



# ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



**“Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas en dos variedades de SCOBY de Kombucha (*Medusomyces gisevi*) desarrollados a partir de té de dos especies vegetales, té negro (*Camellia sinensis*) y guayusa (*Ilex guayusa*), para su aplicación como agente antimicrobiano”**

**Autoras:** Cando Merino, Wendy Carolina  
Curipoma Vergara, Karol Jaine

**Tutora:** Ph.D. Sánchez Llaguno, Sungey Naynee  
**Cotutor:** Ph.D. Neira Mosquera, Juan Alejandro

Santo Domingo, Ecuador  
2022

# INTRODUCCIÓN



Es una bebida fermentada a base de especies vegetales y sustratos (sacarosa) los cuales confieren su sabor característico.



**Su origen**



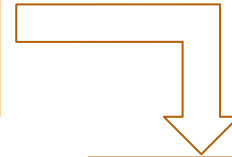
Manchuria



**Contiene**



- Vitaminas B, C, D, E, K
- Ácidos orgánicos
- Minerales: Fe, Mn, Zn.



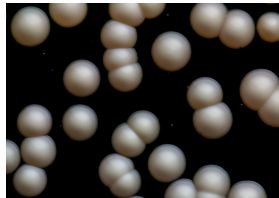
**Propiedades**



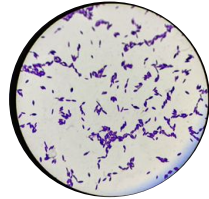
- Desintoxicantes
- Probióticas
- Energizantes
- Digestivas



Contiene una biopelícula de celulosa conocida como SCOBY.



**Symbiotic Colony of Bacteria and yeast**



# OBJETIVOS

## Objetivo General

Aislar y caracterizar de bacterias ácido lácticas en dos variedades de SCOBY de Kombucha (*Medusomyces gisevi*) desarrollados a partir de té de dos especies vegetales, té negro (*Camellia sinensis*) y guayusa (*Ilex guayusa*), para su aplicación como agente antimicrobiano.

## Objetivos Específicos

Aislar microorganismos presentes en las dos variedades de SCOBY de Kombucha (*Medusomyces gisevi*) desarrolladas a partir de té negro (*Camellia sinensis*) y guayusa (*Ilex guayusa*).

Identificar y caracterizar microorganismos presentes en la Kombucha (*Medusomyces gisevi*) a partir de té negro (*Camellia sinensis*) y guayusa (*Ilex guayusa*).

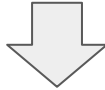
Evaluar la actividad microbiana de las bacterias ácido lácticas obtenidas en el SCOBY de Kombucha frente a microorganismos.

Observar el crecimiento de distintos microorganismos mediante pruebas de detección conocidas como petrifilm para bacterias aerobias, mohos y levaduras.



# HIPÓTESIS

## Hipótesis Nula



- No existe presencia de bacterias ácido lácticas en SCOBY de Kombucha.
- No hay inhibición de microorganismos patógenos.
- No existe presencia de bacterias aerobias.
- No existe presencia de mohos y levaduras.

## Hipótesis Alternativa

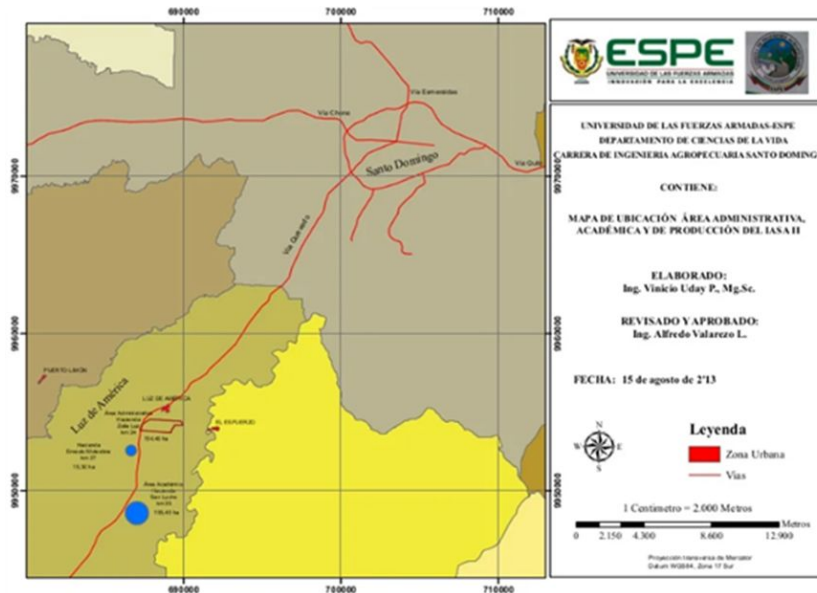


- Si existe presencia de bacterias ácido lácticas en SCOBY de Kombucha.
- Hay inhibición de microorganismos patógenos.
- Si hay presencia de bacterias aerobias.
- Si hay presencia de mohos y levaduras.



# MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 3 Ubicación geográfica donde se realizó la investigación



## Ubicación política

<b>País</b>	:	Ecuador
<b>Provincia</b>	:	Santo Domingo de los Tsáchilas
<b>Cantón</b>	:	Santo Domingo de los Colorados
<b>Parroquia</b>	:	Luz de América
<b>Dirección</b>	:	Santo Domingo-Vía Quevedo km 24 margen izquierdo

## Ubicación ecológica

<b>Zona de Vida</b>	:	Bosque húmedo tropical
<b>Altitud</b>	:	224 msnm
<b>Precipitación</b>	:	2860 mm año
<b>Humedad relativa</b>	:	85%

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Diseño Experimental

### Diseño A\*B

- **Parametros Físico-químicos**
- **Petrifilm**

Factores y Niveles del experimento:

Factores	Niveles
Kombucha (SCOBY) tipo I (A)	A0
Komucha (SCOBY) tipo II (A)	A1
	B0: té negro
Especies vegetales (B)	B1: Guayusa

Tratamientos a comparar:

Tratamiento	Interacción	Combinación
T1	A0B0	Kombucha tipo I+ té negro
T2	A0B1	Kombucha tipo I + té de guayusa
T3	A1B0	Kombucha tipo II+ té negro
T4	A1B1	Kombucha tipo II + té de guayusa

