



Universidad Católica de Santa María

**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotecnológicas**

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

**Elaboración y caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad
antioxidante de una bebida tipo kombucha enriquecida con sanky
(*Corryocactus brevistylus*) liofilizado**

Tesis presentada por:

Torres Buscaglia, Nicole Victoria

ORCID: 0009-0007-8899-1011

para optar el Título Profesional de Ingeniero Biotecnólogo

Asesor:

Mg. Valdivia Carpio, Willy Anibal

ORCID: 0000-0003-0875-2904

Arequipa - Perú

2026

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 31 de Mayo del 2026

Dictamen: 015560-C-EPIB-2026

Visto el borrador del expediente 015560, presentado por:

2018210412 - TORRES BUSCAGLIA NICOLE VICTORIA

Titulado:

**ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE DE UNA BEBIDA TIPO KOMBUCHA ENRIQUECIDA CON SANKY
(CORYOACTUS BREVISTYLUS) LIOFILIZADO**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

INGENIERO BIOTECNOLOGO

**43668681 - PAREDES FUENTES JULITZA LINDSEY
DICTAMINADOR**



**47604629 - TEJADA MEZA KEVIN
DICTAMINADOR**



**71093620 - JOHNSON CORRALES FABRIZIO
DICTAMINADOR**



ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE UNA BEBIDA TIPO KOMBUCHA ENRIQUECIDA CON SANKY (CORYOACTUS BREVISTYLUS) LIOFILIZADO

INFORME DE ORIGINALIDAD

3%

INDICE DE SIMILITUD

2%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

1%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

hdl.handle.net

Fuente de Internet

1%

2

cio.mx

Fuente de Internet

1%

3

web.cnqfcolombia.org

Fuente de Internet

1%

4

Submitted to Universidad Católica de Santa María

Trabajo del estudiante

1%

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias < 1%

Excluir bibliografía

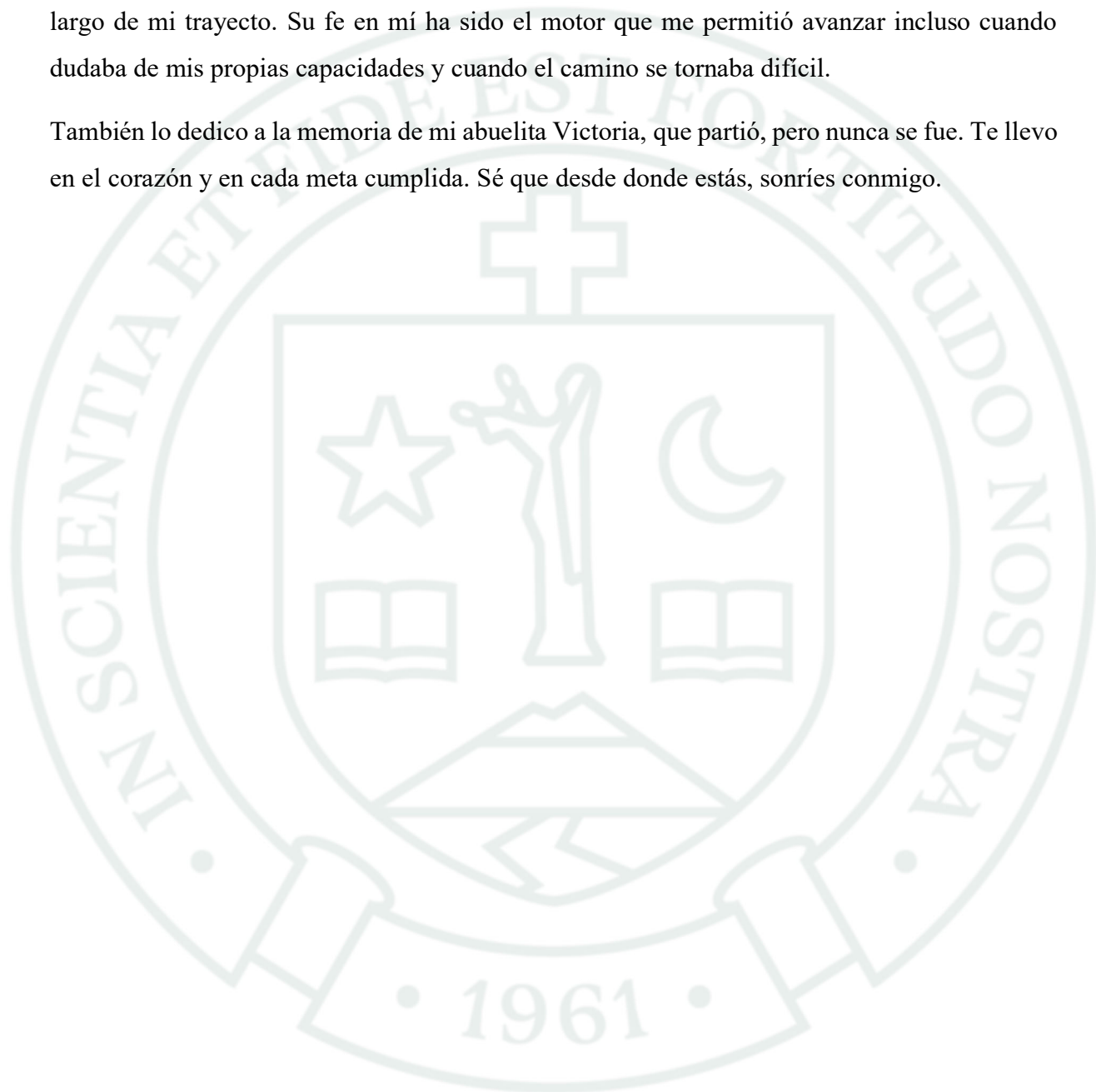
Apagado

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mis padres, Manuel Torres y Giovanna Buscaglia.

Quienes estuvieron a mi lado en cada paso de este camino, con su paciencia que no tiene comparación. Gracias por todo el apoyo, los consejos y el aliento que me han brindado a lo largo de mi trayecto. Su fe en mí ha sido el motor que me permitió avanzar incluso cuando dudaba de mis propias capacidades y cuando el camino se tornaba difícil.

También lo dedico a la memoria de mi abuelita Victoria, que partió, pero nunca se fue. Te llevo en el corazón y en cada meta cumplida. Sé que desde donde estás, sonríes conmigo.



AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, Mag. Willy Valdivia y Mag. Stephy Saavedra, por su orientación constante, sus valiosas enseñanzas y la paciencia brindada durante el desarrollo de esta investigación.

Al Mag. José León, por su amistad, sus acertados consejos y la guía ofrecida en cada etapa del proceso.

A la Dra. Amparo Zavaleta Pesantes, por haberme permitido formar parte de su equipo de trabajo y por compartir sus conocimientos, los cuales contribuyeron de manera significativa al logro de esta tesis.

A mis grandes amigos, Marcelo Cuellar, Frank Gamarra y Fabricio La Torre, y a mis primas Janice Torres y Nayre Torres, por su constante apoyo, comprensión y compañía a lo largo de este proceso.

