0.1 % de sales biliares durante 24 horas a 37 °C. Los resultados anteriores son contrastantes con los de Castro *et al.*, (2015), quienes reportan en cuatro cepas de *L. mesenteroides* una sobrevivencia máxima de 16.75 % (pH 2, 1 hora, 37 °C y pH 6.5, 0.5 % de sales biliares, 1.9 mg/mL de pancreatina, 90 minutos 37 °C). Los resultados obtenidos en este estudio para *W. viridiscens* muestran una sobrevivencia de 67.24%, resultado similar a los encontrados por Le y Yang (2018) que reportan sobrevivencias de 77.4 % a 79.9 %. La fase bucal no afectó negativamente la viabilidad de ninguna de las BAL, mientras en la fase gástrica todos los aislados de *L. mesenteroides* mostraron una reducción en su viabilidad, siendo LM1 la más afectada en esta fase con una reducción del 17.26 %. Otros estudios similares han mostrado reducciones en *L. mesenteroides* de hasta un 39 % (pH de 3 por 3 horas a 37 °C con 1000 U/mg pepsina) (Shukla *et al.*, 2014) y 59.10 % (pH 2 por 3 horas a 37 °C sin enzimas) (Castro *et al.*, 2015). Un menor tiempo de exposición de los aislados de *L. mesenteroides* a la simulación gástrica en el presente estudio (2 horas) podría explicar el menor porcentaje de reducción en comparación con los estudios anteriormente expuestos (3 horas). Todas las BAL redujeron significativamente en la simulación intestinal. Las BAL LM2, LM3 y WV1 fueron los aislados más afectadas en esta fase. Dos de los tres aislados de LM sometidos a este experimento, mostraron reducciones de viabilidad de 8.13 % a 8.90 %. Estos porcentajes se encuentran entre los 11.85 % a 10.64 % (0.5 % de sales biliares durante 4 horas), y el 0 % de reducción (0.3 y 1 % de sales biliares durante 24 horas) encontrados por otros autores (Castro *et al.*, 2015; Giles *et al.*, 2016). *W. viridiscens* redujo un 30.01% de su viabilidad en la simulación del intestino en este estudio. Dichos resultados contrastan con los de Le y Yang (2018), quienes observaron que dos aislados de *W. viridiscens* murieron mayormente en la fase gástrica y no mostraron diferencias significativas al exponerlas a la fase intestinal. *L. mesenteroides* ha demostrado inhibir microorganismos entéricos, (Giles *et al.*, 2016), posee actividad β-galactosidasa y propiedad anticancerígena (Shukla *et al.*, 2014), actividad antioxidante, es coadyuvante en la disminución en los niveles de colesterol (Lee y Kim, 2019) y en la disfunción metabólica en ratones (Castro *et al.*, 2019). Por

lo anterior, se considera a *L. mesenteroides* como una bacteria presente en kombucha con un gran potencial probiótico.

Ninguno de los aislados de *S. hominis* sobrevivieron a las condiciones simuladas del TGI *in vitro*, ya que la reducción total de la viabilidad se observó en la fase gástrica. Sung *et al.*, (2009) estudiaron la sobrevivencia de *S. hominis* a un pH de 2.5 y de forma discontinua, a diferentes concentraciones de sales biliares (0.3, 1.0 y 5.0 w/v) y observaron porcentaje de sobrevivencia de 0.53%. Durante la fase gástrica se observó efecto del tratamiento de la fase bucal en la viabilidad de ambos aislados de *S. hominis*, al reducirse en 9.82 % y 6.65 % en SH1 y SH2, respectivamente. En la fase gástrica la viabilidad de ambos aislados redujeron 90.18 % para SH1 y 93.35 % para SH2.