**Tipo de diseño**  
Modelo factorial (2x2)  
conducido en D.B.C.A.



**Repeticiones**  
Cinco repeticiones por  
cuatro tratamiento



**Unidades Experimentales**  
20



**Análisis funcional**  
Prueba de significancia de  
Tukey al 5% ( $p < 0.05$ )



# MATERIALES Y MÉTODOS

## Preparación del té de Kombucha



1

Preparación de infusiones



2

Infusiones de especies vegetales



3

Adquisición de cultivo iniciador



4

Colocación de cultivo iniciador



5

Colocación de té



6

Sellado de muestras de té



7

Muestras de té listas para fermentación



8

Muestras selladas y cubiertas de exposición a luz



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Pruebas fisicoquímicas

### ➤ Determinación de sólidos solubles



### ➤ pH



### ➤ Acidez titulable

$$A = \frac{(V1N1) 10}{V2}$$



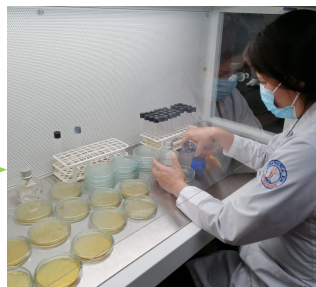


# MATERIALES Y MÉTODOS

## Siembra y aislamiento de microorganismos



Preparación de medio



Dispensación de medio



Adquisición de microorganismos



Siembra de microorganismos



Sellado de muestras



Rotulado y sellado de muestras



Repique de microorganismos



Aislado de microorganismos

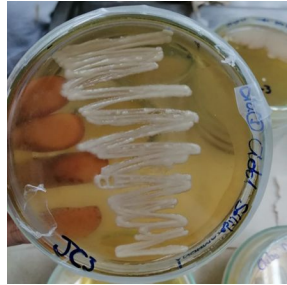


Muestras obtenidas

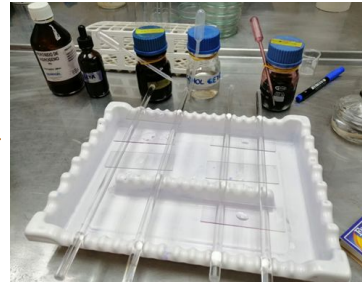


# MATERIALES Y MÉTODOS

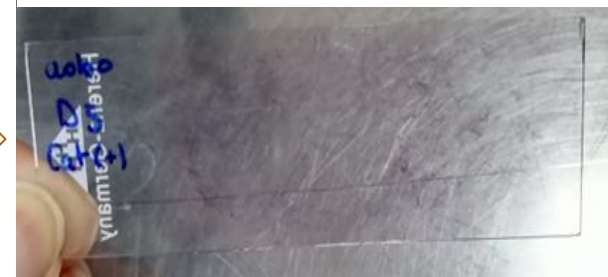
## Identificación microbiológica



Adquisición de muestra



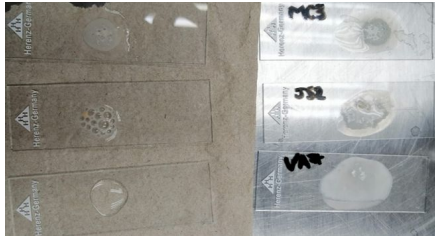
Tinción Gram



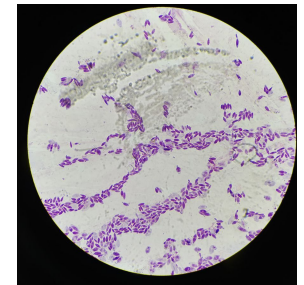
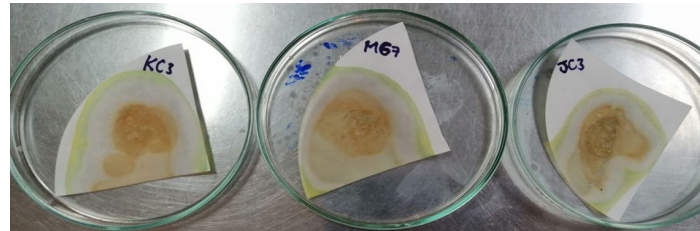
Muestra teñida



Prueba de catalasa



Prueba de oxidasa

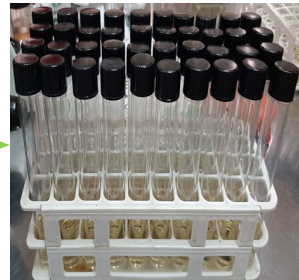


# MATERIALES Y MÉTODOS

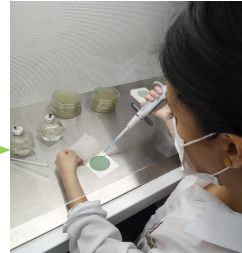
## Siembra en petrifilm y conteo de UFC de microorganismos



Muestra de tratamientos

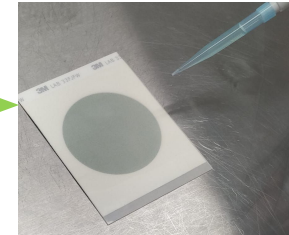


Agua peptona



Aplicación de muestra microbiana

Bacterias ácido lácticas



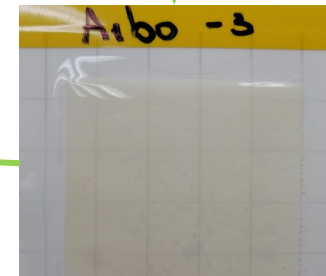
Mohos y levaduras



Conteo de UFC



Crecimiento de UFC

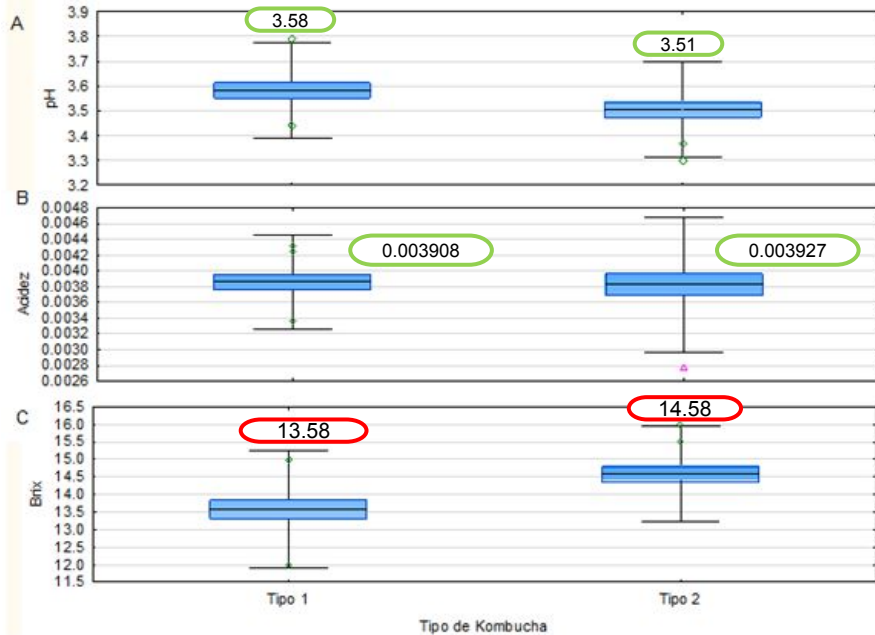


Bacterias aerobias

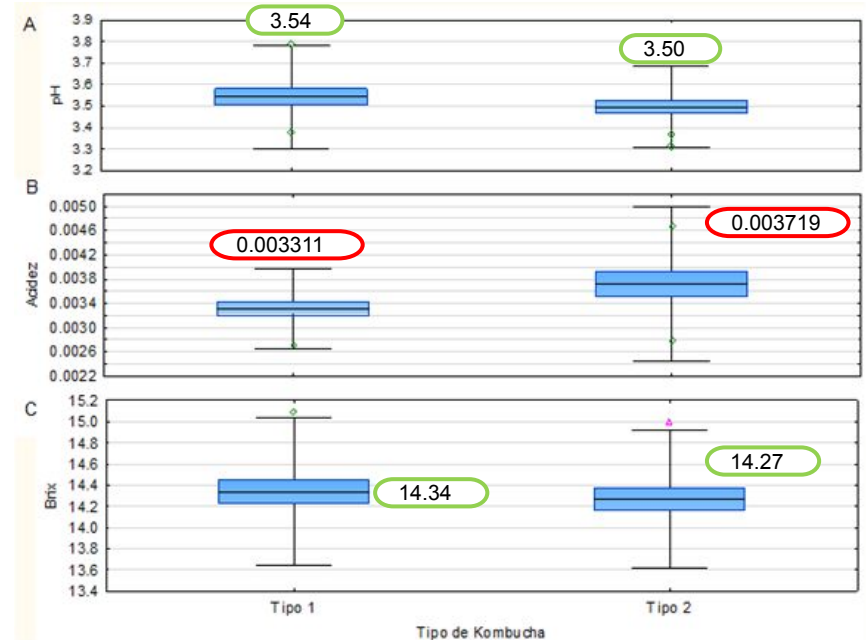


# RESULTADOS

Factor A (Tipo de Kombucha) con parámetros (pH, acidez y grados Brix) en el día 3

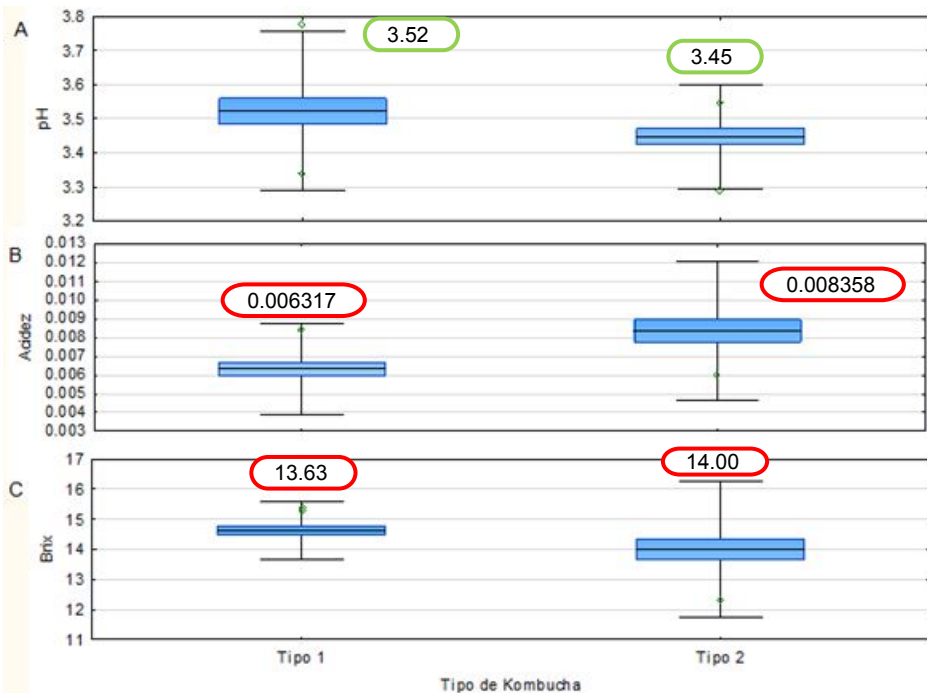


Factor A (Tipo de Kombucha) con parámetros (pH, acidez y grados Brix) en el día 5



# RESULTADOS Y DISCUSIONES

## Factor A (Tipo de Kombucha) con parámetros (pH, acidez y grados Brix) en el día 7



Vázquez (2021) menciona que cada tipo de Kombucha, está relacionada con el proceso de fermentación y la actividad metabólica de los microorganismos.