A los integrantes del Laboratorio de Biología Molecular, en especial a la Dra. Karim Jiménez, Mag. Arturo Intiquilla, Mag. Pamela Canales, Lucero Mostacero, Sofía Llontop, Mey Flores, Astrid Ayzanoa, Francesca Egocheaga, Jorge Vilchez y Carlos Ramírez, por su apoyo, colaboración y acompañamiento a lo largo de esta etapa.

RESUMEN

La industria alimentaria busca aprovechar materias primas y subproductos en el desarrollo de alimentos funcionales. En ese contexto, el objetivo de esta investigación fue elaborar y realizar la caracterización fisicoquímica y la evaluación de la actividad antioxidante mediante los métodos DPPH y ABTS de una bebida tipo kombucha enriquecida con sanky (*Corryocactus brevistylus*) liofilizado. Además, se evaluó el contenido de compuestos fenólicos totales de la bebida y, de manera complementaria, se realizó la caracterización microbiológica del consorcio SCOBY empleado, identificándose aislamientos con similitud a levaduras como *Starmerella bacillaris* y *Brettanomyces bruxellensis*, y bacterias ácido-acéticas como *Komagataeibacter oboediens* y *Komagataeibacter xylinus*.

Por otro lado, durante la fermentación (168 h a 28 °C) con diferentes concentraciones de sanky (0%, 2.5%, 5% y 10%), se observó una disminución progresiva del pH hasta aproximadamente 3.00 y de los sólidos solubles, junto con un incremento del ácido acético 4.74%, siendo más marcado en la mayor concentración. Asimismo, la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles totales aumentaron con el tiempo de fermentación y con la adición de sanky, alcanzando sus valores más altos en el tratamiento al 10% con 58.23% de inhibición y 1.5248 µmol TE/mL mediante DPPH 14.1858 µmol TE/mL mediante ABTS y 3.5760 mg EAG/mL de polifenoles totales. Se concluye que el consorcio SCOBY presentó microorganismos característicos de este tipo de fermentación y que la incorporación de sanky liofilizado, especialmente al 10%, favoreció el incremento de las propiedades antioxidantes de la bebida en las condiciones evaluadas, sugiriendo su potencial como bebida fermentada enriquecida.

Palabras clave: bebida tipo kombucha, sanky (*Corryocactus brevistylus*), actividad antioxidante.

ABSTRACT

The food industry seeks to utilize raw materials and byproducts in the development of functional foods. In this context, the objective of this research was to develop and perform the physicochemical characterization and antioxidant activity evaluation using the DPPH and ABTS methods of a kombucha-type beverage enriched with freeze-dried sanky (*Corryocactus brevistylus*). Additionally, the total phenolic compound content of the beverage was evaluated, and, complementarily, the microbiological characterization of the SCOBY consortium used was carried out, identifying isolates similar to yeasts such as *Starmerella bacillaris* and *Brettanomyces bruxellensis*, and acetic acid bacteria such as *Komagataeibacter oboediens* and *Komagataeibacter xylinus*.

On the other hand, during fermentation (168 h at 28 °C) with different concentrations of sanky (0%, 2.5%, 5%, and 10%), a progressive decrease in pH to approximately 3.00 and in soluble solids was observed, along with an increase in acetic acid to 4.74%, which was more pronounced at the highest concentration. Likewise, antioxidant activity and total polyphenol content increased with fermentation time and the addition of sanky, reaching their highest values in the 10% treatment with 58.23% inhibition and 1.5248 µmol TE/mL by DPPH, 14.1858 µmol TE/mL by ABTS, and 3.5760 mg GAE/mL of total polyphenols. It is concluded that the SCOBY consortium presented microorganisms characteristic of this type of fermentation and that the incorporation of freeze-dried sanky, especially at 10%, favored the increase of the antioxidant properties of the beverage under the evaluated conditions, suggesting its potential as an enriched fermented beverage.

Keywords: kombucha-type beverage, sanky (*Corryocactus brevistylus*), antioxidant activity.

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN 1

HIPÓTESIS 3

OBJETIVOS..... 4

VARIABLES E INDICADORES 5

CAPÍTULO I..... 6

MARCO TEÓRICO 6

1.1 Kombucha 7

1.1.1 Generalidades 7

1.1.2 Composición de la kombucha 7

1.1.3 Fermentación de la bebida tipo kombucha..... 7

1.1.4 Beneficios de la bebida tipo kombucha..... 8

1.2 Sanky (*Corryocactus brevistylus*) 9

1.2.1 Generalidades 9

1.2.2 Propiedades 9

1.2.3 Composición nutricional 9

1.3 Actividad antioxidante 9

1.4 Métodos de Cuantificación de capacidad antioxidante 9

1.4.1 Método Folin-Ciocalteu 10

1.4.2 Método DPPH 10

1.4.3 Método ABTS 10

1.5 Marco legal..... 10

1.6 Análisis antecedentes investigativos 11

1.6.1	Investigaciones nacionales	11
1.6.2	Investigaciones internacionales.....	12
CAPÍTULO II		14
MATERIALES Y METODOS		14
2.1	Lugar de ejecución	15
2.2	Materiales.....	15
2.2.1	Materiales, reactivos y equipos	15
2.2.2	Materia prima	15
2.2.3	Material biológico	15
2.3	Métodos Analíticos	16
2.3.1	Análisis proximal del sanky (<i>Corryocactus brevistylus</i>)	16
2.3.2	Liofilización de la muestra de sanky (<i>Corryocactus brevistylus</i>).....	16
2.3.3	Determinación de azúcares reductores	17
2.3.4	Determinación de pH.....	18
2.3.5	Determinación de acidez titulable (ácido acético)	18
2.3.6	Determinación de sólidos solubles.....	19
2.3.7	Evaluación de capacidad antioxidante:	19
2.3.8	Evaluación de polifenoles totales	26
2.4	Ensayos.....	28
2.4.1	Preparación de la Kombucha.....	28
2.4.2	Aislamiento e identificación de microorganismos de la Kombucha.....	29
2.4.3	Fermentación de Kombucha suplementado con liofilizado de Sanky	35
2.4.4	Análisis de los resultados y elaboración de cuadros	37
CAPÍTULO III		38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		38
3.1	Aislamiento de microorganismos.....	39
3.1.1	Aislamiento de levaduras	39

