

Universidad de las Fuerzas Armadas- ESPE
Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura.

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

“Evaluación del efecto inhibitorio de kombucha de té negro y verde en *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp.”

Elaborado por:
Melany Amanda Ruiz Basantes

Director:
Rafael Eduardo Vargas Verdesoto, M. Sc.

Sangolquí-Ecuador

2022



Contenido

Introducción

Objetivos

Hipótesis

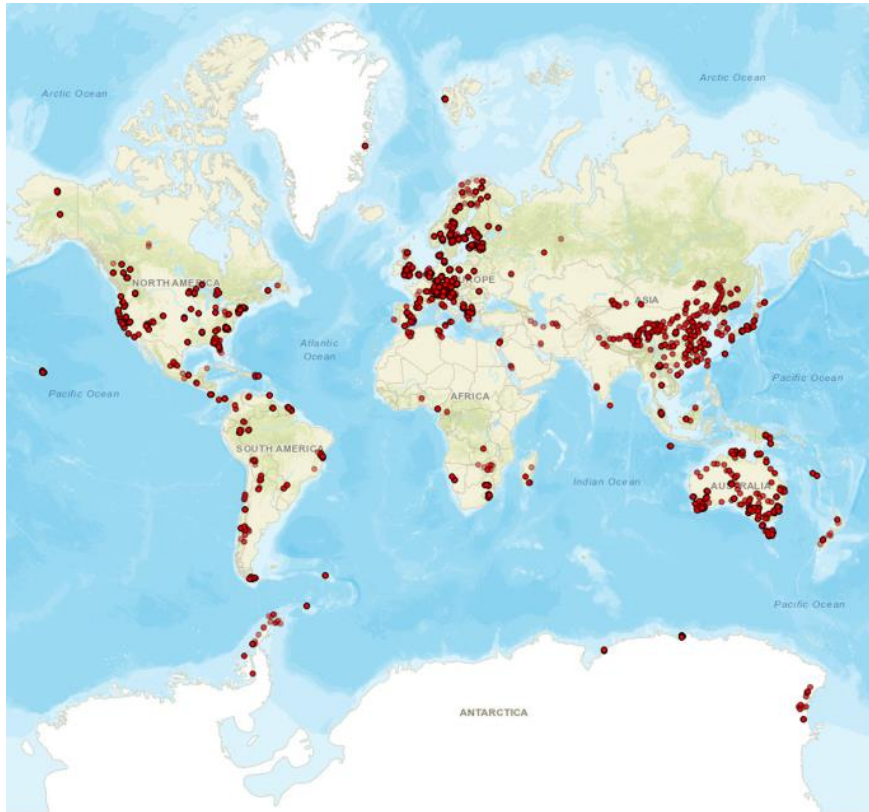
Materiales y métodos

Resultados y discusión

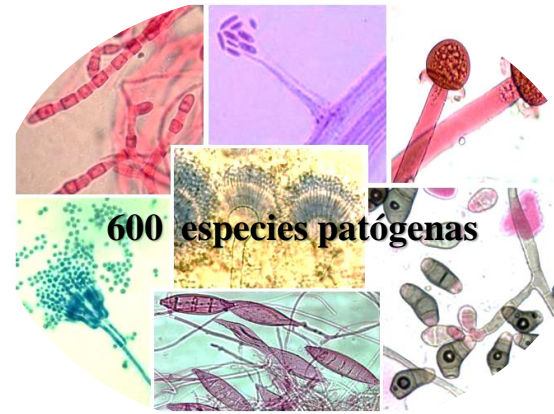
Conclusiones

Recomendaciones

Hongos Patógenos



100 000 especies de hongos



Afectan



Humanos



Plantas



Animales

CARACTERÍSTICAS

Ubicuo

Saprofítico

División:



Ascomicetos



Basidiomicetos

Consecuencias

Problemas de salud

Pérdidas económicas

Problemática

Resistencia a fármacos antifúngicos

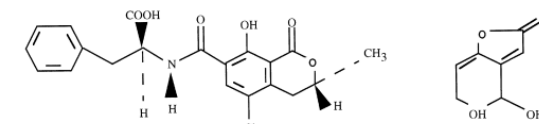
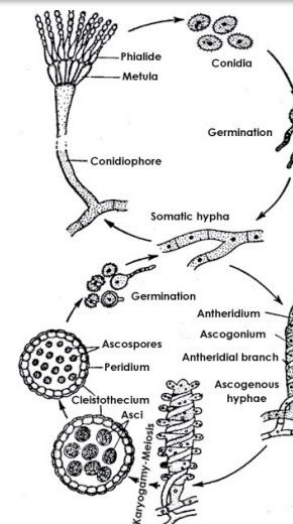
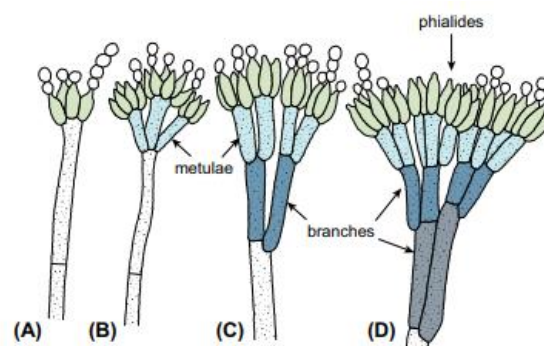
Solución

Antifúngicos Naturales

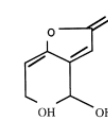
Penicillium

Características

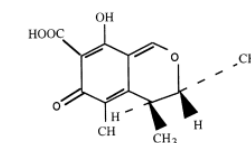
<ul style="list-style-type: none"> -Hongo filamentoso -Ubicuo -Crecen en ambientes extremos -Saprofíticos ambientales 	<p>Taxonomía</p> <ul style="list-style-type: none"> -Reino Fungi, división Ascomycota, clase Eurotiomycetes, orden Eurotiales, familia Trichocomaceae -En 1809 se introduce el nombre <i>Penicillium</i> (“cepillo”) 	<p>Morfología</p> <p><u>Macroscópica</u>: colonia color blanco al inicio del crecimiento y maduro denota colores verdes y grisáceos</p> <p><u>Microscópicamente</u>: formado de conidióforos, metulas, filiades y conidios</p>	<p>Reproducción y Ciclo de Vida</p> <ul style="list-style-type: none"> -Vegetativo -Asexual -Sexual 	<p>Micotoxinas</p> <p>32 tipos</p> <ul style="list-style-type: none"> -Ocratoxina A (OTA) -Patulina -Citrina
---	---	---	---	--



Ochratoxin A



Patulin A



Citrinin

Aspergillus

Generalidades

- Hongo filamentoso
- Ubicuo
- Saprófito
- Crece a diferentes temperaturas y humedad
- Rápida dispersión de esporas

Taxonomía

- Reino Fungi, división Ascomycota, clase Eurotiomycetes, orden Eurotiales y familia Trichocomaceae
- Especie descrita en 1729 por Pietro Micheli