Según Jakubczyk et al. (2020) la reducción del pH se debe a la dominancia del ácido acético en la fermentación.

Granda & Estupiñan (2019) destacan que el pH no debe ser menor que 3 ya que causaría daño al tracto digestivo.



# RESULTADOS Y DISCUSIONES

## Acidez en Factor A (Tipo de Kombucha) para los días 3, 5 y 7

Según Guzmán (2021) los cambios de acidez en Kombucha se deben a las poblaciones microbianas, lo cual explica el cambio a partir del día 5.

Livisaca (2021) indica que cuando hay presencia de levaduras se da la transformación de sacarosa en alcohol y este es convertido en ácido acético por acción de bacterias.



# RESULTADOS Y DISCUSIONES

Según Solis & Zambrano (2021) los grados Brix se obtienen por la cantidad de sólidos disueltos en el medio.

**Grados Brix en Factor A (Tipo de Kombucha) para los días 3, 5 y 7**

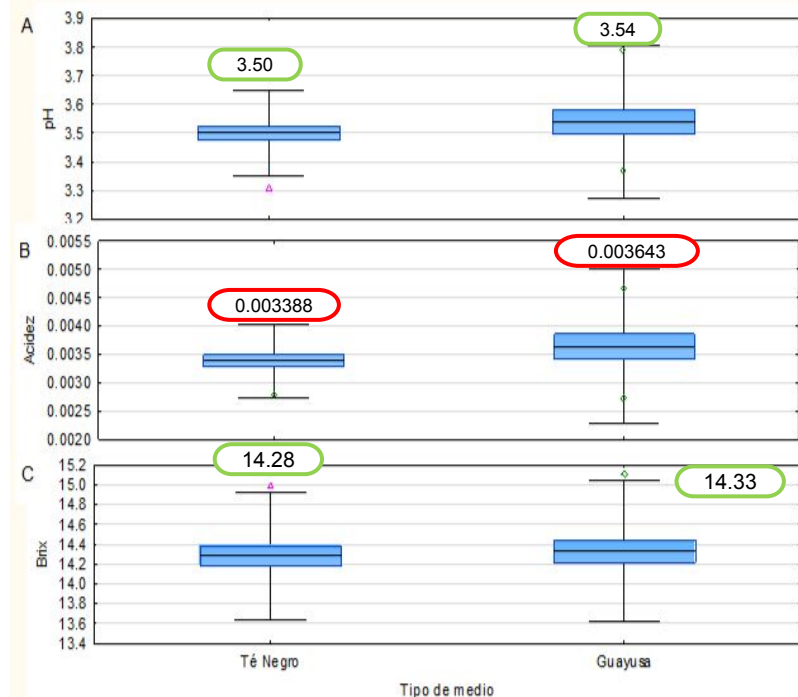
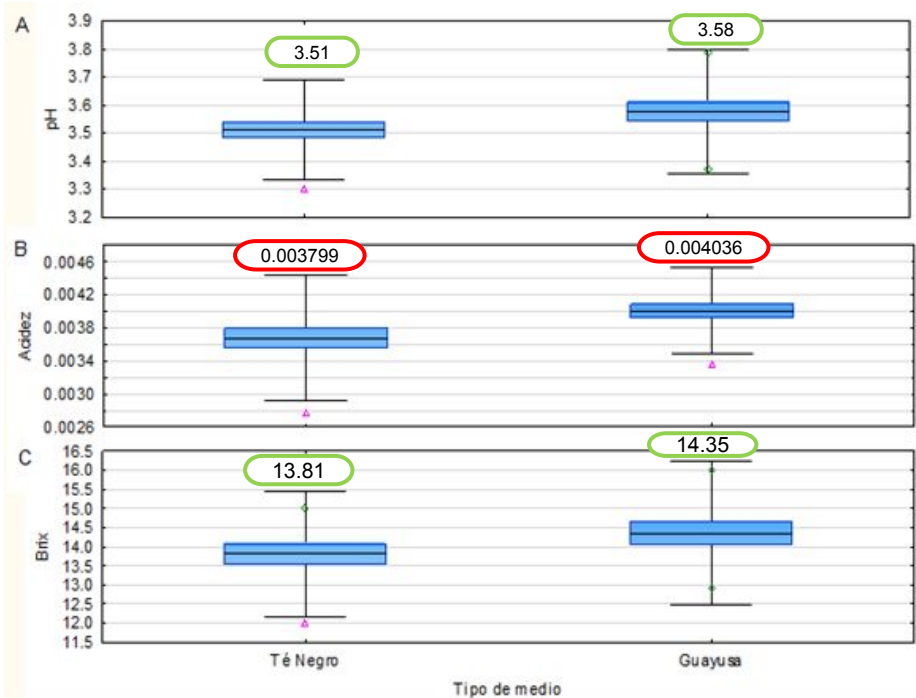
Jakubczyk et al. (2020) mencionan que a partir del día 7 se da un cambio de dominio de levaduras a BAL, lo cual incide en los grados Brix.

Livisaca (2021) menciona que las levaduras tienen especial especificidad por la sacarosa y su consumo tiene influencia en los grados brix del medio.



# RESULTADOS Y DISCUSIONES

Factor B (Tipo de especie vegetal) con parámetros (pH, acidez y grados Brix) en el día 3 y 5



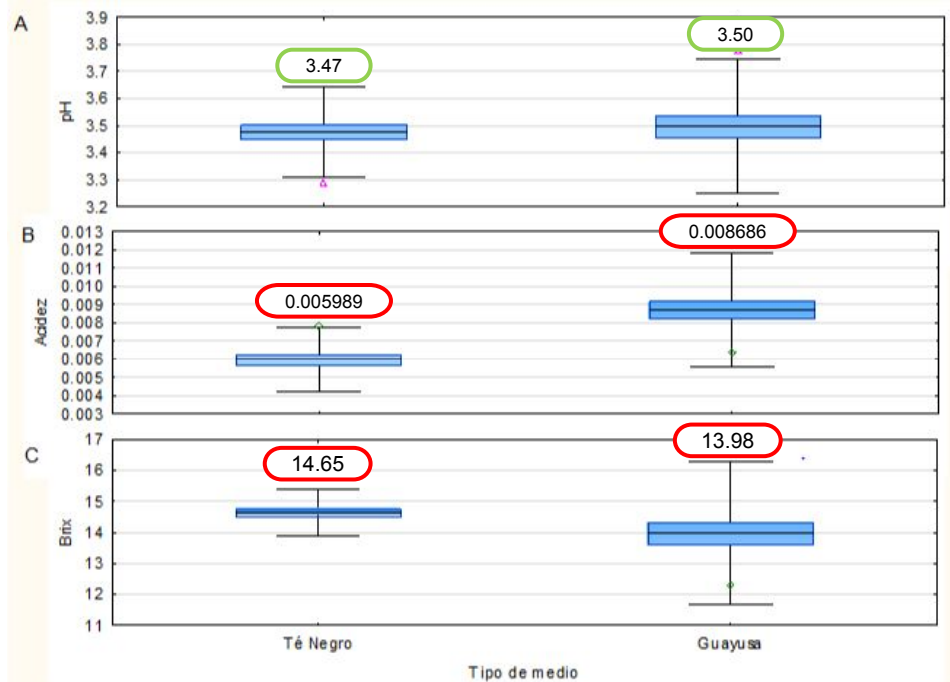
Tipo de medio





# RESULTADOS Y DISCUSIONES

**Factor B (Tipo de especie vegetal) con parámetros (pH, acidez y grados Brix) en el día 7**



## pH en Factor B

Los valores obtenidos se semejan con los de Moya (2020) tanto para el té negro como para guayusa en sus días 3 y 7.