3.1.2	Aislamiento de bacterias ácido-acéticas.....	41
3.1.3	Identificación bioquímica.....	42
3.1.4	Identificación bioquímica de levaduras.....	42
3.1.5	pH.....	47
3.1.6	Identificación bioquímica de bacterias ácido-acéticas	48
3.1.7	Identificación molecular.....	50
3.2	Determinación de la concentración adecuada de sanky para una bebida funcional.	52
3.2.1	Características del sanky	52
3.2.2	Variación de pH en el tiempo de fermentación.....	54
3.2.3	Variación de Ácido acético (%) en el tiempo de fermentación.....	55
3.2.4	Variación de sólidos solubles (°Brix) en el tiempo de fermentación.....	57
3.2.5	Variación de azúcares reductores (g/L) en el tiempo de fermentación	58
3.3	Determinación de capacidad antioxidante.....	60
3.3.1	Método DPPH	60
3.3.2	Método ABTS-TEAC	64
3.4	Determinación de polifenoles totales	69
CONCLUSIONES		74
RECOMENDACIONES		75
REFERENCIAS.....		76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de variables.....	5
Tabla 2. Preparación de soluciones para la curva estándar del ensayo DPPH en microplaca. 20	
Tabla 3. Preparación de muestras para el ensayo DPPH en microplaca.	22
Tabla 4. Datos de la curva patrón de Trolox.	24
Tabla 5. Preparación de muestras para el ensayo ABTS en microplaca.	25
Tabla 6. Preparación de la curva de calibración para polifenoles totales.....	27
Tabla 7. Preparación de muestras para el ensayo de polifenoles totales.....	28
Tabla 8. Cebadores utilizados para la identificación de levaduras.....	32
Tabla 9. Cebadores utilizados para la identificación de bacterias ácido-acéticas.....	35
Tabla 10. Caracterización morfológica de levaduras aisladas de kombucha comercial	40
Tabla 11. Características de bacterias ácido-acéticas aisladas de kombucha comercial.....	42
Tabla 12. Prueba de catalasa	43
Tabla 13. Tolerancia de salinidad.....	43
Tabla 14. Hidrólisis de urea	44
Tabla 15. Tolerancia al ácido acético.....	44
Tabla 16. Crecimiento a diferentes temperaturas.....	45
Tabla 17. Fermentación en carbohidratos y producción de gas.	46
Tabla 18. Tolerancia de etanol a diferentes cantidades.....	47
Tabla 19. Crecimiento a diferentes pH.....	47
Tabla 20. Capacidad oxidativa sobre el etanol.....	49
Tabla 21. Oxidación de acetato	49
Tabla 22. Similitud de secuencias de levaduras aisladas en kombucha comercial	51
Tabla 23. Similitud de secuencias de bacterias ácido-acéticas de kombucha comercial	51
Tabla 24. Análisis proximal de sanky fresco (<i>Corryocactus brevistylus</i>).....	53
Tabla 25. Análisis proximal de sanky (<i>Corryocactus brevistylus</i>) liofilizado.....	54
Tabla 26. Análisis de varianza de un factor a la vez para el porcentaje de ácido acético.....	56
Tabla 27. Análisis de Tukey de un factor a la vez para el porcentaje de ácido acético.	57
Tabla 28. Análisis de varianza de un factor de azúcares reductores	59
Tabla 29. Análisis de Tukey de un factor a la vez para los azúcares reductores	59
Tabla 30. Actividad antioxidante de sanky liofilizado por DPPH	61
Tabla 31. Actividad antioxidante (DPPH) en kombucha con sanky liofilizado.	62
Tabla 32. Análisis de varianza de tiempo y concentración para la capacidad antioxidante.....	63

Tabla 33. Actividad antioxidante de sanky liofilizado por ABTS.	65
Tabla 34. Actividad antioxidante (ABTS) en kombucha con sanky liofilizado.	66
Tabla 35. ANOVA de tiempo y concentración para capacidad antioxidante ABTS	67
Tabla 36. Contenido de polifenoles totales en sanky (<i>Corryocactus brevistylus</i>) liofilizado..	70
Tabla 37. Contenido de polifenoles totales en bebida tipo kombucha con sanky liofilizado ..	70
Tabla 38. ANOVA de tiempo y concentración a la vez para el contenido de polifenoles.....	72
Tabla 39. Materiales, reactivos, equipos de análisis y procesos	87
Tabla 40. Análisis proximal del sanky (<i>Corryocactus brevistylus</i>)	90
Tabla 41. Análisis proximal del sanky (<i>Corryocactus brevistylus</i>) liofilizado.....	91
Tabla 42. Datos de la curva de calibración para polifenoles totales.	92
Tabla 43. Datos de la curva de calibración para Trolox-DPPH.	92
Tabla 44. Curva de calibración de Trolox -ABTS	93



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sanky (<i>Corryocactus brevistylus</i>) liofilizado	17
Figura 2. Reacción de DNS para detección de glucosa.....	17
Figura 3. Esquema general del ensayo DPPH.....	20
Figura 4. Formación del radical ABTS mediante el persulfato de potasio	23
Figura 5. Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu.....	26
Figura 6. Diagrama de flujo de preparación de Kombuncha	29
Figura 7. Esquema de preparación de bebida.....	37
Figura 8. Protocolo para el aislamiento de levaduras.....	39
Figura 9. Crecimiento de colonias en medio YPD	39
Figura 10. Morfología microscópica de levaduras (100X)	40
Figura 11. Protocolo para el aislamiento de bacterias ácido-acéticas	41
Figura 12. Crecimiento de colonias en medio MYP	41
Figura 13. Tinción Gram de bacterias ácido-acéticas (100X).....	42
Figura 14. Resultados de hidrólisis de urea.....	44
Figura 15. Evidencia de fermentación y producción de gas	46
Figura 16. Pruebas bioquímicas para levaduras	48
Figura 17. Formación de halos.....	49
Figura 18. Viraje con los distintos indicadores	50
Figura 19. Formación de celulosa.	50
Figura 20. Análisis molecular para levaduras	51
Figura 21. Variación de pH en 168 horas.....	55
Figura 22. Variación de ácido acético a 28° C en 168 horas.	56
Figura 23. Variación de los sólidos solubles (°Brix) a 28° C en 168 horas.....	57
Figura 24. Variación de los azúcares reductores a 28° C en 168 horas.	58
Figura 25. Curva de calibración para Trolox-DPPH.....	61
Figura 26. Efectos principales y comparación Tukey para la capacidad antioxidante DPPH .	64
Figura 27. Datos de la curva de calibración para Trolox-ABTS.....	65
Figura 28. Efectos principales y comparación Tukey para la capacidad antioxidante ABTS .	68
Figura 29. Curva de calibración para polifenoles totales.	69
Figura 30. Efectos principales y comparación Tukey para polifenoles totales	72
Figura 31. Curva de calibración utilizando glucosa como estándar.....	92

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Materiales empleados en la elaboración de tesis	87
Anexo 2. Reporte de análisis del sanky (<i>Corryocactus brevistylus</i>).....	90
Anexo 3. Reporte de análisis del sanky (<i>Corryocactus brevistylus</i>) liofilizado	91
Anexo 4. Curva de calibración de Azúcares reductores.....	92
Anexo 5. Valores de absorbancia obtenidos por espectrofotometría	92
Anexo 6. Valores de absorbancia para determinación de actividad antioxidante DPPH.....	92
Anexo 7. Valores de absorbancia para determinación de actividad antioxidante ABTS.....	93
Anexo 8. Secuencia de ADN NI16-44	94
Anexo 9. Resultados de identificación mediante algoritmo BLAST	94
Anexo 10. Secuencia de ADN NI13-44	94
Anexo 11. Resultados de identificación mediante algoritmo BLAST	94
Anexo 12. Secuenciación de ADN NII12-43.....	95
Anexo 13. Resultados de identificación mediante algoritmo BLAST	95
Anexo 14. Secuenciación de ADN NII12-44.....	96
Anexo 15. Resultados de identificación mediante algoritmo BLAST	96

INTRODUCCIÓN

Actualmente, la industria alimentaria está en búsqueda de nuevos productos que no sólo proporcionen nutrientes, sino que también brinden beneficios para la salud a través de una nutrición eficiente. En consecuencia, existe un incremento en la fabricación de alimentos con características funcionales; estos se definen como alimentos con propiedades adicionales a su función primaria de nutrición y tienen la capacidad de ejercer efectos fisiológicos en el organismo y reducir el riesgo de enfermedades (1).