Las sobrevivencias al final del experimento fueron entre 86.96 % a 95.61 % para levaduras y de 67.24 % a 88.26 para BAL. Se encontraron dos estudios realizados que reportan resistencia a las condiciones de TGI de bacterias lácticas aisladas de kombucha pero hasta el momento ninguno enfocado en levaduras. Puspawati *et al.*, (2016) realizó un experimento discontinuo para conocer la resistencia de 20 BALs aisladas de kombucha. Los autores observaron que en la fase gástrica (pH de 2.0 durante 4 horas a 37 °C sin enzimas) cuatro aislados resistieron entre 88.65 % y 65.48 %, once de ellas estuvieron por debajo de estos porcentajes y cinco no sobrevivieron. En los resultados de la resistencia a las condiciones intestinales (4 horas en presencia de 0.5 % de sales biliares), siete aislados redujeron en concentración en un rango de 0.07 a 6 log UFC/mL y siete incrementaron. Bogdan *et al.*, (2018) realizaron pruebas de resistencia a sales biliares a cinco BALs aisladas de kombucha. Los resultados mostraron que a partir de una concentración de 3 % se 3 aislados fueron altamente tolerantes y 2 fuertemente inhibidos. En dicho estudio se proponen dos aislados de BAL como potenciales probióticos.

10.6 Capacidad de formación de biopelícula

La capacidad de sobrevivencia a las condiciones del TGI es el primer filtro para considerar a un microorganismo probiótico. Paralelamante, la propiedad de producir biopelícula es importante para la selección del probiótico ya que puede proporcionar información sobre su capacidad para adherirse a las células del intestino y colonizar por mayor tiempo. Los resultados muestran que

las levaduras analizadas en este estudio tuvieron mayor capacidad para formar biopelículas que las bacterias, las cuales fueron débiles productoras.

P. manshurica tuvo una fuerte capacidad de producir biopelícula en microplaca de poliestireno. Perpetuini *et al.* (2018), encontraron que 11 cepas de *P. manshurica* aisladas de vino fueron capaces de formar biopelícula en microplacas de poliestireno pero no se clasifican según los parámetros utilizados en este estudio.

Dos de los tres aislados de *S. cerevisiae* tuvieron baja o nula capacidad de producir biopelícula, pero uno de los aislados se clasificó como fuerte. Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Sidari *et al* (2014), quienes encontraron amplias respuestas en la capacidad de aislados de *S. cerevisiae* para formar biopelícula; algunos fueron no formadoras y otras fuertemente formadoras. En dicho estudio analizaron si esta propiedad era afectada por presencia de catequinas; encontrando que la mayoría de los aislados se vieron afectados en su capacidad para producir biopelícula por este factor. Lo anterior podría dar indicios sobre una posible explicación al fenómeno aquí observado, ya que en kombucha el té aporta catequina (Murugesan *et al.*, 2002). Ambos aislados de *H. opuntiae* (HO1 y HO2) tuvieron el mismo comportamiento en el experimento, al igual que los dos aislados de *Lachancea fermentati* (LF2 y LF3). HO1 Y HO2 fueron aislados con fuerte capacidad de producir biopelícula, mientras LF2 Y LF3 tuvieron una capacidad moderada. No se han encontrado estudios para contrastar los resultados aquí obtenidos de ninguna de las dos especies.

Se ha reportado que *L. mesenteroides* tiene la capacidad de producir glucansacarosas, polisacáridos de importancia para la formación de biopelículas. Los resultados obtenidos de la presente investigación son similares a los reportados en un estudio en donde se demostró que la producción de biopelícula por *L. mesenteroides* varía entre cepas de la misma especie (Leathers y Bischoff, 2011). En la presente investigación todos los aislados de *L. mesenteroides* fueron débiles productores de biopelícula. *W. viridiscens* no mostró capacidad de formar biopelícula en nuestro estudio, a diferencia de lo reportado por Gómez *et al.* (2016) quienes muestran una capacidad moderada por parte *W. viridiscens*.

Los dos aislados de *S. hominis* analizados se clasificaron como débiles productores de biopelícula. En un estudio anterior el 23.8 % de aislados del mismo género y especie mostraron

una débil capacidad para producir biopelícula pero la mayoría (47.6 %) mostraron una fuerte capacidad para producirla (Mendoza *et al.*, 2013)

11. CONCLUSIONES

Como resultado de los experimentos realizados en este trabajo se describieron los factores fisicoquímicos durante la fermentación de 240 horas en kombucha, se identificaron microorganismos que se desarrollan durante dicha fermentación y se generó información sobre el potencial de algunas de estos microorganismos como probióticos.