Morales (2014) menciona que la diferencia de pH se atribuye a la cantidad de fenolasas que posee el té negro; ya que trabajan sobre la oxidación de polifenoles.

Esto explica la ligera variación entre el pH de la Kombucha con té negro frente al pH de la bebida de té de guayusa.



# RESULTADOS Y DISCUSIONES

**Acidez en Factor B (Tipo de especie vegetal) para los días 3, 5 y 7**



Los valores obtenidos al corte de la fermentación son distintos a los planteados por Moya (2020) de 0.14 y 0.51 para té negro y para guayusa de 0.09 y 0.32.

**Grados Brix en Factor A (Tipo de Kombucha) para los días 3, 5 y 7**



El valor obtenido en el té negro se relaciona al obtenido por Moya (2020).

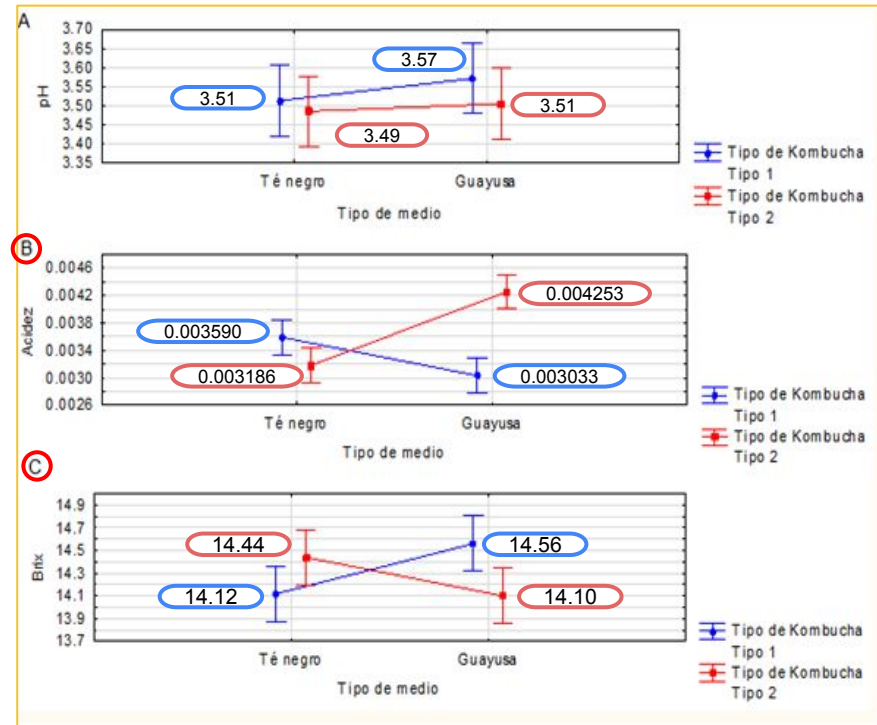
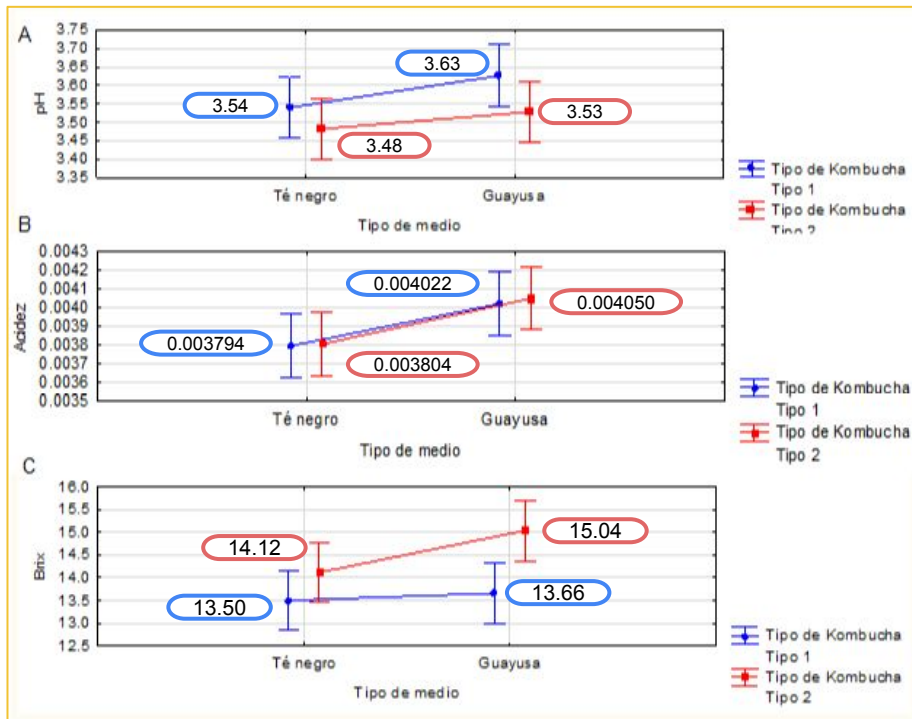


Las diferencias en los grados Brix se debe a fracciones de sacarosa que aún no se han hidrolizado esto de acuerdo a lo planteado por Novillo (2021)



# RESULTADOS Y DISCUSIONES

## Interacción A\*B en el día 3 y 5



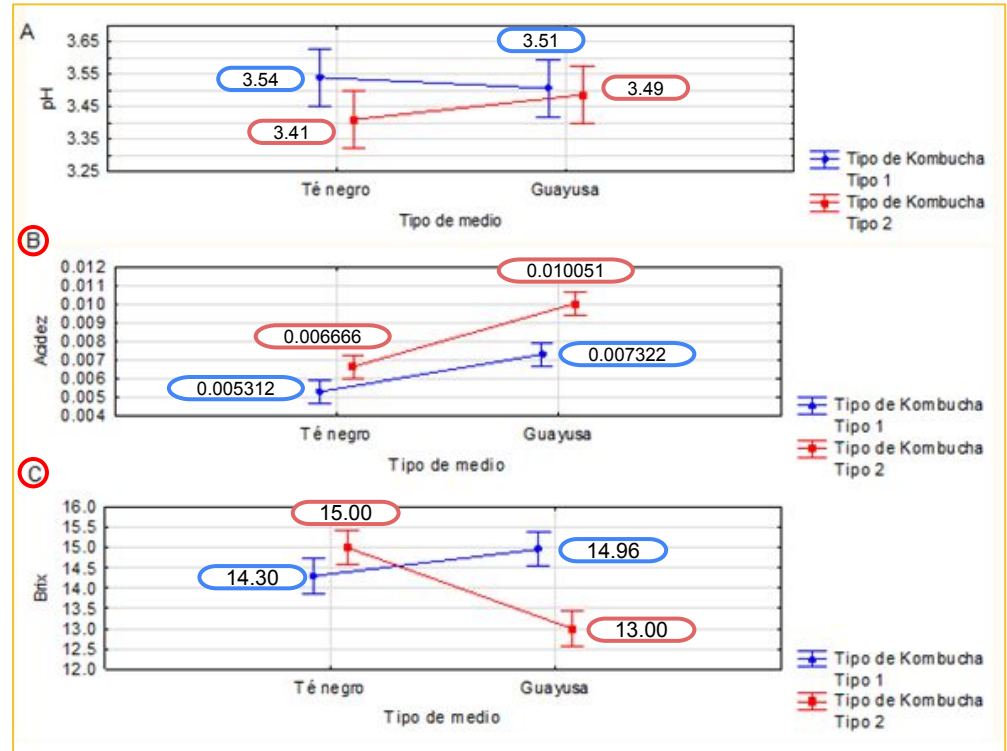
# RESULTADOS Y DISCUSIONES

## Interacción A\*B en el día 7

### pH en Interacción A\*B

Los valores de pH obtenidos en las interacciones con Kombucha tipo 1 se encuentran dentro del rango de valores de pH óptimo de 3.5 a 4.5 que sugiere Bustillos (2011).

Livisaca (2021) señala que la Kombucha a un pH de 3.5 se la embotella y refrigera o se continúa con una segunda fermentación con pulpas de fruta.



# RESULTADOS Y DISCUSIONES

## Acidez en Interacción A x B para los días 3, 5 y 7



La interacción de Kombucha tipo 1 con té negro es más ácida, esto gracias a la producción de ácidos orgánicos hasta el día 7.