Se ha evidenciado un incremento en el consumo de las bebidas funcionales, ya que han captado la atención del público debido a sus beneficios para la salud, observándose un mayor reconocimiento en los últimos años por parte de los consumidores. Además, se prevé un notorio crecimiento de este mercado durante los próximos 10 años (2).

En línea con esta tendencia, el interés por los alimentos y bebidas funcionales ha crecido notablemente en los últimos años, impulsado por una mayor conciencia sobre el vínculo entre la alimentación y la salud a largo plazo, especialmente cuando se trata de productos que aportan compuestos bioactivos con efectos beneficiosos. Es así como las bebidas funcionales han ganado gran popularidad, al ofrecer una manera práctica de incorporar sustancias saludables en la dieta diaria, destacando entre ellas aquellas con actividad antioxidante, que ayudan a proteger las células del estrés oxidativo, un proceso asociado al desarrollo de diversas enfermedades crónicas. Un claro ejemplo de este tipo de bebidas es la kombucha, una bebida fermentada tradicional que se obtiene a partir de té azucarado gracias a la acción de un consorcio simbiótico de bacterias y levaduras, conocido como SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*). Durante la fermentación, los microorganismos metabolizan los azúcares y los compuestos del té, generando una bebida rica en ácidos orgánicos, vitaminas, aminoácidos y compuestos fenólicos. Esta transformación bioquímica es clave para las propiedades funcionales de la kombucha, pues la actividad metabólica del consorcio produce diversos metabolitos bioactivos que aumentan tanto su valor nutricional como su potencial para la salud (3).

Asimismo, diversos estudios han demostrado que el proceso de fermentación influye significativamente en el perfil antioxidante de la kombucha. La actividad microbiana puede transformar compuestos fenólicos complejos presentes en las hojas de té en moléculas más pequeñas y biodisponibles, lo que puede generar incrementos en el contenido total de compuestos fenólicos y en la capacidad antioxidante en comparación con el té sin fermentar. Con el objetivo de potenciar estas propiedades funcionales, diferentes investigaciones han

explorado la incorporación de frutas, vegetales y plantas como sustratos adicionales durante la fermentación. Esta práctica no solo permite diversificar las características sensoriales de la bebida, sino también enriquecerla con compuestos bioactivos propios de los ingredientes añadidos (4).

En este contexto, los frutos nativos de la región andina representan una alternativa prometedora para el desarrollo de nuevas bebidas funcionales. El sanky (*Corryocactus brevistylus*), fruto originario de los Andes, destaca por su elevado contenido de ácido ascórbico, compuestos fenólicos y otros metabolitos con potencial antioxidante. No obstante, su aplicación en bebidas fermentadas como la kombucha ha sido poco estudiada (5).

Por ello, la presente investigación tiene como objetivo general elaborar y caracterizar las propiedades fisicoquímicas y la capacidad antioxidante de una bebida tipo kombucha enriquecida con sanky (*Corryocactus brevistylus*) liofilizado. Además, se evalúan el contenido de compuestos fenólicos totales, la capacidad antioxidante *in vitro*, determinada mediante los métodos DPPH y ABTS. De manera complementaria, se realizó la caracterización microbiológica del consorcio SCOBY empleado, con el fin de identificar los microorganismos predominantes en el proceso fermentativo.

HIPÓTESIS

La adición de sanky (*Corryocactus brevistylus*) liofilizado en diferentes concentraciones durante la fermentación de kombucha modifica significativamente las variables fisicoquímicas del producto y permite obtener una bebida funcional con mayor actividad antioxidante y mayor contenido de polifenoles totales, existiendo una concentración óptima de sanky que maximiza estos atributos.



OBJETIVOS

Objetivo general

- Elaborar y caracterizar fisicoquímica y analíticamente una bebida fermentada a base de Kombucha y Sanky (*Corryocactus brevistylus*) liofilizado.

Objetivos específicos

- Aislar, caracterizar e identificar los microorganismos del consorcio SCOBY/kombucha utilizados en la fermentación.
- Determinar el efecto de la concentración de sanky en la fermentación y variables fisicoquímicas.
- Determinar la concentración adecuada de sanky (*Corryocactus brevistylus*) para la elaboración de una bebida funcional según su actividad antioxidante.
- Determinar la concentración adecuada de sanky (*Corryocactus brevistylus*) para la elaboración de una bebida funcional según los polifenoles totales.

VARIABLES E INDICADORES

A continuación, se presenta el cuadro con las variables dependientes e independientes que fueron evaluadas en este proyecto.

Tabla 1. Operacionalización de variables

VARIABLES	INDICADORES	CATEGORIAS	INSTRUMENTOS
Variables independientes			
Dosificación de sanky (<i>Corryocactus brevistylus</i>)	Concentración de liofilizado de sanky en la formulación	% p/v	Balanza analítica
Tiempo	Tiempo de fermentación	Horas	Cronometro digital
Variables dependientes			
Capacidad antioxidante	Actividad antioxidante (DPPH)	μmol TE/mL	Espectrofotómetro
	Actividad antioxidante (ABTS)	μmol TE/mL	Espectrofotómetro
Compuestos fenólicos totales	Contenido de polifenoles totales	mg EAG/mL	Espectrofotómetro
Ácido acético	Contenido de ácido acético	%	Titulación ácido-base
Azúcares reductores	Contenido de azúcares reductores	g/L	Espectrofotómetro
Sólidos solubles	Contenido de solido ssolubles	°Brix	Refractómetro
pH	pH de fermentación	0-14	pHmetro
Variable de control			
Temperatura	Temperatura de fermentación	°C	Termómetro digital

Nota: Elaboración propia.



CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Kombucha

1.1.1 Generalidades

La kombucha es una bebida fermentada elaborada a partir de té y sacarosa como fuente de carbono, mediante la acción simbiótica de bacterias ácido-acéticas y levaduras que conforman el denominado SCOBY (6,7).