La temperatura, el tiempo, la presencia o ausencia de oxígeno y concentración de ácidos orgánicos son parámetros que influyen en la promoción o inhibición del crecimiento de algunos microorganismos.

Considerando una concentración de aproximadamente 1.82×10^7 UFC/mL de levaduras y de 5.25×10^6 UFC/mL de BAL al final de las 240 horas de fermentación de kombucha; en una botella de 355 mL existen un total de 6.49×10^9 UFC de levaduras y 1.86×10^9 UFC de BAL. Estas concentraciones rebasan las concentraciones establecidas para poder hacer uso de la declaración de propiedad “contiene probióticos”. Además, según los resultados obtenidos durante el presente trabajo, un promedio de 91.96% de la mezcla de levaduras potencialmente probióticas sobrevive a las condiciones del TGI, por lo que una botella contiene un aproximado de 5.94×10^9 UFC de levaduras que van a llegar vivas al colon. En el caso de las BAL, un promedio de 79.54 % son capaces de sobrevivir a las condiciones del TGI, representando un contenido aproximado de 1.48×10^9 UFC de BAL en una botella que capaces de llegar vivas al colon.

La mayoría de las levaduras estudiadas producen biopelícula en poliestireno, lo que da pauta a estudios posteriores que confirmen su capacidad de adherencia a las células intestinales y mayor tiempo de colonización.

La kombucha estudiada contiene una amplia diversidad de microorganismos que pueden proveer de un beneficio a la salud del consumidor. Cada probiótico cumple una función diferente en el organismo por lo que la variedad en el consumo de alimentos y bebidas fermentadas con la kombucha es importante para aprovechar de sus propiedades benéficas a la salud.

12. REFERENCIAS

- Abasolo, F. (2015). Selección y evaluación de bacterias del tracto digestivo del pectínido mano de león (*Nodipecten subnodosus*) y de la concha de nácar (*Pteria subnodosus*) con uso potencial probiótico en la acuicultura de bivalvos marinos. Centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C.
- Aoudia, N., Rieu, A., Briandet, R., Deschamps, J., Chluba, J., Jegou, G., Guzzo, J. (2016). Biofilms of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum*: Effect on stress responses, antagonistic effects on pathogen growth and immunomodulatory properties. *Food Microbiology*, 53, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.04.009>
- AOAC "Método oficial 942.15: Acidity (Titratable) of Fruit Products". *Official methods of analysis, 16th ed., 3a rev. Washington, D. C.: Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.)*, 1997.
- Beales, N. (2004). Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress.pdf. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3.
- Bellut, K., Krogerus, K., & Arendt, E. K. (2020). Lachancea fermentati Strains Isolated From Kombucha: Fundamental Insights, and Practical Application in Low Alcohol Beer Brewing. *Frontiers in Microbiology*, 11(April), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00764>
- Bergström, H. (2018). The effect of the fermented tea beverage kombucha on the gut microflora. *Lunds univeritet*.
- Boesch, C., Trček, J., Sievers, M., & Teuber, M. (1998). *Acetobacter intermedius*, sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 21(2), 220–229. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(98\)80026-X](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(98)80026-X)
- Bogdan, M., Justine, S., Camelia Filofteia, D., Călina Petruța, C., Gabriela, L., Elena Roxana, U., & Florentina, M. (2018). Lactic acid bacteria strains isolated from Kombucha with potential probiotic effect. *Romanian Biotechnological Letters*, 23(3), 13592–13598. Retrieved from www.srs.ebi.ac.uk
- Bonatsou, S., Karamouza, M., Zoumpopoulou, G., Mavrogonatou, E., Kletsas, D., Papadimitriou, K., ... Panagou, E. Z. (2018). International Journal of Food Microbiology Evaluating the probiotic potential and technological characteristics of yeasts implicated in cv. Kalamata natural black olive fermentation. 271(November 2017), 48–59.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.018>