Morfología

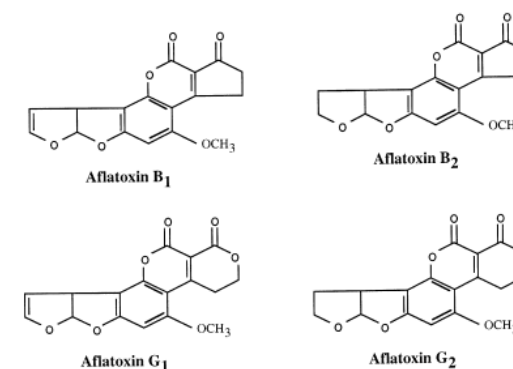
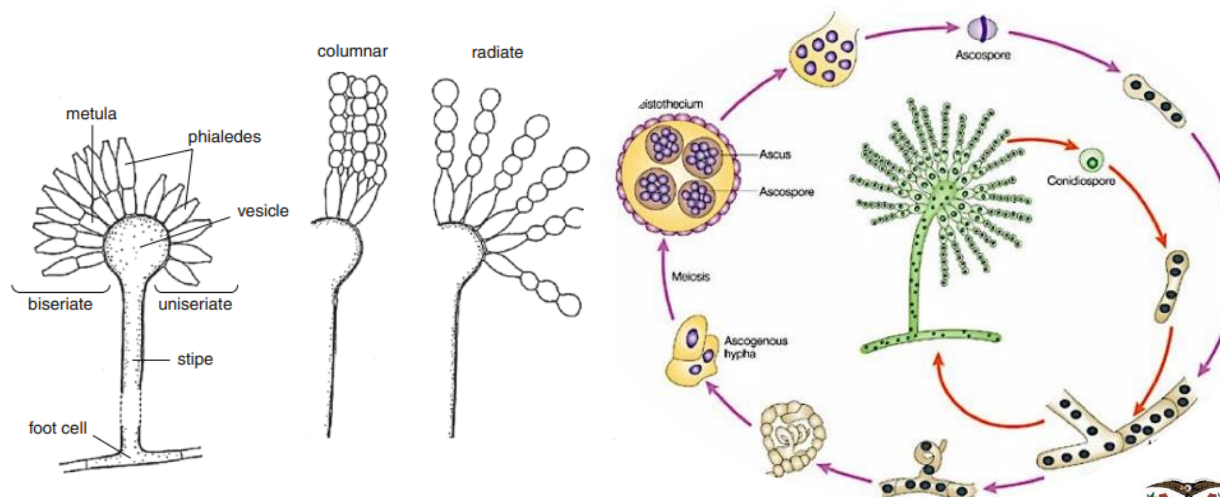
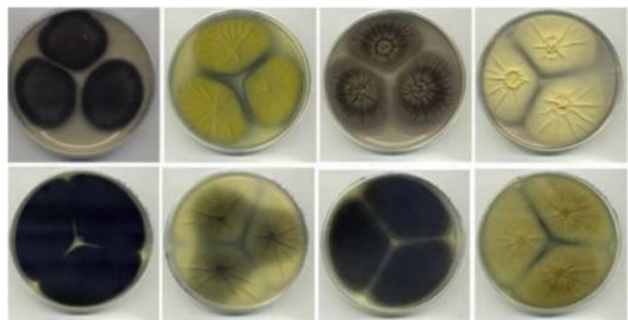
- Colonias color gris, verde, negro, pardo, blanco
- Estructura basa en conidióforo, vesícula, filade y conidios

Reproducción

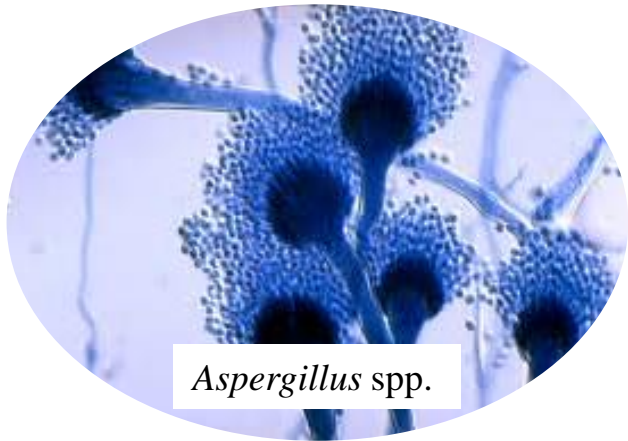
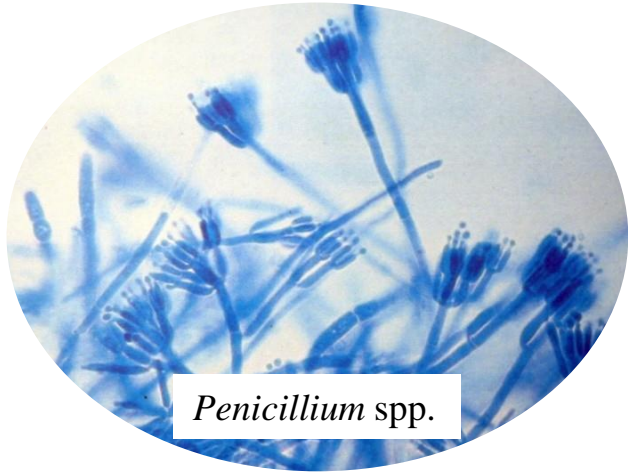
- La mayoría de las especies son anamorfos (reproducción asexual)
- Solo algunas especies son teleomorfos (reproducción sexual)

Micotoxinas

- Producción principal de aflatoxinas: B₁, B₂, G₁ y G₂



Importancia de inhibición de *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp.



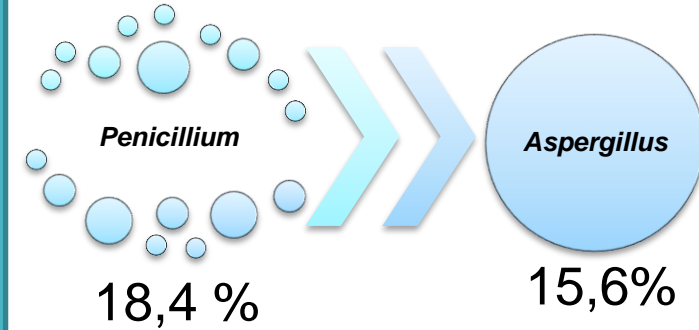
Patógenos debido a micotoxinas



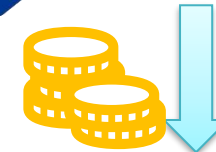
Contaminación de alimentos



Problemas respiratorios y digestivos



Presencia de hongos en piensos



Kombucha

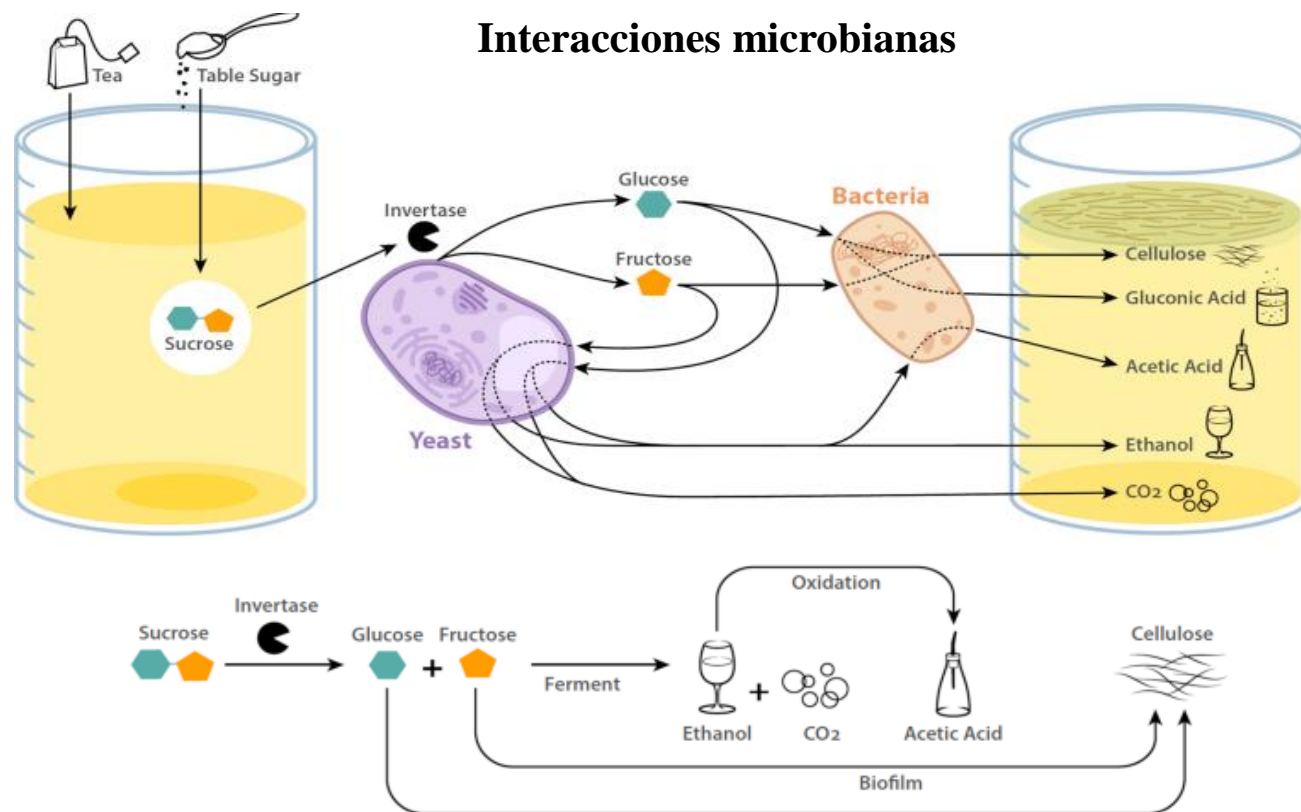
Bebida fermentada de té, azúcar y un cultivo simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY)