1.1.2 Composición de la kombucha

1.1.2.1 SCOBY y composición microbiana

El proceso fermentativo es llevado a cabo por el SCOBY, el cual transforma la sacarosa en diversos metabolitos, como etanol y ácidos orgánicos, principalmente ácido acético que, según el origen del inóculo, pueden influir en las características finales de la bebida (8). Dentro de este consorcio microbiano se han identificado bacterias como *Acetobacter aceti*, *Bacterium gluconicum* y *Acetobacter pasteurianus*, y *Komagataeibacter spp.*, así como levaduras de los géneros *Saccharomyces*, *Brettanomyces* y *Starmerella* (9).

1.1.2.2 Sustratos de fermentación

El té utilizado puede variar entre té negro, verde u oolong, lo que influye en las características sensoriales de la bebida final (10). La principal fuente de carbono es la sacarosa; sin embargo, el uso de otros azúcares o subproductos como la melaza puede modificar el proceso fermentativo debido a su contenido de minerales y compuestos orgánicos (11).

1.1.3 Fermentación de la bebida tipo kombucha

La fermentación comprende dos procesos principales: una fermentación alcohólica llevada a cabo por levaduras, y una oxidación posterior mediada por bacterias ácido-acéticas (12–14).

Durante este proceso, la sacarosa es hidrolizada en glucosa y fructosa por acción de la invertasa; posteriormente, las levaduras convierten estos azúcares en etanol mediante glucólisis, mientras que las bacterias oxidan el etanol a ácido acético (7,11,15).

Asimismo, las bacterias del género *Acetobacter* participan en la formación de ácido acético y otros compuestos como ácido glucónico, además de contribuir a la síntesis de celulosa que da origen a la estructura del SCOBY (15,16).

1.1.3.1 Metabolismo de las levaduras

Las levaduras presentes en el SCOBY participan activamente en las primeras etapas de la fermentación debido a su capacidad para utilizar azúcares como fuente de energía. Entre los géneros más reportados en kombucha destacan *Saccharomyces*, *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces* y *Starmerella*, los cuales presentan tolerancia a condiciones ácidas y a concentraciones moderadas de etanol generadas durante el proceso fermentativo. Además, algunas levaduras contribuyen a la formación de compuestos aromáticos, influyendo en las características sensoriales y funcionales de la bebida (8).

1.1.3.2 Producción de ácido acético

Las bacterias ácido-acéticas emplean el etanol producido durante la fermentación como sustrato para la síntesis de ácido acético. Este proceso favorece la disminución progresiva del pH y el incremento de la acidez característica de la kombucha. Entre los géneros asociados a esta actividad destacan *Acetobacter*, *Gluconobacter* y *Komagataeibacter*, microorganismos adaptados a medios ácidos y aerobios (8).

1.1.3.3 Producción de celulosa y metabolitos bioactivos

Algunas bacterias ácido-acéticas, principalmente del género *Komagataeibacter*, poseen la capacidad de sintetizar celulosa bacteriana, formando la biopelícula característica del SCOBY. Esta estructura proporciona soporte y protección al consorcio microbiano durante la fermentación. Asimismo, las interacciones metabólicas entre bacterias y levaduras favorecen la generación de metabolitos bioactivos, incluyendo ácidos orgánicos, vitaminas y compuestos con capacidad antioxidante, asociados a las propiedades funcionales de la kombucha (8).

1.1.4 Beneficios de la bebida tipo kombucha

1.1.4.1 Efecto antioxidante

El potencial funcional de la bebida tipo kombucha se asocia principalmente a la presencia de compuestos fenólicos y otros metabolitos generados durante la fermentación, los cuales presentan capacidad antioxidante (14,17). Estos compuestos contribuyen a la neutralización de radicales libres, siendo su concentración dependiente de las condiciones del proceso fermentativo (18).

1.2 Sanky (*Corryocactus brevistylus*)

1.2.1 Generalidades

Sanky (*Corryocactus brevistylus*), viene a ser una planta perteneciente a las cactáceas autóctonas de los Andes. En la comunidad local de Arequipa, este fruto recibe el apodo de “quita hambre” y es apreciado como un alimento energético durante largas jornadas de trabajo. A pesar de esto, la cáscara de este fruto a menudo se subestima debido a la falta de información, aunque podría albergar valiosas sustancias bioactivas (19).

1.2.2 Propiedades

El sanky (*Corryocactus brevistylus*) ha despertado interés debido a su contenido de compuestos bioactivos, principalmente compuestos fenólicos, vitaminas y minerales. Diversos estudios señalan que estos compuestos contribuyen a su capacidad antioxidante, lo que ha motivado su uso potencial en el desarrollo de alimentos funcionales y productos nutraceuticos (20):

1.2.3 Composición nutricional

El Sancayo o Sanky es una especie perteneciente a las cactáceas, caracterizadas por su morfología similar a la de un cactus arbustivo que se ramifica desde la base, que alcanza alturas que oscilan entre 1.5 y 5.0 m. Presenta un tronco corto y robusto con un diámetro hasta 50 cm, predominantemente con ramificación desde su origen (21).

1.3 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante se define como la capacidad de ciertos compuestos para inhibir o retardar la oxidación de un sustrato, incluso cuando se encuentran en bajas concentraciones. Estos compuestos pueden clasificarse en antioxidantes primarios, que interrumpen las reacciones en cadena de oxidación, y antioxidantes secundarios, que actúan retardando la velocidad de dichas reacciones (22).

1.4 Métodos de Cuantificación de capacidad antioxidante

La necesidad de una evaluación del estado de antioxidantes en nuevos componentes alimenticios ha hecho que se desarrollase diversas técnicas para medir la capacidad de antioxidantes presentes en la dieta (23). La actividad de un antioxidante no puede llegarse a

evaluar de manera directa, sino que se evalúa a través de los efectos que tiene en la regulación del nivel de oxidación (22).

1.4.1 Método Folin-Ciocalteu

La prueba de Folin-Ciocalteu es un método ampliamente utilizado para determinar el contenido fenólico total (CPT) en alimentos de origen vegetal, bebidas y muestras biológicas. Aunque inicialmente se diseñó para analizar proteínas, fue adaptada para evaluar polifenoles, especialmente en vinos, y se ha convertido en un estándar para medir la capacidad antioxidante. Este ensayo, basado en la reducción de un reactivo complejo que incluye ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico, genera un cromóforo azul con máxima absorción a 765 nm, siendo el ácido gálico el estándar más utilizado. La prueba es simple, reproducible y robusta, aunque puede sobreestimar el CPT debido a la interferencia de agentes reductores no fenólicos (24).

1.4.2 Método DPPH

El método DPPH se basa en la reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•), el cual presenta una coloración púrpura que disminuye al reaccionar con compuestos antioxidantes. Esta disminución de color se mide espectrofotométricamente a una longitud de onda de 517 nm, siendo proporcional a la capacidad antioxidante de la muestra (24).