- Castro-Rodríguez, D. C., Reyes-castro, L. A., Vega, C. C., & Rodríguez-gonzález, G. L. (2019). *Leuconostoc mesenteroides* subsp . *mesenteroides* SD23 Prevents Metabolic Dysfunction Associated with High-Fat Diet – Induced Obesity in Male Mice. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*.
- Castro, D., Hernández, H., & Yáñez, J. (2015). Probiotic Properties of *Leuconostoc mesenteroides* Isolated from Aguamiel of Agave salmiana. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 107–117. <https://doi.org/10.1007/s12602-015-9187-5>
- Chaia, A. P., Zárate, G., & Oliver, G. (1999). The probiotic properties of propionibacteria. *Lait*, 79(1), 175–185. <https://doi.org/10.1051/lait:1999114>
- Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D., & Gachhui, R. (2016). Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology*, 220, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015>
- Chen, C., & Liu, B. Y. (2000). Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 89(5), 834–839. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01188.x>
- Chenoll, E., Casinos, B., Bataller, E., Astals, P., Echevarría, J., Iglesias, J. R., Genovés, S. (2011). Novel probiotic *Bifidobacterium bifidum* CECT 7366 strain active against the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1335–1343. <https://doi.org/10.1128/AEM.01820-10>
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, 284, 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- Coton, M., Pawtowski, A., Taminau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloume-Labarthe, L., Coton, E. (2017). Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(5), 1–16. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix048>
- Cvetkovic, D., Markov, S., Djuric, M., Savic, D., & Velicanski, A. (2008). Specific interfacial area as a key variable in scaling-up Kombucha fermentation. *Journal of Food Engineering*, 85, 387–392. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.07.021>

- De La Fuente-Salcido, N. M., Castañeda-Ramírez, J. C., García-Almendárez, B. E., Bideshi, D. K., Salcedo-Hernández, R., & Barboza-Corona, J. E. (2015). Isolation and characterization of bacteriocinogenic lactic bacteria from M-Tuba and Tepache, two traditional fermented beverages in México. *Food Science and Nutrition*, 3(5), 434–442. <https://doi.org/10.1002/fsn3.236>
- Donlan, R. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. 8(9), 881–890. <https://doi.org/10.1007/s00330-013-2994-8>
- Dutta, D., & Gachhui, R. (2006). Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrogenifigens* sp. nov., isolated from Kombucha tea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(8), 1899–1903. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64101-0>
- Fakruddin, M., Hossain, M. N., & Ahmed, M. M. (2017). Antimicrobial and antioxidant activities of *Saccharomyces cerevisiae* IFST062013, a potential probiotic. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1591-9>
- FAO & OMS. (2006). Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación: Estudios FAO Alimentación y Nutrición, (85), 52. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0558-05.2005>
- Fletcher, E., Feizi, A., Bisschops, M. M. M., Hallström, B. M., Khoomrung, S., Siewers, V., & Nielsen, J. (2017). Evolutionary engineering reveals divergent paths when yeast is adapted to different acidic environments. *Metabolic Engineering*, 39, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.10.010>
- Fletcher, E., Feizi, A., Kim, S. S., Siewers, V., & Nielsen, J. (2015). RNA-seq analysis of *Pichia anomala* reveals important mechanisms required for survival at low pH. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0331-4>
- Foligné, B., Daniel, C., & Pot, B. (2013). Probiotics from research to market: The possibilities, risks and challenges. *Current Opinion in Microbiology*, 16(3), 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.06.008>
- FUFOSE, Europe, P. I., European, T., Concerted, C., Science, F. F., Europe, I., Group, T. (2018). Scientific Concepts of Functional Foods in Europe Consensus Document. *British Journal of Nutrition*, 81(1999), 1–27. <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S0007114599000471>
- Giles, M., Giovanni, J., García, S., Matus, V., Quintana, I. C., Bolívar, F., & Escalante, A. (2016). In vitro and in vivo probiotic assessment of *Leuconostoc mesenteroides* P45 isolated from