De acuerdo a Suhre (2020) son los ácidos glucónico y acético los que confieren el sabor más ácido y astringente en la Kombucha.

## Grados Brix en Interacción A x B para los días 3, 5 y 7



Se obtuvo menor valor de grados Brix en la interacción de Kombucha tipo 2 con guayusa (13) para el día 7.

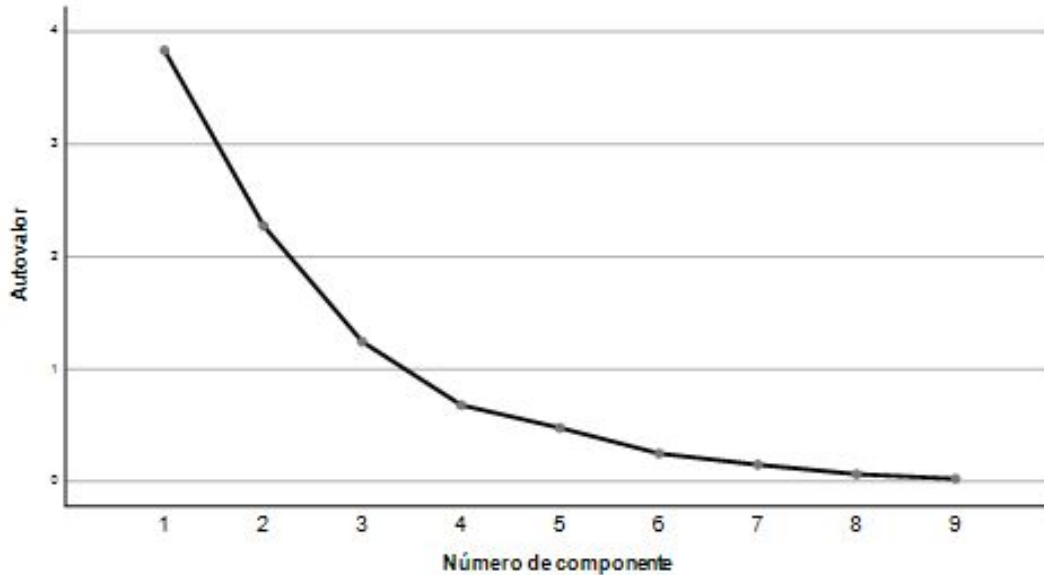


Según la norma INEN 2304:2017:-04 el valor máximo para este tipo de bebida es hasta los 15° Brix para el consumo humano (INEN, 2017).



# RESULTADOS Y DISCUSIONES

## Interacción A x B



Se identifica los tres componentes principales encontrados:



Donde:

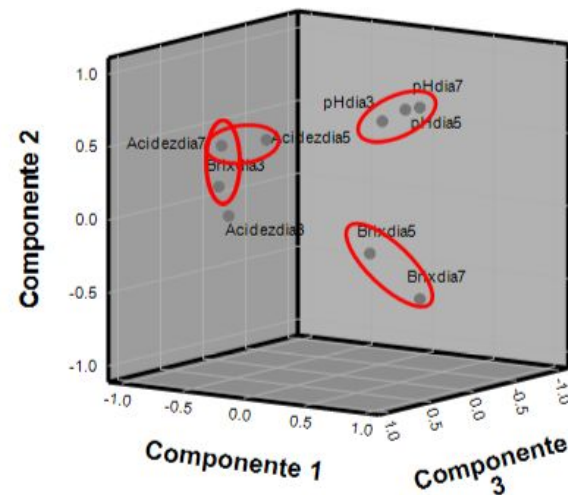
- El componente 1 aporta a la reducción 42.6%.
- El componente 2 aporta 25.30%.
- El componente 3 aporta 13.82 %
- Explica el 81.72% del total del experimento en un gráfico tridimensional



# RESULTADOS Y DISCUSIONES

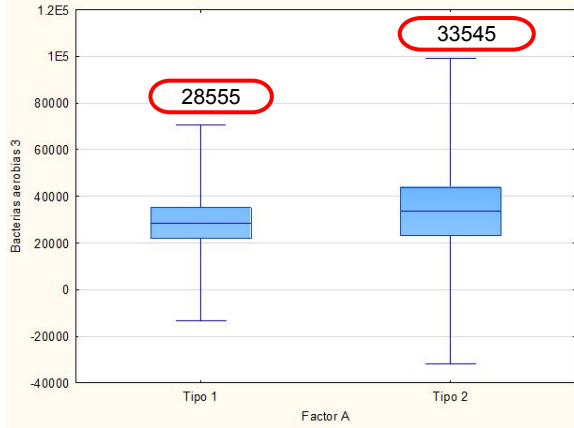
## Análisis de componentes principales

	pH día 3	Acidez día 3	pH día 5	Acidez día 5	pH día 7	Acidez día 7	Brix día 3	Brix día 5	Brix día 7
pH día 3	1.000	-.058	.873	-.316	.673	-.029	-.139	.282	.127
Acidez día 3	-.058	1.000	-.268	.180	-.207	.453	.346	-.085	-.223
pH día 5	.873	-.268	1.000	-.229	.809	-.037	-.222	.263	.126
Acidez día 5	-.316	.180	-.229	1.000	-.001	.642	.498	-.656	-.876
pH día 7	.673	-.207	.809	-.001	1.000	-.154	-.424	.145	.007
Acidez día 7	-.029	.453	-.037	.642	-.154	1.000	.634	-.245	-.701
Brix día 3	-.139	.346	-.222	.498	-.424	.634	1.000	-.275	-.573
Brix día 5	.282	-.085	.263	-.656	.145	-.245	-.275	1.000	.599
Brix día 7	.127	-.223	.126	-.876	.007	-.701	-.573	.599	1.000

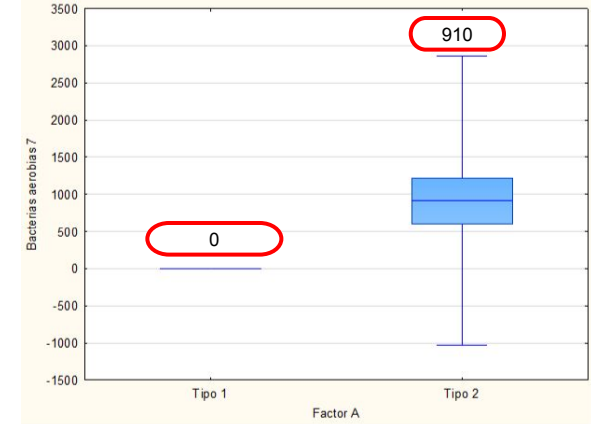
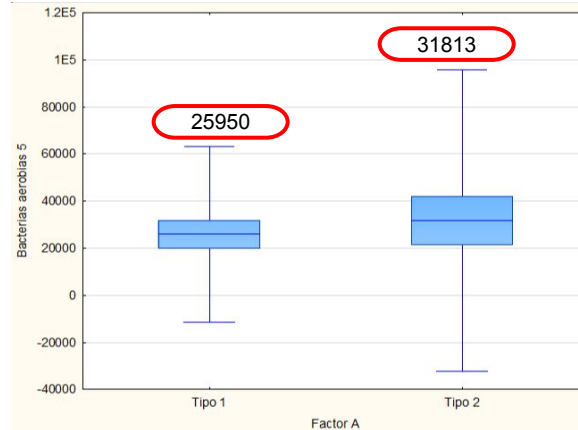


# RESULTADOS Y DISCUSIONES

## Factor A (Tipos de Kombucha) para UFC de bacterias aerobias



Los resultados se asemejan a lo reportado por Morales (2014).



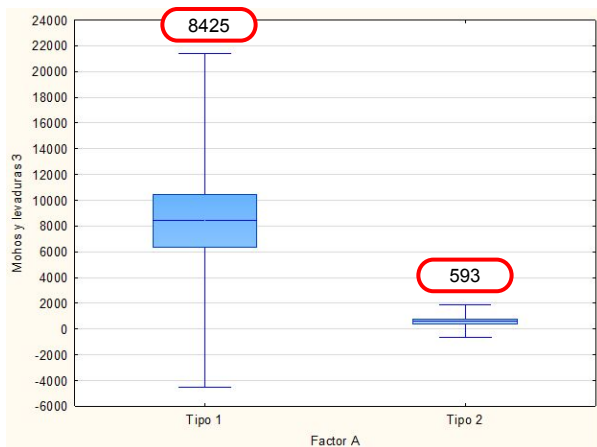
Watawana et al. (2015) mencionan que la reducción de las poblaciones de microorganismo aerobios está relacionado con el nivel de acidez.