1.4.3 Método ABTS

Consiste en evaluar la capacidad que poseen los antioxidantes encargados de neutralizar el radical catión estable conocido como 2,2 – azinobis (ácido 3 – etilbenzotiotiazolin – 6 – sulfónico) (ABTS •+), el cual viene a ser un cromóforo color azul-verde de máxima absorción a 734 nm, cuya intensidad en su color disminuye en presencia de antioxidantes, ABTS •+ puede producirse por oxidación del ABTS en presencia de agentes oxidantes. La medida del grado de decoloración del color azul-verde, cuantificado como una caída repentina de la absorbancia a 734 nm, está influenciada por el tiempo de reacción, actividad antioxidante intrínseca y concentración de muestra evaluada (24).

1.5 Marco legal

La investigación y desarrollo de alimentos y bebidas destinadas al consumo humano debe cumplir con normativas que garanticen su inocuidad, calidad y correcta caracterización. En este

contexto, los organismos internacionales y las legislaciones nacionales establecen lineamientos para la producción, control y comercialización de alimentos y bebidas funcionales.

En el Perú, la Ley N.º 1062 – Ley de Inocuidad de los Alimentos establece los principios generales para garantizar que los alimentos destinados al consumo humano sean seguros y aptos para su consumo. Asimismo, el Reglamento sobre Vigilancia y Control Sanitario de Alimentos y Bebidas, aprobado mediante Decreto Supremo N.º 007-98-SA, regula las condiciones sanitarias de elaboración, almacenamiento y comercialización de alimentos y bebidas (25).

1.6 Análisis antecedentes investigativos

1.6.1 Investigaciones nacionales

Peng et al. (26) desarrollaron un sistema de edición genética basado en el gen *sacB* para modificar cepas de *Komagataeibacter xylinus* aisladas del SCOBY de kombucha, con el objetivo de optimizar la producción de celulosa bacteriana y estudiar la función de los operones *bcs* involucrados en su biosíntesis. Mediante eliminaciones, inserciones y reemplazos génicos, los autores demostraron que el operón *bcs I* es esencial para la producción de celulosa, mientras que la eliminación de los operones *bcs II* y *bcs III* incrementó significativamente el diámetro de las fibras y la cristalinidad de las películas de celulosa obtenidas. Estos resultados evidencian que la ingeniería genética de los microorganismos presentes en el SCOBY permite no solo aumentar el rendimiento de compuestos de interés, sino también modificar sus propiedades fisicoquímicas, abriendo nuevas posibilidades para el diseño de biopolímeros con aplicaciones específicas en las industrias médica, electrónica y alimentaria.

Rojas et al. (19) evaluaron la extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de la cáscara de sanky (*Corryocactus brevistylus*), considerando variables como concentración de solvente, tiempo y temperatura. Los resultados mostraron un alto contenido de compuestos fenólicos, alcanzando valores de hasta 43.9 mg de ácido gálico por gramo de muestra seca. Estos resultados evidencian el potencial del sanky como fuente de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante

Díaz (27) en su tesis titulada “Nueva bebida análoga a la kombucha hecha de molle, matico y cedron: perfiles bioactivo y sensorial”, desarrolló una bebida tipo kombucha a partir de matico (*Buddleja globosa*), molle (*Schinus molle* L.) y cedrón (*Aloysia citriodora*), empleando fermentación con SCOBY en medio azucarado. Se evaluaron parámetros fisicoquímicos,

contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante. Los resultados mostraron que formulaciones con mayor proporción de molle presentaron mayor formación de ácidos orgánicos, mientras que combinaciones con matico evidenciaron altos niveles de compuestos fenólicos y actividad antioxidante superior al 70%. Estos resultados confirman el potencial de materias primas vegetales en la mejora del perfil antioxidante de bebidas fermentadas.

Pachas (28) determinó el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante en cervezas artesanales e industriales mediante los métodos Folin-Ciocalteu y DPPH. Los resultados evidenciaron mayores concentraciones de compuestos fenólicos y mayor actividad antioxidante en cervezas artesanales en comparación con las industriales. Esto demuestra la relación entre el contenido fenólico y la capacidad antioxidante en bebidas fermentadas.

Surco Laos et al. (29) evaluaron el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante en extractos de semillas de *Vitis vinifera* mediante técnicas de extracción asistida y el método DPPH. Los resultados evidenciaron concentraciones significativas de compuestos bioactivos con alta capacidad antioxidante, destacando su potencial en el desarrollo de productos funcionales.

Contreras-López et al. (30) evaluaron la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos en formulaciones de infusiones a base de cáscara de sanky (*Corryocactus brevistylus*) y canela (*Cinnamomum verum*). Los resultados mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$), con altos niveles de fenoles totales y actividad antioxidante en las formulaciones evaluadas. Estos hallazgos confirman el potencial del sanky como fuente de compuestos bioactivos

1.6.2 Investigaciones internacionales

Vásquez (31) en su tesis titulada “Estandarización del proceso de fermentación y evaluación sensorial de una bebida tipo kombucha utilizando infusiones herbales”, estandarizó el proceso de fermentación y caracterizó bebidas tipo kombucha elaboradas con infusiones herbales. Mediante análisis cromatográficos se identificaron compuestos como epigallocatequina galato (EGCG), cafeína y ácido gálico, asociados a la actividad antioxidante. Los resultados evidencian la presencia de compuestos fenólicos relevantes generados durante el proceso fermentativo.

Villamar (32) evaluó la capacidad antioxidante de bebida tipo kombucha elaborada con pulpa de *Artocarpus heterophyllus*, utilizando el método DPPH. Los resultados mostraron valores de

actividad antioxidante de hasta 19.1 mg EAG/L, evidenciando que la incorporación de matrices vegetales puede incrementar el potencial antioxidante de la bebida.

Morán y Quimís (33) evaluaron las propiedades fisicoquímicas y la actividad antioxidante de una bebida tipo kombucha con extracto de hoja de banano. Los resultados evidenciaron disminución de pH y °Brix durante la fermentación, así como valores de actividad antioxidante superiores al 70% mediante DPPH. Estos resultados confirman la influencia del proceso fermentativo en la generación de compuestos antioxidantes.

Morales (34) en su tesis titulada *“Aplicación de mucílago de cacao como fuente de azúcares en el proceso fermentativo del SCOBY para obtener una bebida fermentada”*, evaluó el uso de mucílago de cacao como fuente de azúcares en el proceso fermentativo del SCOBY para la obtención de una bebida fermentada. Los resultados mostraron características fisicoquímicas adecuadas y ausencia de microorganismos no deseados, confirmando la viabilidad del proceso fermentativo y su aplicación en nuevas formulaciones

Lee (35) evaluó la bebida tipo kombucha elaborada con trigo sarraceno y bardana, determinando la actividad antioxidante mediante los métodos DPPH y ABTS. Los resultados evidenciaron un alto contenido de polifenoles (180 µg/mL) y una capacidad de inhibición superior al 90%, confirmando que ingredientes ricos en compuestos fenólicos incrementan significativamente la actividad antioxidante de la bebida.



CAPÍTULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1 Lugar de ejecución

La presente investigación se desarrolló en el grupo de investigación “Biotecnología Microbiana y Biomasa” (BIOMIAS) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ubicado en la sede de Medicina de San Fernando, Lima, Perú. Los análisis fisicoquímicos, microbiológicos y de actividad antioxidante se realizaron en los laboratorios del mencionado grupo de investigación.