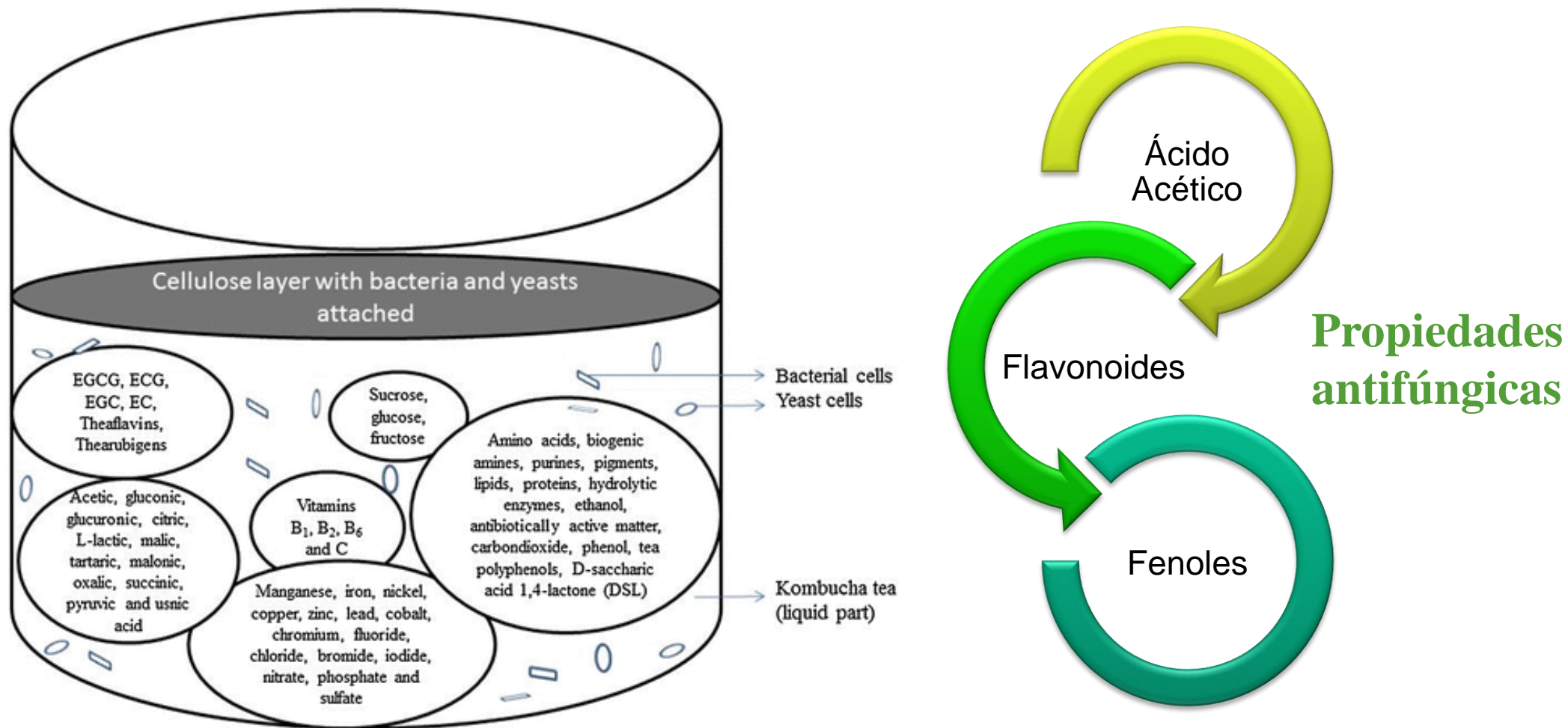
- **Bacterias ácido acéticas:** *Komagateibacter* spp., *Gluconobacter* spp., *Acetobacter* spp.
- **Bacterias ácido lácticas:** *Lactobacillus*, *Lactococcus*
- **Levaduras:** *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces ludwigii*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Torulasporea delbrueckii*, *Brettanomyces bruxellensis*

SCOBY

Bebida Fermentada



Composición de la kombucha



Objetivo General

Evaluar el efecto inhibitorio de kombucha de té negro y verde en *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp.



Objetivos Específicos

- ❖ Elaborar kombucha de té negro y verde a partir de bibliografía.
- ❖ Caracterizar las propiedades físico-químicas de pH y azúcares totales en la kombucha a los 0, 7, 14, 21 y 28 días.
- ❖ Determinar el efecto de inhibición de la kombucha de té verde y negro en *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. mediante pruebas de susceptibilidad antifúngica

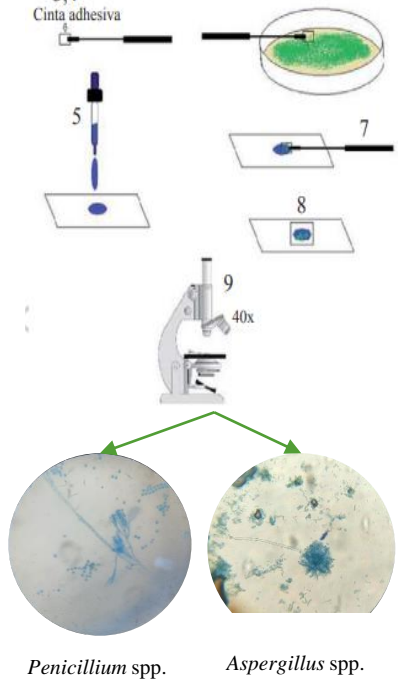
Hipótesis

La kombucha de té verde tiene un mayor efecto inhibitorio sobre *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp., que la kombucha de té negro



Identificación Hongos

Tinción con Azul de Lactofenol



Cultivo de inóculos fúngicos

Cultivo de los hongos en medio PDA



Tiempo de incubación: 72 horas a 25°C

Preparación kombucha de té negro y verde

Infusión de 3.2 g de té en 1 L de agua



Añade 50 g/L de azúcar



En el recipiente estéril se añade el té endulzado, 30 g/L de SCOBY y 100 mL/L de un lote de kombucha