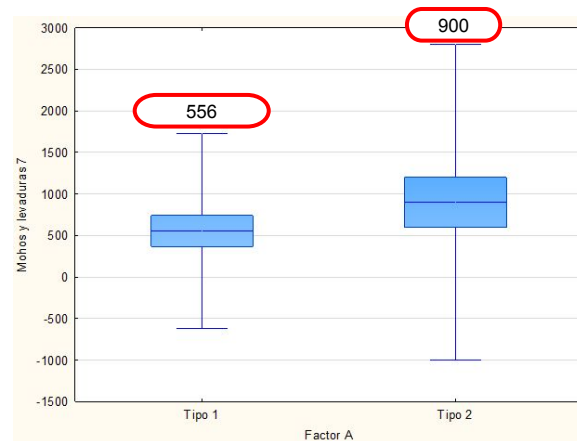
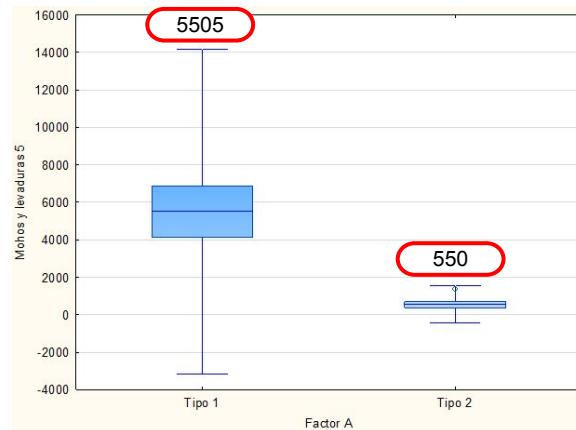


# RESULTADOS Y DISCUSIONES

## Factor A (Tipos de Kombucha) para UFC de mohos y levaduras



Morales (2014) encontró valores similares en el día 7.

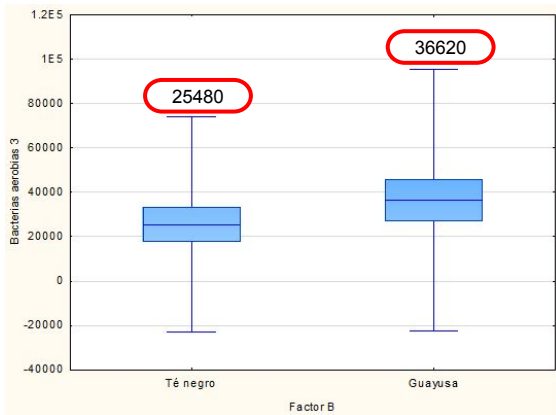


Tan et al. (2020) mencionan que la reducción de azúcar es por la presencia de levaduras.

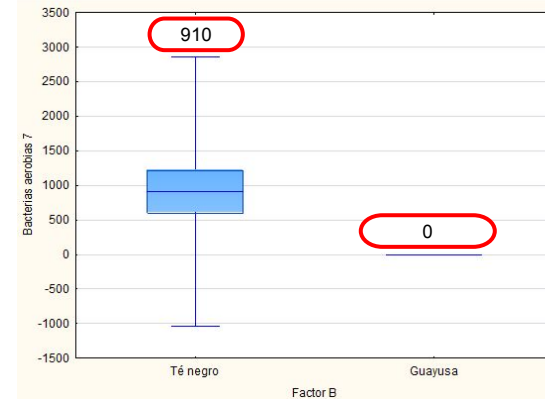
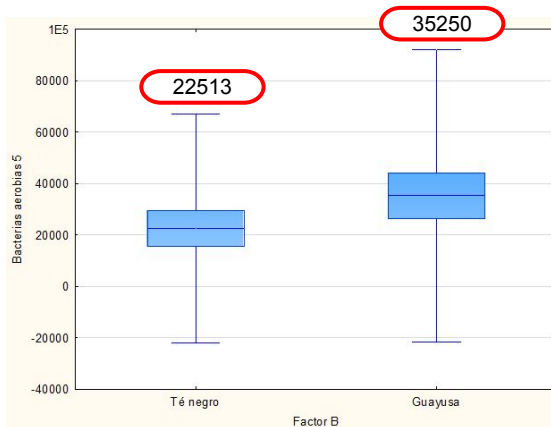


# RESULTADOS Y DISCUSIONES

## Factor B (Tipo de especie vegetal) para UFC bacterias aerobias



Los resultados no se diferencian de lo reportado por Morales (2014).

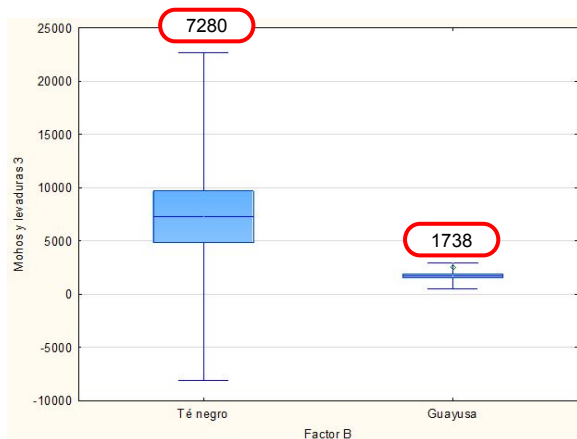


Según el Instituto Danone (2020) explica que la fermentación a través de las bacterias ácido lácticas.

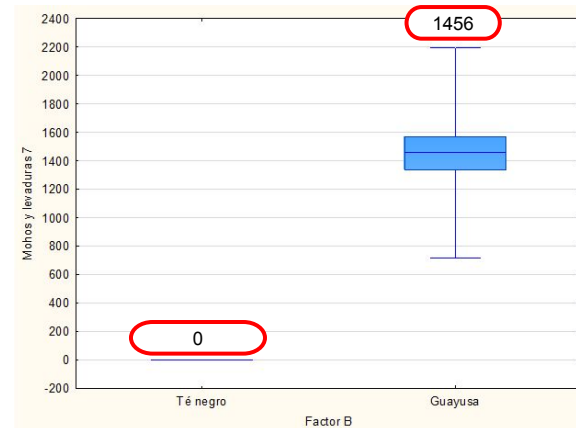
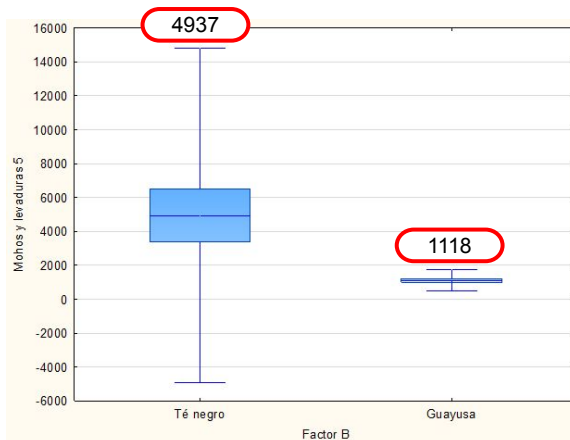