El desarrollo experimental de la investigación se llevó a cabo durante el periodo comprendido entre los meses de 2024 de agosto y febrero de 2025.

2.2 Materiales

2.2.1 Materiales, reactivos y equipos

Los equipos, reactivos y materiales de laboratorio empleados en esta investigación se encuentran descritos en el Anexo 1.

2.2.2 Materia prima

Se obtuvo la fruta de sanky (*Corryocactus brevistylus*) fresca, proveniente de forma silvestre en la provincia de Castilla, departamento de Arequipa, específicamente en el distrito de Andagua (15°29' S; 72°21' O), a una altitud de 3574 m s. n. m. La recolección correspondiente a la temporada de invierno.

El té negro (*Camellia Sinensis*) empleado como sustrato de fermentación fue de origen comercial, correspondiente a la marca Del Valle Premium Cusco (Agrofilhuyro), Perú.

2.2.3 Material biológico

El cultivo simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY) fue obtenido a partir de un cultivo madre comercial de la empresa Kombucha Perú, adquirido en la ciudad de Lima, Perú, y empleado como inóculo en el proceso fermentativo. Este SCOBY comercial constituyó el sistema biológico principal utilizado en los ensayos de fermentación de kombucha suplementada con sanky. A partir de este mismo cultivo se realizaron, de manera complementaria, el aislamiento e identificación de levaduras y bacterias ácido-acéticas, con fines de caracterización microbiológica del consorcio empleado.

2.3 Métodos Analíticos

2.3.1 Análisis proximal del sanky (*Corryocactus brevistylus*)

Se realizó el análisis proximal del sanky fresco en el laboratorio Centro de Control Analítico (CCA), ubicado en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Los ensayos incluyeron la determinación de humedad, cenizas, grasas, proteínas, fibras y carbohidratos, empleando métodos oficiales de la AOAC. La humedad fue determinada mediante secado en estufa (AOAC 966.2), las cenizas por incineración en mufla (AOAC 941.12), las grasas mediante extracción Soxhlet (AOAC 930.09), las proteínas por el método Kjeldahl (AOAC 977.02), la fibra mediante digestión ácido-alcalina (AOAC 930.10) y los carbohidratos por diferencia (AOAC 931.02).

De manera complementaria, se obtuvo también el análisis proximal de sanky liofilizado en el Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos de la Universidad Nacional Agraria La Molina, con fines de registro y documentación del proceso, empleando métodos oficiales AOAC para la determinación de humedad, proteína total, extracto etéreo, fibra cruda y cenizas.

2.3.2 Liofilización de la muestra de sanky (*Corryocactus brevistylus*)

Las muestras de sanky (*Corryocactus brevistylus*) fueron sometidas al proceso de liofilización (Figura 1), realizada por la empresa Industrias RAN SAC. Previamente, la fruta fue acondicionada y fraccionada para su procesamiento. Para la obtención del liofilizado, se emplearon aproximadamente 25 kg de pulpa fresca de sanky. La liofilización consistió en la deshidratación de la muestra mediante congelación y posterior eliminación del agua por sublimación a bajas temperaturas y presión reducida, con la finalidad de preservar los compuestos bioactivos y minimizar alteraciones fisicoquímicas.

El proceso permitió obtener un producto deshidratado con menor contenido de humedad y mayor estabilidad para su almacenamiento y posterior evaluación experimental. Una vez obtenida la muestra liofilizada, esta fue almacenada en bolsas herméticas de polipropileno, protegidas de la humedad y de la exposición prolongada a altas temperaturas hasta su utilización en los análisis correspondientes. La liofilización permite conservar compuestos bioactivos sensibles al calor, debido a que reduce los cambios oxidativos y favorece la estabilidad del producto durante el almacenamiento, como reportan estudios previos (36).



Figura 1. Sanky (*Corryocactus brevistylus*) liofilizado

2.3.3 Determinación de azúcares reductores

Se realizó mediante el método colorimétrico con ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS) el cual causa una reducción en presencia de calor y de azúcares reductores, determinándose los grupos carbonilos libres (C=O), obteniéndose un cambio de color visible de amarillo a rojo la cual se da en una relación estequiométrica de 1 mol de azúcar con 1 mol de ácido 3,5-dinitrosalicílico lo cual permite cuantificar la presencia de azúcares reductores en una muestra (37), (Figura 2).

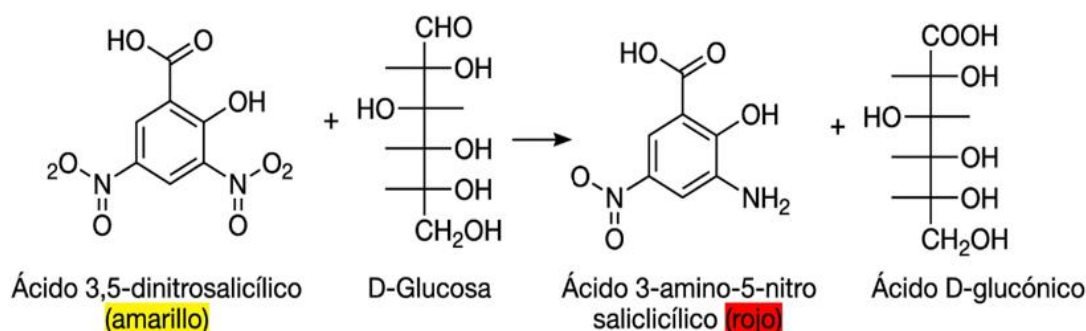


Figura 2. Reacción de DNS para detección de glucosa.

Para la preparación del reactivo DNS se depositaron 50 mL de agua destilada en un vaso de 250 mL, a los que se adicionaron 1,6 g de hidróxido de sodio (NaOH), disolviéndolos mediante agitación continua en una plancha magnética a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron lentamente 43,8 g de tartrato de sodio y potasio hasta lograr su completa disolución, optimizando el proceso a 60 °C durante 10 minutos (38). El vaso se recubrió con papel aluminio para proteger de la luz, y se incorporaron lentamente 1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico. La solución se completó con agua destilada hasta 100 mL en un balón aforado, dejándola en agitación toda la noche en un frasco oscuro (39).

Para la cuantificación de azúcares reductores se elaboró una curva patrón a partir de distintas concentraciones de glucosa en ppm (38).

Se tomaron 0,5 mL de cada concentración de glucosa, se mezclaron con 0,5 mL de agua destilada y 1 mL de reactivo DNS en tubos aparte. Los tubos se incubaron en baño maría a 95 °C durante 5 minutos, luego en baño de hielo por 5 minutos. A cada tubo se agregaron 3 mL de agua destilada y se homogenizaron en vórtex por 0,5 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia de cada muestra a 540 nm en un espectrofotómetro (39) (Anexo 4).