Medición pH y azúcares totales

Muestras de kombuchas



pH



°Brix

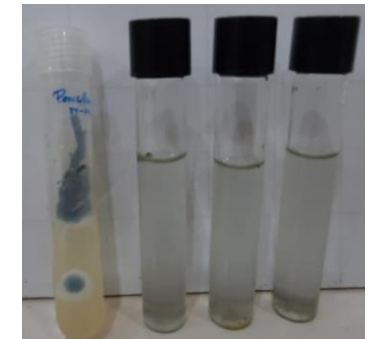


Filtración de kombuchas

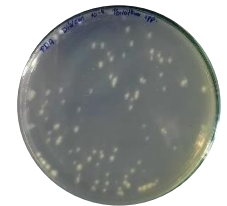


Filtración con papel Whatman

Preparación de suspensiones fúngicas



Suspensión del hongo en agua destilada estéril



Dilución 10^{-4} = 102 UFC/mL

Concentración inicial: 1×10^6 UFC/mL ~ 0.5 McFarland



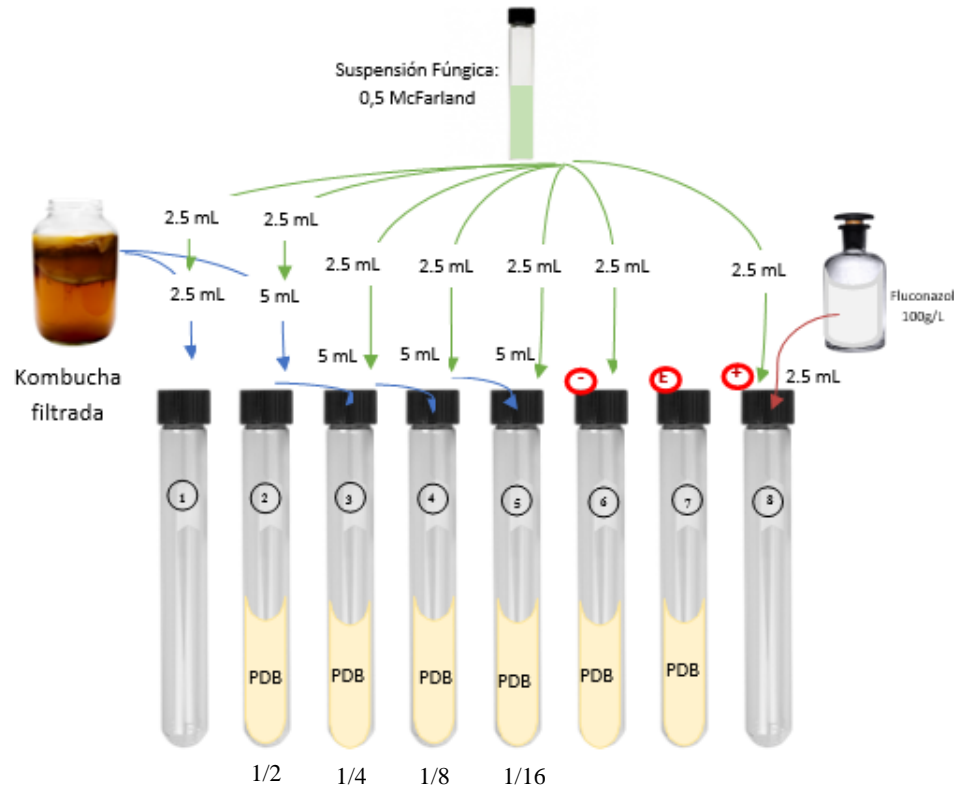
ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



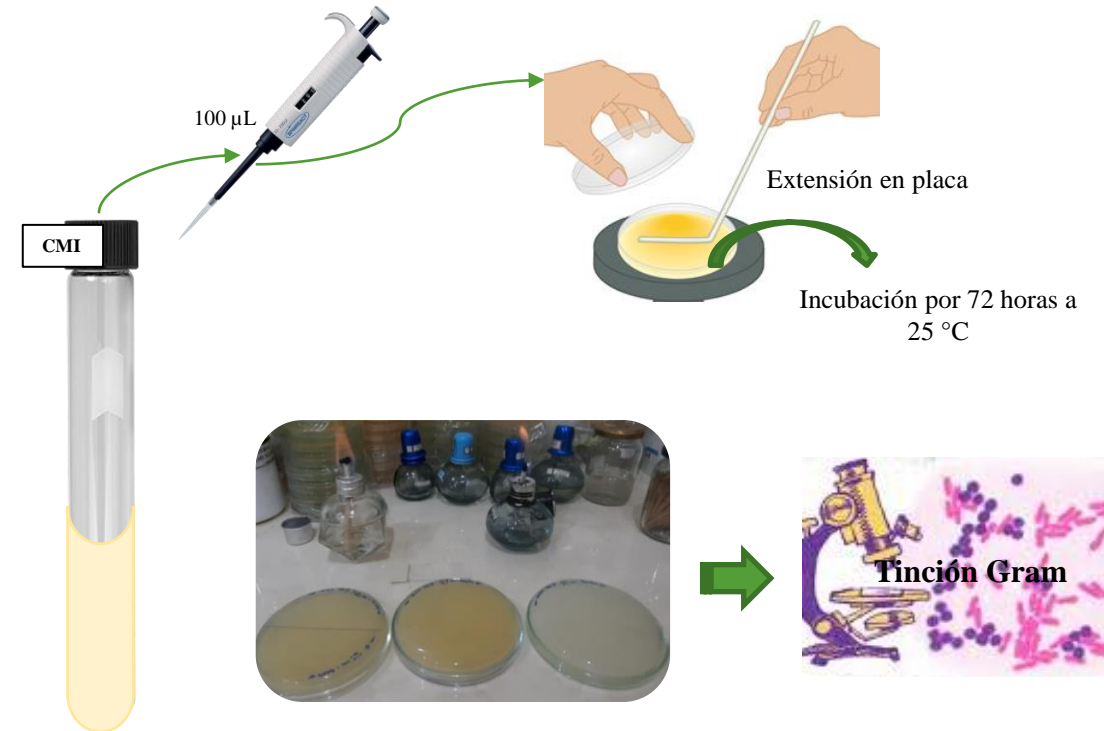
Pruebas de susceptibilidad antifúngica

Macrodilución en caldo

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)



Determinación de la Concentración Mínima Fungicida (CMF)



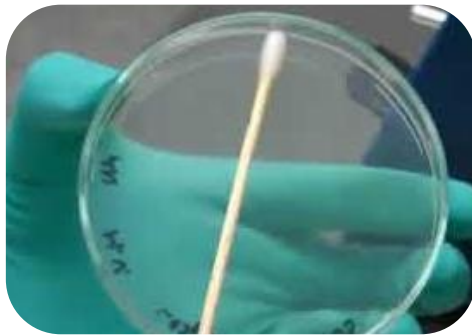
Pruebas de susceptibilidad antifúngica

Difusión en disco

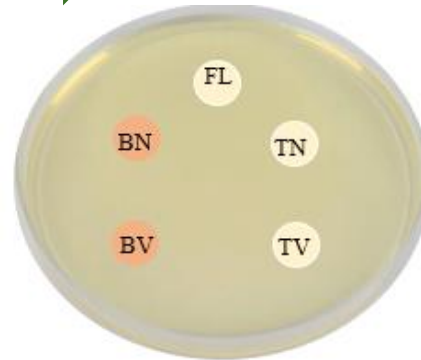
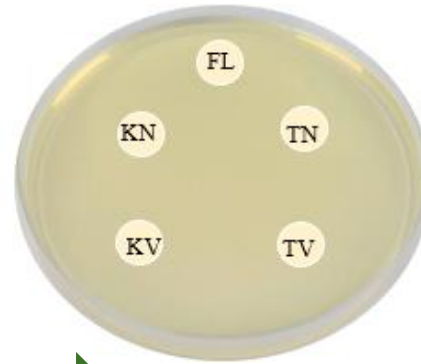
Análisis estadístico



Suspensión fúngica
0.5 McFarland



Inoculación del medio PDA con los
respectivos hongos

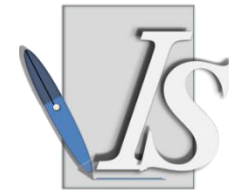


Discos de papel filtro 6 mm:

- 20 µl de kombucha de té negro (KN)
- 20 µl de kombucha de té verde (KV)
- 20 µl té negro (TN) [control -]
- 20 µl de té verde (TV) [control -]
- 20 µl de fluconazol comercial de 200/300 mg (FL) [control +]

- SCOBY de 6 mm de kombucha de té negro (BN)
- SCOBY de 6 mm de kombucha de té verde (BV)
- 20 µl té negro (TN) [control -]
- 20 µl de té verde (TV) [control -]
- 20 µl de fluconazol comercial de 200/300 mg (FL) [control +]