# RESULTADOS Y DISCUSIONES

## Factor B (Tipo de especie vegetal) para UFC de mohos y levaduras



Instituto Danone (2020) menciona la existencia de BAL y levaduras

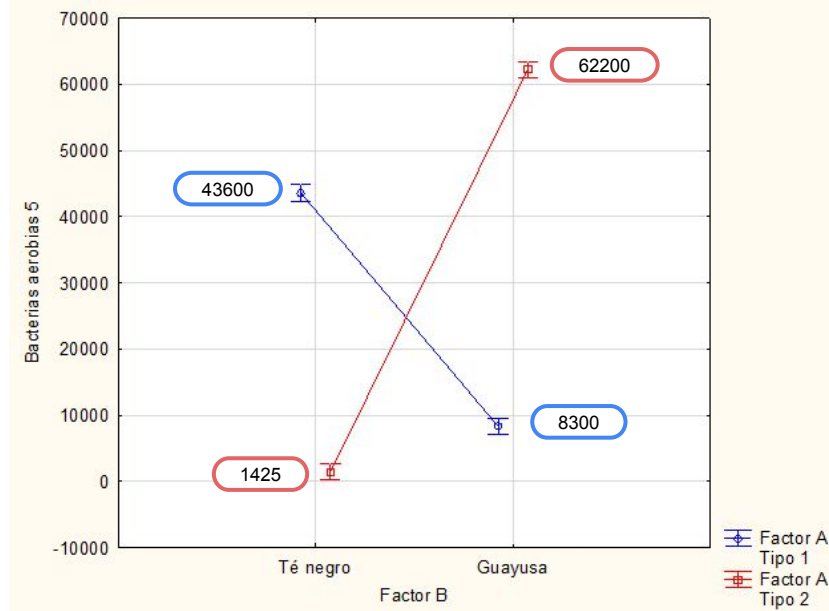
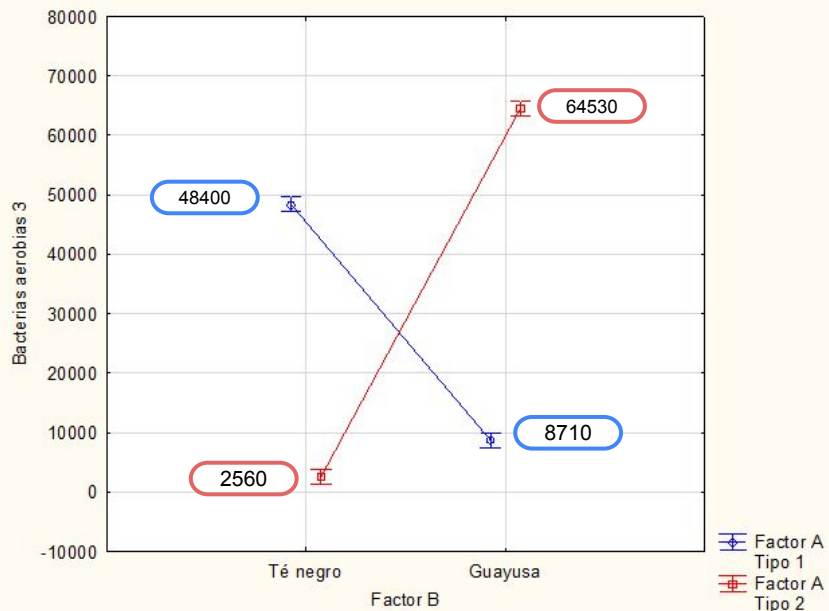


- Granda & Estupiñan (2019) - Kombucha a base de guayusa.
- Morales (2014) - Kombucha a base de té negro.



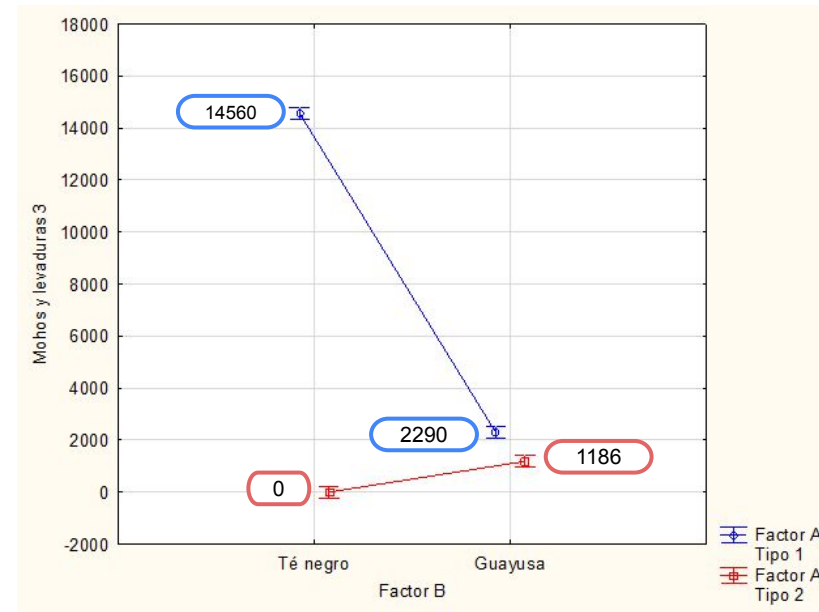
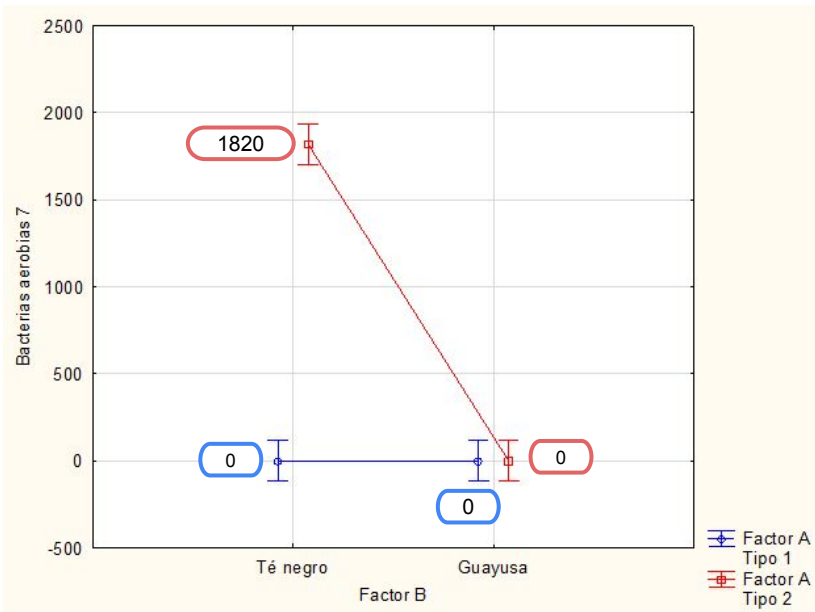
# RESULTADOS Y DISCUSIONES

## Interacciones A x B



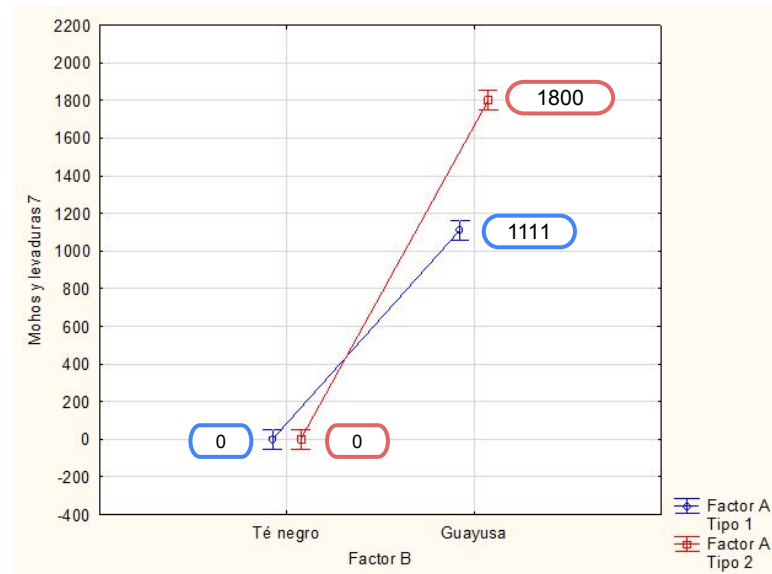
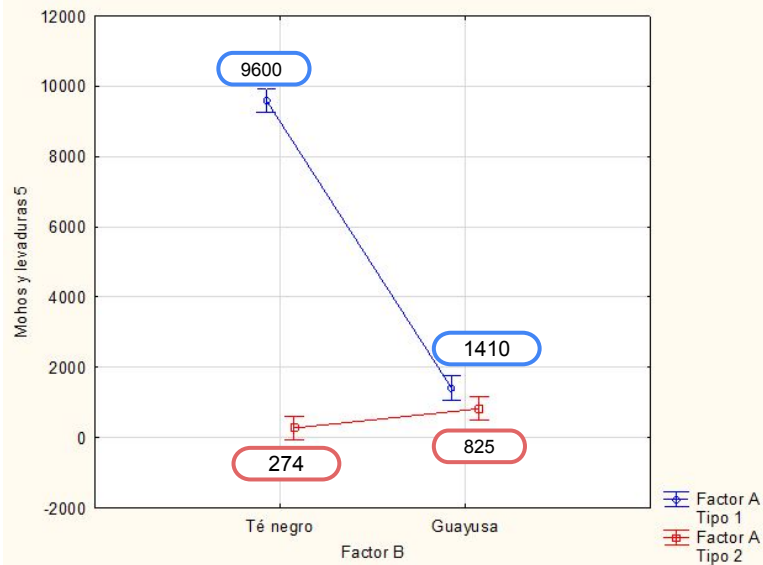
# RESULTADOS Y DISCUSIONES

## Interacciones A x B



# RESULTADOS Y DISCUSIONES

## Interacciones A x B



# RESULTADOS Y DISCUSIONES

## Interacciones A x B

Instituto Danone (2020) por lo general entre los 8 a 10 días de fermentación del té, la concentración entre bacterias y levaduras alcanza un total entre 104 y 106 UFC/ml, donde las bacterias poseen una menor concentración.