- pulque , a Mexican traditional alcoholic beverage. *SpringerPlus*.
<https://doi.org/10.1186/s40064-016-2370-7>
- Gómez, N. C., Ramiro, J. M. P., Quecan, B. X. V., & de Melo Franco, B. D. G. (2016). Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia coli* O157: H7 biofilms formation. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUN), 1–15.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00863>
- GVR. Grand View Research (2020). Kombucha Market Size Worth \$7.05 Billion By 2027. Market intelligence platform <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-kombucha-market> Fecha de consulta 5 mayo 2020.
- Guan, N., & Liu, L. (2020). Microbial response to acid stress: mechanisms and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(1), 51–65. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10226-1>
- Guo, Z. P., Khoomrung, S., Nielsen, J., & Olsson, L. (2018). Changes in lipid metabolism convey acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* 06 Biological Sciences 0601 Biochemistry and Cell Biology. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1295-5>
- Hekmat, S., & McMahon, D. J. (1992). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in Ice Cream for Use as a Probiotic Food. *Journal of Dairy Science*, 75(6), 1415–1422. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77895-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77895-3)
- Hesseltine, C. W. (1965). *Taylor & Francis, Ltd.* (Vol. 57).
<https://doi.org/10.1207/s1532690xcil602>
- Huang, Y., & Adams, M. C. (2004). *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 91(3), 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.07.001>
- Invernici, M. M., Salvador, S. L., Silva, P. H. F., Soares, M. S. M., Casarin, R., Palioto, D. B., Messoria, M. R. (2018). Effects of *Bifidobacterium* probiotic on the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(10), 1198–1210. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12995>
- Jayabalan, R., Marimuthu, S., & Swaminathan, K. (2007). Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*, 102, 392–398.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.032>

- Jayabalan, Rasu, Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., & Sathishkumar, M. (2014). A review on kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 538–550. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>
- Jia, S., Ou, H., Chen, G., Choi, D., Cho, K., Okabe, M., & Suk, W. (2004). Cellulose Production from *Gluconobacter oxydans* TQ-B2. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 9, 166–170.
- Kallel, L., Desseaux, V., Hamdi, M., Stocker, P., & Hassan, 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.018>
- Kim, S.-J., Ma, S.-J., & Kim, H.-L. (2005). Probiotic properties of lactic acid bacteria and yeast isolated from Korean traditional food, Jeot-gal. *Korean J. Food Preserv.*, 12(2), 184–189.
- Kos, B., Suskovic, J., Vukovic, S., Simpraga, M. ., Frece, J., & Matosic, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 981–987.
- Kumura, H., Tanoue, Y., Tsukahara, M., Tanaka, T., & Shimazaki, K. (2004). Screening of Dairy Yeast Strains for Probiotic Applications. *Journal of Dairy Science*, 87(12), 4050–4056. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73546-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73546-8)
- Lara-Hidalgo, C. E., Dorantes-Álvarez, L., Hernández-Sánchez, H., Santoyo-Tepole, F., Martínez-Torres, A., Villa-Tanaca, L., & Hernández-Rodríguez, C. (2019). Isolation of Yeasts from Guajillo Pepper (*Capsicum annum* L.) Fermentation and Study of Some Probiotic Characteristics. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(3), 748–764. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9415-x>
- Le, B., & Yang, S. H. (2018). Isolation of *Weissella* strains as potent probiotics to improve antioxidant activity of salted squid by fermentation. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 61(1), 93–100. <https://doi.org/10.3839/jabc.2018.014>
- Leathers, T. D., & Bischoff, K. M. (2011). Biofilm formation by strains of *Leuconostoc citreum* and *L. mesenteroides*. *Biotechnology Letters*, 33(3), 517–523. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0450-2>

- Lee, S. & Kim, M. (2019). *Leuconostoc mesenteroides* MKSR isolated from kimchi possesses α -glucosidase inhibitory activity, antioxidant activity, and cholesterol-lowering effects. *LWT - Food Science and Technology*, 116(August), 108570. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108570>
- Lewandowski, Z., Stoodley, P., & Altobelli, S. (1995). Experimental and conceptual studies on mass transport in biofilms. *Water Science and Technology*, 31(1), 153–162. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(95\)00163-H](https://doi.org/10.1016/0273-1223(95)00163-H)
- Liu, C. H., Hsu, W. H., Lee, F. L., & 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(6), 407–415. <https://doi.org/10.1006/fmic.1996.0047>
- Loncar, E., Djuric, M., Malbasa, R., Kolarov, L., & Klasnja, M. (2006). Influence of working conditions upon kombucha conducted fermentation of black tea. *Food and Bioprocess Technology*, 84(C3), 186–192.
- Ma, Y., Liu, Z., Yang, Z., Bao, P., Zhang, C., & Ding, J. (2014). Effects of *Hanseniaspora opuntiae* C21 on the growth and digestive enzyme activity of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 32(4), 743–748. <https://doi.org/10.1007/s00343-014-3304-2>
- Ma, Y., Liu, Z., Yang, Z., Li, M., Liu, J., & Song, J. (2013). Effects of dietary live yeast *Hanseniaspora opuntiae* C21 on the immune and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 34(1), 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.10.005>
- Marsh, A. J., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2014). Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. *Trends in Food Science and Technology*, 38(2), 113–124. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.05.002>
- Marsh, A. J., Sullivan, O. O., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2013). Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiology*, 38, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.003>
- Martínez, J., Valenzuela, L., Jayabalan, R., Huerta, J., & Escalante Anayansi. (2018). A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CYTA - Journal of Food*, 16(1), 390–399. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1410499>
- Mataix, J. & Carazo, E. (2005) *Nutrición para educadores segunda edición*. Fundación