- ❖ Diseño experimental comparativo simple en el tiempo
 - ❖ 3 Repeticiones



Análisis estadístico: paquete estadístico InfoStat

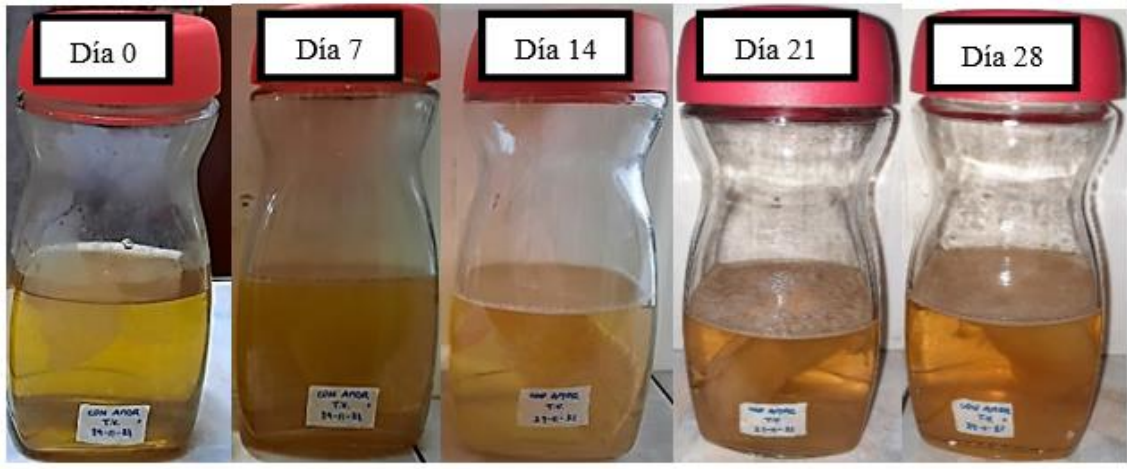
ANOVA

Prueba de comparación
Duncan

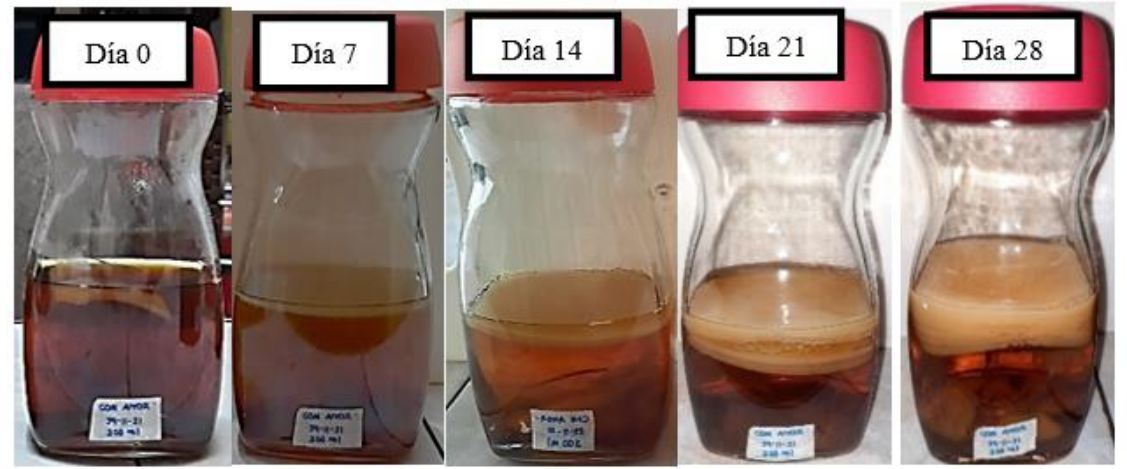


Fermentación de la kombucha de té verde y negro

Kombucha de té verde



Kombucha de té negro



El grosor del biofilm se debe al contenido de polifenoles del té

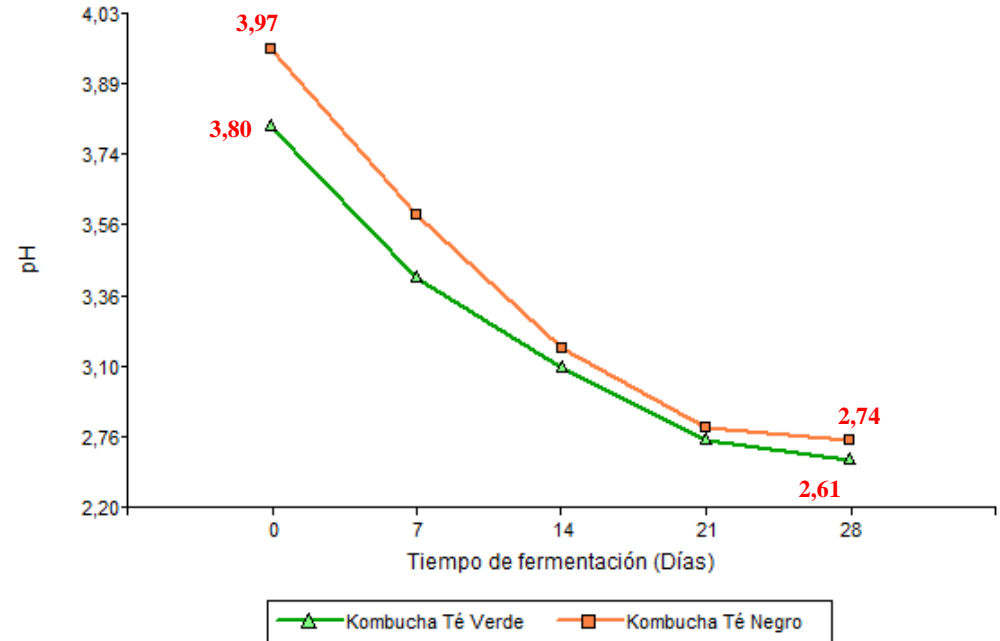


El té verde contiene gran cantidad de catequinas (polifenoles) al no experimentar oxidación



Tiempo de adaptación del SCOBY a un nuevo ambiente (té verde)

pH de la kombucha



Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
pH	40	1,00	1,00	0,26

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8,35	9	0,93	13572,46	<0,0001
Dias	8,17	4	2,04	29908,12	<0,0001
Kombucha	0,15	1	0,15	2250,15	<0,0001
Dias*Kombucha	0,02	4	4,6E-03	67,37	<0,0001
Error	2,0E-03	30	6,8E-05		
Total	8,35	39			

Test: Duncan Alfa=0,05

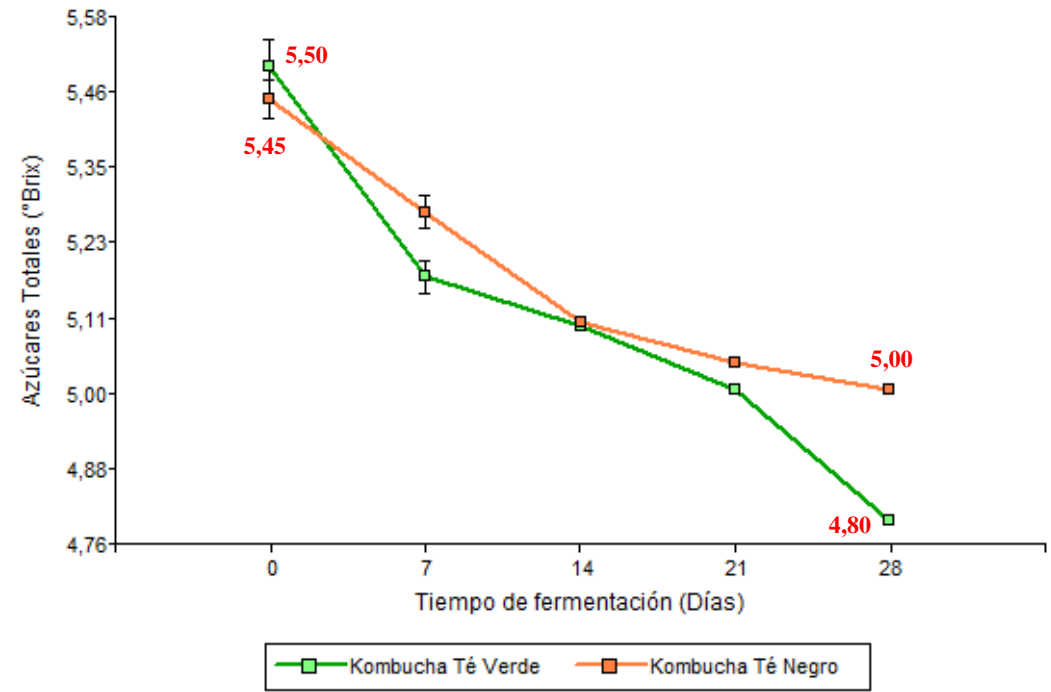
Error: 0,0001 gl: 30

Dias	Kombucha	Medias	n	E.E.	
28	KTV	2,61	4	4,1E-03	A
21	KTV	2,74	4	4,1E-03	B
28	KTN	2,74	4	4,1E-03	B
21	KTN	2,81	4	4,1E-03	C
14	KTV	3,09	4	4,1E-03	D
14	KTN	3,17	4	4,1E-03	E
7	KTV	3,41	4	4,1E-03	F
7	KTN	3,59	4	4,1E-03	G
0	KTV	3,80	4	4,1E-03	H
0	KTN	3,97	4	4,1E-03	I