Rango en el cual, no se encuentran los tratamientos, sin embargo, se explicarían los resultados obtenidos en A0B0, A0B1 y A1B1.

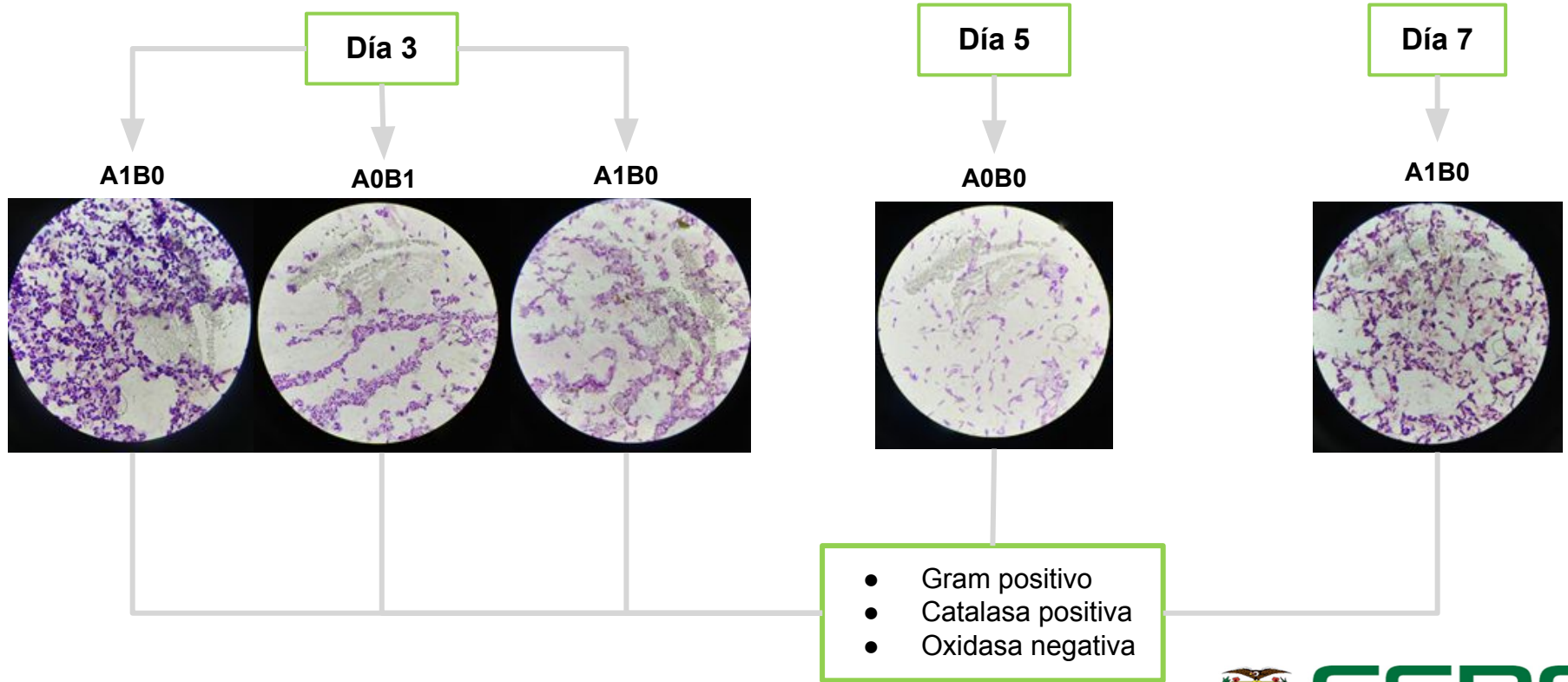
Conforme a Tan et al. (2020) del Reglamento 39 sobre el Estándar Microbiológico perteneciente al Reglamento de Alimentos de 1985, el nivel máximo de recuento total en placa de microorganismos debe ser igual o inferior a  $10^5$  UFC/ml para alimentos.

Se considera que todos los tratamientos están dentro del rango sugerido.



# RESULTADOS Y DISCUSIONES

## Identificación microbiológica





# RESULTADOS Y DISCUSIONES

## Identificación microbiológica

Conforme al estudio de Villarreal et al. (2018) algunas de las especies que poseen estas características son las levaduras



*Brettanomyces bruxellensis*,  
*Schizosaccharomyces pombe*

Chakravorty et al. (2016) mencionan que se han identificado géneros como



*Zygosaccharomces*, *Candida*,  
*Kloeckera*, *Torulaspora*, *Pichia*,  
*Saccharomyces*, *Lachancea*,  
*Saccharomycoies*,  
*Schizosaccharmyces* y  
*Kluyveromyces*

Tran et al. (2020) expresan que, las bacterias ácido acéticas pueden estimular la producción de etanol a través de las levaduras

Morales (2014) hace referencia a una capa de red celulósica.



# CONCLUSIONES

Diseño A x B



pH

**Factor A**  
(Tipo de Kombucha)

El pH no varió, debido a la composición microbiana y debido a que no existe una cantidad elevada de microorganismos en los días iniciales.

**Factor B**  
(Especies Vegetales)

Se evidenció que el pH no tuvo mayor disminución, debido a que no se dio una transformación completa de los componentes químicos que contiene cada especie vegetal, ya que estas influyen para la reducción de este parámetro en este tipo de bebidas fermentadas.

**Interacción A\*B**

El té negro y té de guayusa con Kombucha tipo I son las más apropiadas para el consumo humano, ya que presentaron niveles de pH acordes a la normativa.



# CONCLUSIONES

Diseño A x B



acidez

**Factor A**  
(Tipo de Kombucha)

Los tipos de composición microbiana no fue tan distinta en los tipos de Kombucha, debido a que en los primeros días de fermentación no existe un desarrollo total del recuento microbiano.

**Factor B**  
(Especies Vegetales)

La acidez varió en los días de fermentación analizados, ya que es inversamente proporcional a la reducción de pH como el tiempo de fermentación.

**Interacción A\*B**

La Kombucha tipo I en combinación con té negro proporciona un valor de acidez más bajo en comparación a la Kombucha tipo II con té de guayusa,



# CONCLUSIONES

Diseño A x B



brix

**Factor A**  
(Tipo de Kombucha)

La Kombucha tipo I es la más apta para el desarrollo bacteriano, ya que al tener una mejor síntesis del sustrato, decae el desarrollo de otro tipo de microorganismo en el transcurso del tiempo, lo cual conduce a tener una mejor acidez.

**Factor B**  
(Especies Vegetales)

Se dio menor cantidad en el té de guayusa, por lo tanto, se puede mencionar, que en este tipo de té existió menos cantidad de sacarosa y componentes disueltos por el proceso de fermentación.

**Interacción A\*B**

La Kombucha tipo II tanto con té negro como con guayusa son las mezclas apropiadas para el consumo humano por los valores obtenidos en el último día de fermentación.



# CONCLUSIONES

## Unidades Formadoras de Colonias

El crecimiento de bacterias aerobias se da en los primeros días lo cual se relaciona con el consumo de los sustratos presentes en la bebida.

Existió un mayor desarrollo de microorganismos en los petrifilm de mohos y levaduras a partir del día 5 en adelante en el proceso de fermentación de Kombucha y esto se produjo porque mientras más transcurre el tiempo de la fermentación se da la transformación a productos como el etanol.



# RECOMENDACIONES

Realizar las fermentaciones de Kombucha en biorreactores o áreas más controladas.

Realizar análisis a futuro a partir del día 2 de fermentación para evidenciar si hay mayor crecimiento de bacterias ácido lácticas y bacterias en general.

La combinación de Kombucha tipo I con té negro fue el té con cualidades más óptimas para consumo humano lo cual se relaciona con la normativa legal.

Se sugiere emplear otros medios de cultivo con el fin de poder evidenciar de acuerdo a los componentes nutricionales el crecimiento de los microorganismos que tiene la Kombucha, ya que al ser un consorcio microbiano se dará la presencia de diversas bacterias y levaduras.



# Gracias por su atención