Universitaria Iberoamericana. Ediciones Diaz de Santos. ISBN: 84-7978-676-0

- Mendoza-Olazarán, S., Morfin-Otero, R., Rodríguez-Noriega, E., Llaca-Díaz, J., Flores-Treviño, S., González-González, G. M., Garza-González, E. (2013). Microbiological and Molecular Characterization of *Staphylococcus hominis* Isolates from Blood. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061161>
- Milla, C. B., Baffi, A., & Da-silva, E. G. R. (2013). Yeast Diversity Isolated from Grape Musts During Spontaneous Fermentation from a Brazilian Winery. 356–361. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0375-9>
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. *Food and Function*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
- Monroe D (2007) Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLOS Biology* 5(11): e307. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050307>
- Murugesan, G. S., Angayarkanni, J., & Swaminathan, K. (2002). Effect of tea fungal enzymes on the quality of black tea. *Food Chemistry*, 79(4), 411–417. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00157-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00157-7)
- Nayak, S. K. (2011). Biology of Eukaryotic Probiotics. In: Liong MT. (eds) Probiotics. *Microbiology Monographs. Springer*, 21, 29–55. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-642-20838-6_2
- Neffe-Skocinska, K., Sionek, B., Scibisz, I., & Kilozyn-Krajewska, K. (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.
- NOM-111-1994 "NORMA Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos". *Diario Oficial de la Federación*, 1995.
- NOM-210-SSA "NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos". *Diario Oficial de la Federación*, 2015.
- NOM-218-SSA1-2011 "NORMA Oficial Mexicana NOM-218-SSA1-2011, Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias.

- Métodos de prueba". *Diario Oficial de la Federación*, 2011.
- NOM-243-SSA1-2010. "NORMA Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba". *Diario Oficial de la Federación*, 2010.
- NOM-086-SSA1-1994, Bienes y servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales. *Diario Oficial de la federación*, 1994.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). Probiotics: An overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 82(1–4), 279–289. <https://doi.org/10.1023/A:1020620607611>
- Pavlovic, N., Stankov, K., & Mikov, M. (2012). Probiotics — Interactions with Bile Acids and Impact on Cholesterol Metabolism. 1880–1895. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9904-4>
- Perpetuini, G., Tittarelli, F., Schirone, M., Di Gianvito, P., Corsetti, A., Arfelli, G., Tofalo, R. (2018). Adhesion properties and surface hydrophobicity of *Pichia manshurica* strains isolated from organic wines. *LWT - Food Science and Technology*, 87, 385–392. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.011>
- Puspawati, N., & Arihanatana, I. (2016). Viability of Lactic Acid Bacteria Isolated from Kombucha Tea Against Low pH and Bile Salt Ketahanan Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Teh Kombucha terhadap pH Rendah dan Garam Empedu. *Media Ilmiah Teknologi Pangan (Scientific Journal of Food Technology)*, 3(1), 18–25.
- Rahman, M. (2007) *Hadbook of food prservation*. Second edition. CRC Press, Tylor & Francis Group ISBN: 978-1-57444-606-7.
- Ren, D., Stenlokke, J., de la Cruz, C., Bergmark, L., Sorensen, S., Burmolle, M. (2013) High-Throughput screening of multispecies biofilm formation and quantitative PCR-Based assessment of individual species proportions, usefl for exploring interespecific bacterial interacitions. *Microb. Ecol.* DOI 10.1007/s00248-013-0315-z
- Shukla, R., Iliev, I., & Goyal, A. (2014). *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149 as probiotic and its dextran with anticancer properties. *J.BioSci. Biotech*, 3(1), 79–87.
- Sidari, R., Caridi, A., & Howell, K. (2014). Wild *Saccharomyces cerevisiae* strains display