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

- Producción de ácidos orgánicos en el proceso de fermentación**
 - El valor del pH disminuya
- Diferencias en el valor del pH**
 - Depende del tipo de té utilizado para la preparación de kombucha
- Composición química y microbiológica difiere en el tipo de kombucha**
 - Kombucha de té verde mayor diversidad de bacterias lácticas y acéticas

Azúcares totales de la kombucha



Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
°Brix	40	0,97	0,97	0,76

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,65	9	0,18	121,08	<0,0001
Días	1,54	4	0,38	254,47	<0,0001
Kombucha	0,04	1	0,04	23,41	<0,0001
Días*Kombucha	0,07	4	0,02	12,11	<0,0001
Error	0,05	30	1,5E-03		
Total	1,69	39			

Test:Duncan Alfa=0,05

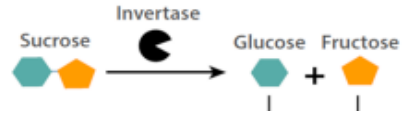
Error: 0,0015 gl: 30

Días	Kombucha	Medias	n	E.E.	
28	KTV	4,80	4	0,02	A
21	KTV	5,00	4	0,02	B
28	KTN	5,00	4	0,02	B
21	KTN	5,04	4	0,02	B
14	KTV	5,10	4	0,02	C
14	KTN	5,11	4	0,02	C
7	KTV	5,18	4	0,02	D
7	KTN	5,28	4	0,02	E
0	KTN	5,45	4	0,02	F
0	KTV	5,50	4	0,02	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

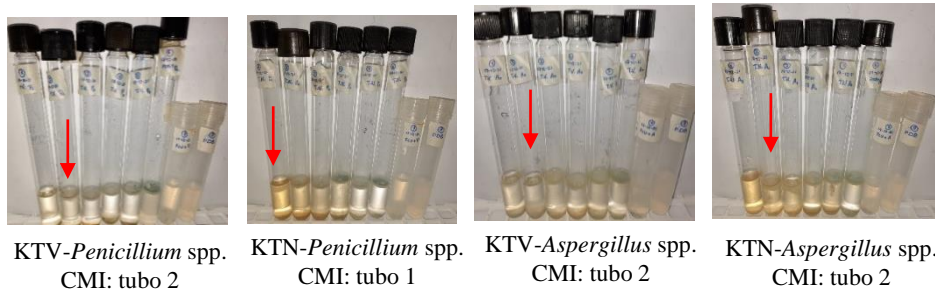
Proceso de fermentación
 •Hidrólisis de la sacarosa en sus monómeros

Rezende et al. (2019)
 •Kombucha de té verde presenta bajas concentraciones de azúcar y producción de ácido glucurónico

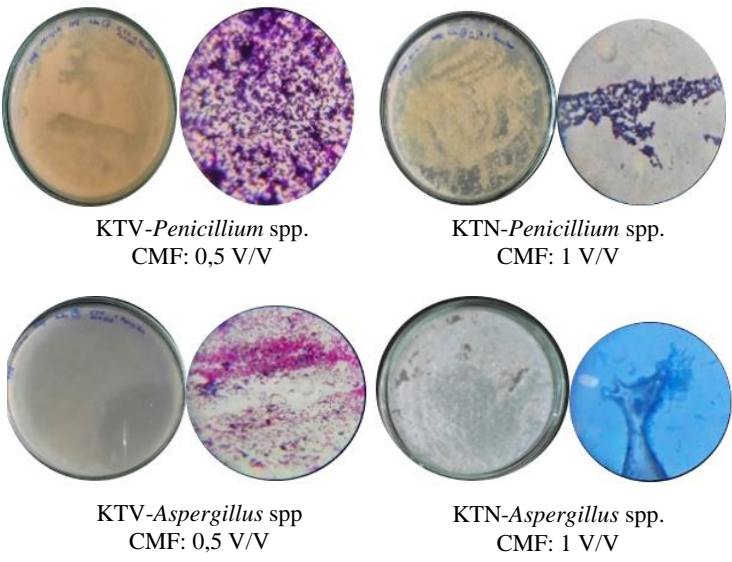


Macrodilución: CMI y CMF

Concentración mínima inhibitoria (Día 0)



Concentración mínima fungicida (Día 0)



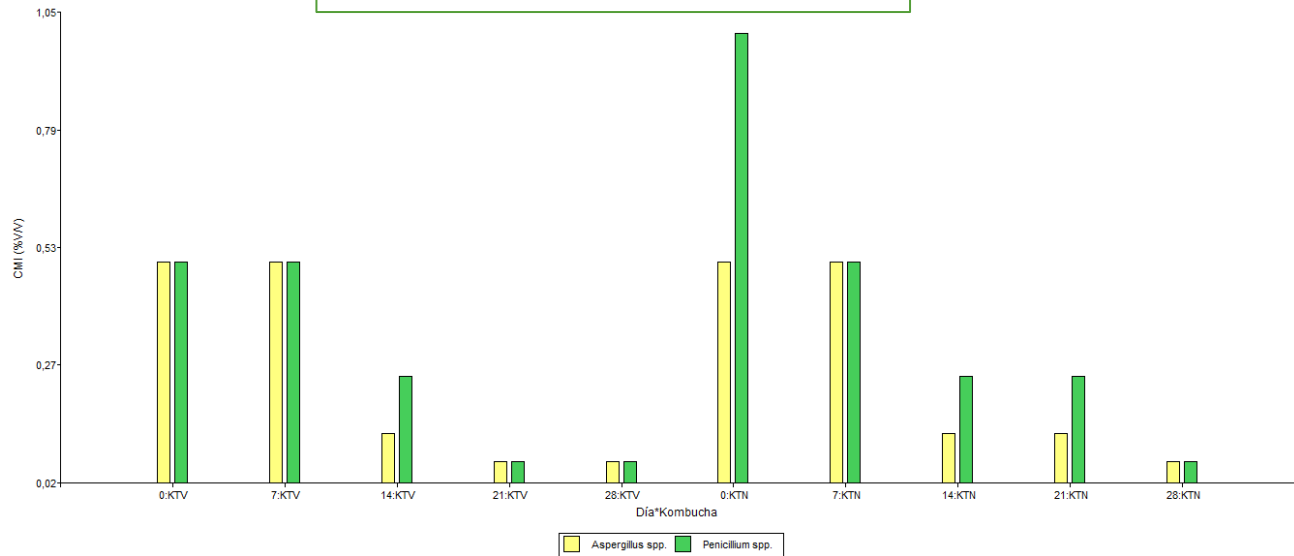
Cepas Fúngicas	Kombucha Té Verde									
	Día 0		Día 7		Día 14		Día 21		Día 28	
	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
<i>Penicillium</i> spp.	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625
<i>Aspergillus</i> spp.	0,5	0,5	0,5	0,5	0,125	0,125	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625

Cepas Fúngicas	Kombucha Té Negro									
	Día 0		Día 7		Día 14		Día 21		Día 28	
	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
<i>Penicillium</i> spp.	1	1	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,0625	0,0625
<i>Aspergillus</i> spp.	0,5	1	0,5	0,5	0,125	0,125	0,125	0,125	0,0625	0,0625

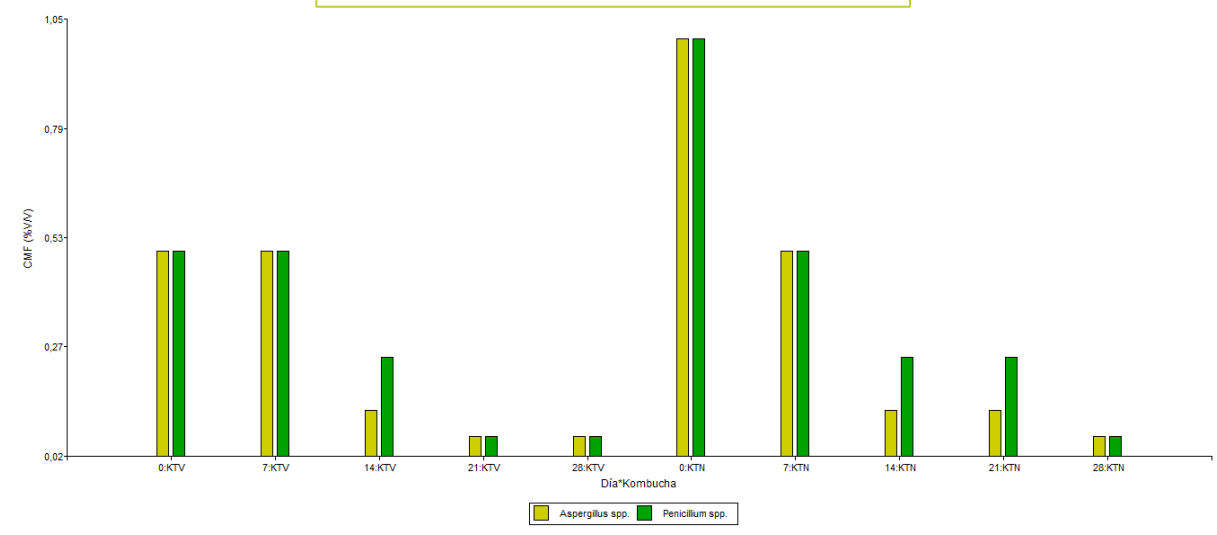
Nota: Los valores de CMI y CMF están representados en V/V

Macrodilución: CMI y CMF

Concentración Mínima Inhibitoria



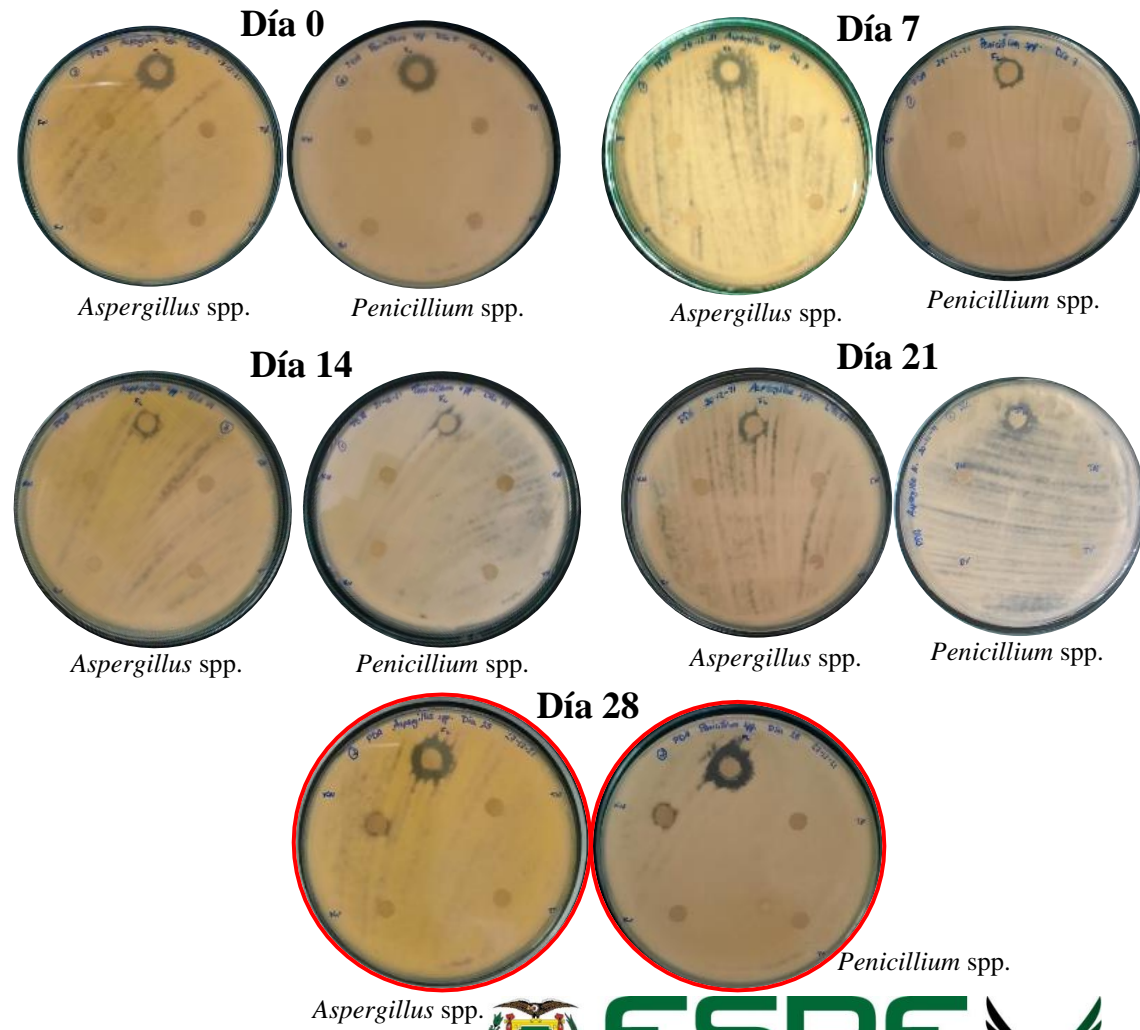
Concentración Mínima Fungicida



La kombucha inhibe crecimiento y esporas de los hongos

Difusión en disco

Días	Cepas Fúngicas	Diámetro de Inhibición (mm)				
		Kombucha Té Verde	Kombucha Té Negro	Té Verde	Té Negro	Fluconazol
0	<i>Penicillium</i> spp.	0	0	0	0	13
	<i>Aspergillus</i> spp.	0	0	0	0	13
7	<i>Penicillium</i> spp.	0	0	0	0	8
	<i>Aspergillus</i> spp.	0	0	0	0	11,25
14	<i>Penicillium</i> spp.	0	0	0	0	7,75
	<i>Aspergillus</i> spp.	0	0	0	0	9,25
21	<i>Penicillium</i> spp.	0	0	0	0	8
	<i>Aspergillus</i> spp.	0	0	0	0	8,5
28	<i>Penicillium</i> spp.	0	7,25	0	0	13
	<i>Aspergillus</i> spp.	0	7,38	0	0	14



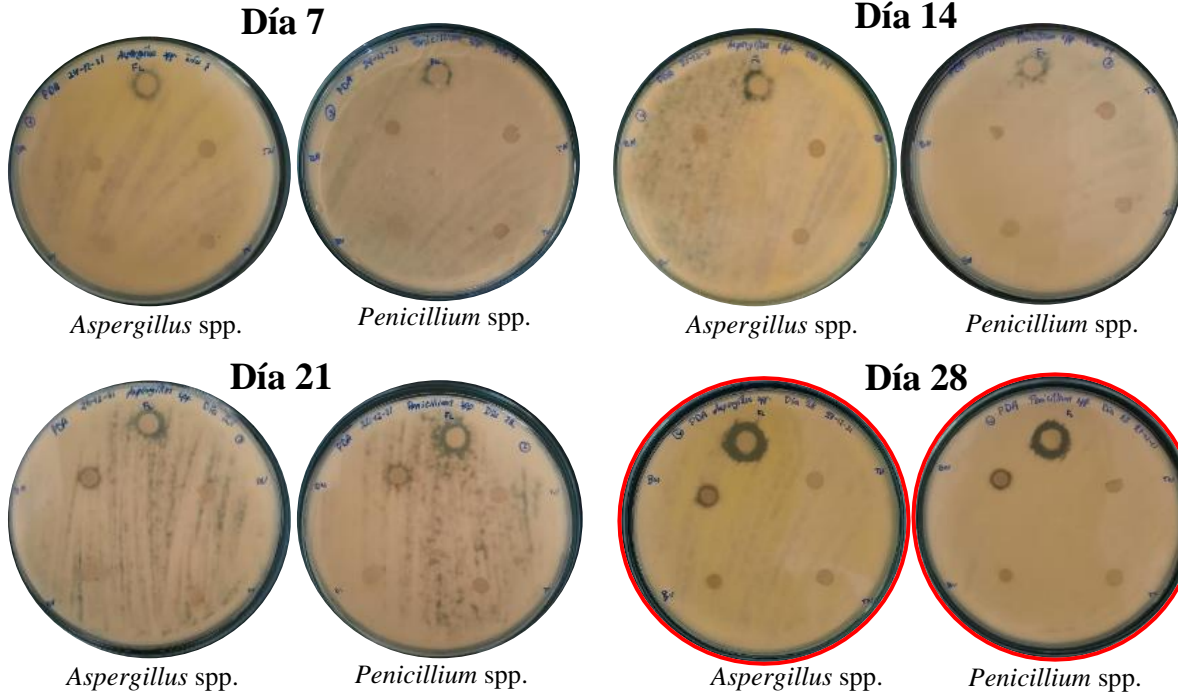
Prueba de difusión de disco es cualitativa