- biofilm-like morphology in contact with polyphenols from grapes and wine Rossana. *International Journal of Food Microbiology*, 146–152.
- Sievers, M., Lanini, C., Weber, A., Schuler-Schmid, U., & Teuber, M. (1995). Microbiology and Fermentation Balance in a Kombucha Beverage Obtained from a Tea Fungus Fermentation. *Systematic and Applied Microbiology*, 18(4), 590–594. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80420-0](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80420-0)
- Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, T., Frengova, G., & Spasov, Z. (2002). Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000186>
- Sinisa, M., Malbasa, R., Hauk, M., & Cvetkovic, D. (2001). Investigation of Tea Fungus Microbe Associations. *Udc*, 32(vi), 133–138.
- Sreeramulu, G., Zhu, Y., & Knol, W. (2000). Kombucha Fermentation and Its Antimicrobial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2589–2594.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Branislava, S., & Svabic, M. (2000). A modified microtiter - plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40, 175–179. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6)
- Sung, C., Kim, B. G., Kim, S., Joo, H. S., & Kim, P. I. (2010). Probiotic potential of *Staphylococcus hominis* MBBL 2-9 as anti-*Staphylococcus aureus* agent isolated from the vaginal microbiota of a healthy woman. *Journal of Applied Microbiology*, 108(3), 908–916. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04485.x>
- Terraf, M. C. L., Juárez Tomás, M. S., Nader-Macías, M. E. F., & Silva, C. (2012). Screening of biofilm formation by beneficial vaginal lactobacilli and influence of culture media components. *Journal of Applied Microbiology*, 113(6), 1517–1529. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05429.x>
- Tuomola, E. M., Ouwehand, A. C., & Salminen, S. J. (1999). The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 26(2), 137–142. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(99\)00131-5](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(99)00131-5)
- Tur, J. & Bibiloni, M. (2016). Functional foods. In *Encyclopedia of Food and Health* (1st ed., pp. 157–161). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384731-7.00172-0>
- Valdovinos, M. A., Montijo, E., Abreu, A. T., Heller, S., González-Garay, A., Bacarreza, D.,

- Guarner, F. (2017). Consenso mexicano sobre probióticos en gastroenterología. *Revista de Gastroenterologia de Mexico*, 82(2), 156–178. <https://doi.org/10.1016/j.rgm.2016.08.004>
- Valera, M. J., Torija, M. J., Mas, A., & Mateo, E. (2015). Cellulose production and cellulose synthase gene detection in acetic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(3), 1349–1361. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6198-1>
- van der Aa Kühle, A., Skovgaard, K., & Jespersen, L. (2005). *In vitro* screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 101(1), 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.039>
- Waterman, S. R. (1998). Acid-Sensitive Enteric Pathogens Are Protected from Killing under Extremely Acidic Conditions of pH 2.5 when They Are Inoculated onto Certain Solid Food Sources. *Journal of Food Protection*, 61(10), 3882–3886.
- Xing, Z., Tang, W., Geng, W., Zheng, Y., & Wang, Y. (2017). *In vitro* and *in vivo* evaluation of the probiotic attributes of *Lactobacillus kefirifaciens* XL10 isolated from Tibetan kefir grain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(6), 2467–2477. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7956-z>
- Yahav, S., Berkovich, Z., Ostrov, L., Reifen, R., Shemesh, M. (2018). Encapsulation of beneficial probiotic bacteria in extracellular matrix from biofilm-forming *Bacillus subtilis*. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1476373>
- Zhu, H., Hart, C. A., Sales, D., & Roberts, N. B. (2006). Bacterial killing in gastric juice – effect of pH and pepsin on *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori*. *Journal of Microbiology Methods*, 67(2), 1265–1270. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46611-0>