Problemas en la difusión de fenoles

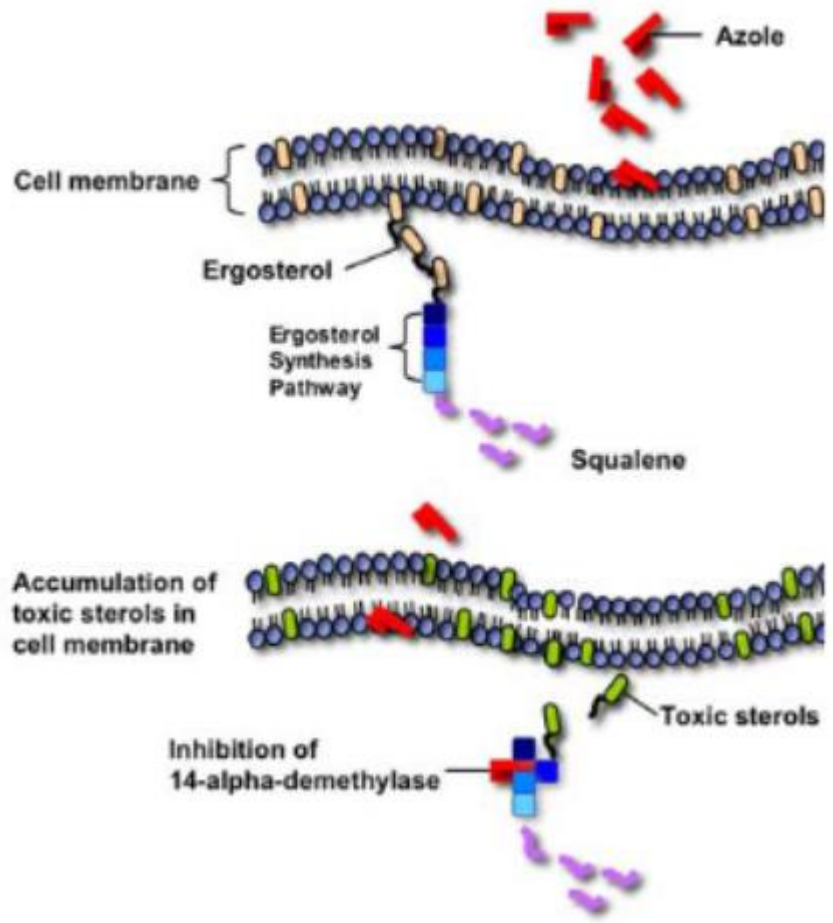
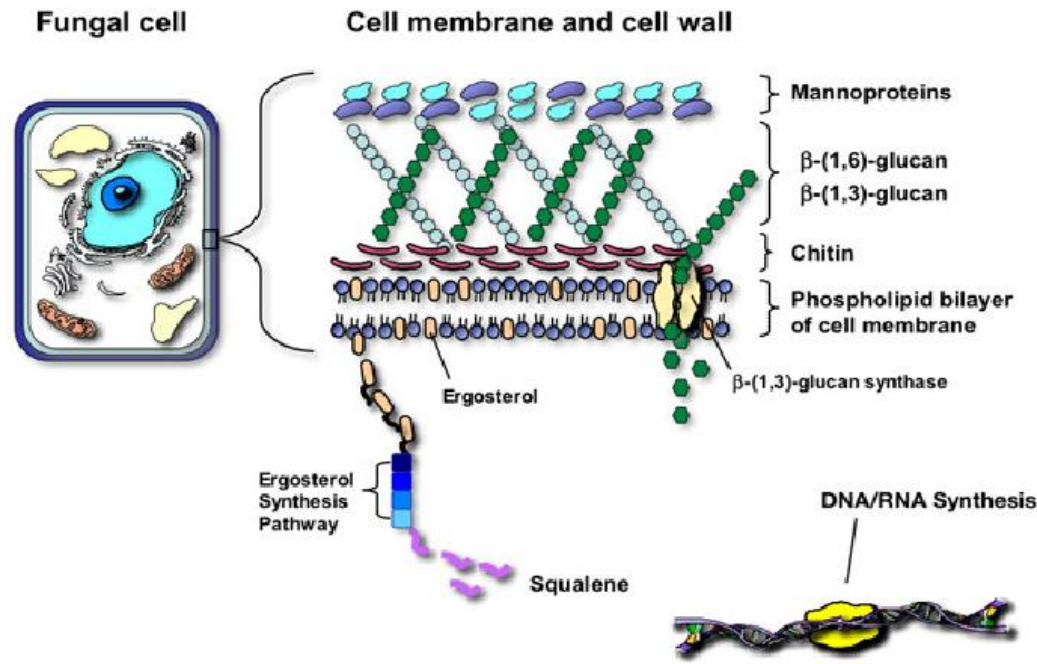
Kombucha de té verde alta cantidad de polifenoles (catequinas)

Difusión en disco

Días	Cepas Fúngicas	Diámetro de Inhibición (mm)				
		SCOBY KTV	SCOBY KTN	Té Verde	Té Negro	Fluconazol
7	<i>Penicillium</i> spp.	0	0	0	0	8,5
	<i>Aspergillus</i> spp.	0	0	0	0	9,25
14	<i>Penicillium</i> spp.	0	0	0	0	7,5
	<i>Aspergillus</i> spp.	0	0	0	0	8,75
21	<i>Penicillium</i> spp.	0	6,75	0	0	9,25
	<i>Aspergillus</i> spp.	0	6,5	0	0	8,75
28	<i>Penicillium</i> spp.	0	7,25	0	0	12,75
	<i>Aspergillus</i> spp.	0	7,25	0	0	13,88



Inhibición *Penicillium* spp. vs *Aspergillus* spp.



<i>Aspergillus</i> spp.	• Cantidad de ergosterol 11 ± 15 µg/mg
<i>Penicillium</i> spp.	• Cantidad de ergosterol 5,8 ± 13 µg/mg

Conclusiones

- ❖ La kombucha de té negro y verde elaborada a partir de bibliografía presentó una disminución del pH y azúcares totales debido a la producción de ácidos orgánicos e hidrólisis de la sacarosa en el proceso de fermentación.
- ❖ La prueba de susceptibilidad antifúngica, macrodilución, determinó que la kombucha de té verde tiene un efecto inhibitorio mayor que la kombucha de té negro al presentar la CMI más baja (0,0625 V/V) el día 21 de fermentación, y tener los valores de CMI iguales a los de CMF.
- ❖ La prueba de difusión de disco no fue propicia para evaluar la actividad antifúngica de la kombucha de té verde.
- ❖ El efecto inhibitorio de la kombucha de té verde y negro fue mayor en *Aspergillus* spp. que en *Penicillium* spp. debido a las probables diferencias en las cantidades de ergosterol en la membrana celular del hongo.

Recomendaciones

- ❖ Al preparar la kombucha se debe tener en cuenta que el SCOBY iniciador debe estar ya adaptado al tipo de té a utilizar.
- ❖ Realizar cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para concretar los componentes de la kombucha de té negro y verde; junto con un análisis microbiológico.
- ❖ Emplear una prueba de susceptibilidad antifúngica diferente a la difusión en disco que permita evaluar la actividad antifúngica de los dos tipos de kombucha.





Rafael Eduardo Vargas Verdesoto M. Sc.
Director del Proyecto de Integración Curricular

Lourdes Karina Ponce Loaiza M. Sc.
Directora de la Carrera de Biotecnología
Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE

Familia y Amigos

Pedro Romero Saker Ph. D
Biometrista

Fernanda Loayza Villa Ph. D
Universidad San Francisco de Quito

GRACIAS



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