En el caso de las muestras, se mezclaron 0,5 mL de muestras con 0,5 mL del reactivo DNS en tubos de ensayo, los cuales fueron agitados en vortex, y se llevaron a ebullición durante 5 minutos en baño maría. Posteriormente, los tubos se enfriaron en un baño de hielo durante 5 minutos, se añadieron 3 mL de agua destilada a cada uno, se agitaron nuevamente en vortex y se dejaron reposar durante 15 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia a 540 nm utilizando un espectrofotómetro visible (40).

2.3.4 Determinación de pH

Se midió la tasa de cambios del pH por el método potenciométrico, basándose en el método AOAC 981.12. Inicialmente, el potenciómetro se calibró a tres puntos con buffers de pH 4, 7 y 10 (41). Una vez obtenidas las muestras de fermentación se centrifugaron a 3000 rpm a 10 °C, y en un matraz de 25 mL se coloca el sobrenadante y se deja en reposo, hasta que se estabilice el rango pH.

2.3.5 Determinación de acidez titulable (ácido acético)

La acidez titulable se midió según la técnica oficial AOAC (1999) (42), que se basa según a una volumetría ácido-base, que valora la acidez de la fermentación, expresada en g de ácido acético por cada litro de muestra fermentada. Se colocaron 1 mL del sobrenadante de fermentación (previamente centrifugado) más 10 mL de agua destilada en un matraz de 100 mL, después se agregó una gota del indicador de fenolftaleína e inmediatamente se tituló con NaOH 0,1 N. Cuando se observó que la solución se torna de color rosada rocella se finalizó la titulación y el volumen gastado fue utilizado para el cálculo del ácido acético, según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Ácido acético} = \frac{(A * B * C) * 100}{D}$$

Donde A es el volumen gastado de NaOH; B la normalidad de la solución de NaOH (0.1); C el peso equivalente expresado en g de ácido predominante en la muestra (ácido acético 60 g/meq) y D peso en gramos de la muestra utilizada (43).

2.3.6 Determinación de sólidos solubles

El contenido de sólidos solubles (°Brix) fue determinado de acuerdo con el método AOAC 932.12, con un refractómetro manual que consiste en la cantidad de sólidos solubles (comúnmente azúcares) disueltos en un líquido (44). Inicialmente, al realizar la medición, el prisma del refractómetro se limpió con agua destilada; luego, se colocó una gota de la muestra de fermentación (previamente centrifugado) sobre la superficie del refractómetro, asegurando una cobertura uniforme. Se dirigió el refractómetro hacia una fuente de luz y se registró el valor en la escala de °Brix. El prisma se limpió con agua destilada entre cada medición. Las lecturas se realizaron a cada muestra por duplicado.

2.3.7 Evaluación de capacidad antioxidante:

a. Método DPPH

El ensayo de antioxidantes se fundamenta en la captura del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), lo que genera una disminución en la absorbancia a 515/517 nm. Este ensayo se basa en el mecanismo de transferencia de un solo electrón (SET, Single Electron Transfer), el cual permite evaluar la capacidad de un compuesto antioxidante para transferir un electrón y reducir diversas sustancias, incluidos metales, carbonilos y radicales. La sustancia antioxidante actúa como donante de átomos de hidrógeno al ser añadida a la solución de DPPH, reduciendo el radical DPPH y formando hidracina, lo que provoca que la solución vire del violeta a amarillo claro, Figura 3. Al no estar limitado a un tipo específico de compuestos, este método constituye una herramienta sencilla para determinar el potencial antioxidante total de diferentes muestras (45).

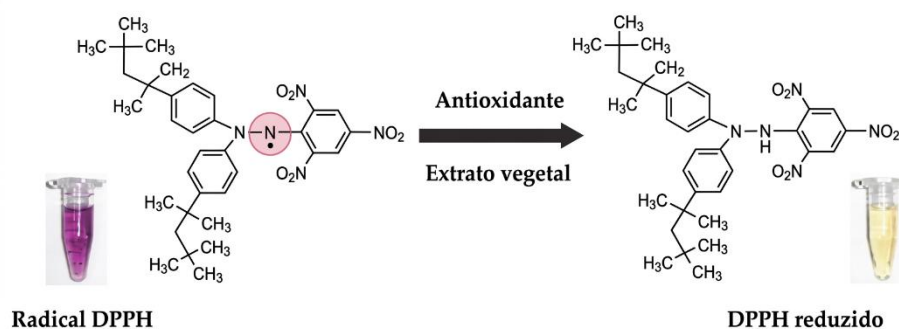


Figura 3. Esquema general del ensayo DPPH

Para la preparación de reactivos, se empleó una solución de DPPH ajustada a una concentración de 2.1 mmol/L, siguiendo el procedimiento reportado en el método de referencia. Para ello, se disolvieron 4.14 mg de DPPH (MM = 394.32 g/mol) en un volumen total de 5 mL de metanol. La solución fue homogenizada mediante agitación durante un periodo de 40 a 50 minutos. Posteriormente, se comprobó la absorbancia de la solución DPPH a 517 nm, verificando que se encontrara dentro del rango establecido de 1.00 ± 0.05 , equivalente al control utilizado en el método de referencia

Para la curva de calibración, se preparó una solución madre de Trolox (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) disolviendo 1 mg de Trolox en 20 mL de metanol (50 µg/mL), que fue utilizada como solución de trabajo para preparar las concentraciones estándar. A partir de esta, se realizaron diluciones para obtener concentraciones finales de 0.02 a 0.04 mmol/L.

Para la construcción de la curva de calibración, el ensayo fue adaptado a formato de microplaca, añadiendo 280 µL de la solución de DPPH y 20 µL de las soluciones estándar de Trolox en cada pocillo, alcanzando un volumen de 300 µL (Tabla 2) y se llevó a incubar durante 30 minutos, protegiéndolas de la luz directa. Las absorbancias se leyeron utilizando un espectrofotómetro ajustado a un rango de 517 nm (45).

Tabla 2. Preparación de soluciones para la curva estándar del ensayo DPPH en microplaca.

Concentración (µg / mL)	Sol. DPPH (µl)	Trolox (µl/mL)	Metanol (µl)	Volumen total (µl)
Blanco	-	-	300	300
0	280	-	20	300
0.5	280	1.5	18.5	300
1	280	3.0	17	300
1.5	280	4.5	15.5	300
2	280	6	14	300

Nota: Elaboración propia.

En cuanto al porcentaje de actividad antioxidante (%AAO), la prueba se basó en el cambio de color de la solución, que pasó de violeta a amarillo (45). Este cambio se atribuye a la reducción del radical DPPH (violeta) a DPPH-H. La disminución en la absorbancia a 517 nm reflejó este proceso, resultando en una curva decreciente. Para determinar el %Inhibición, se utilizaron los valores obtenidos durante las pruebas y se aplicaron a la fórmula correspondiente.

$$\%Inhibición = \frac{(Abs\ del\ Control\ DPPH - Abs\ de\ la\ muestra)}{Abs\ del\ Control\ DPPH} * 100$$

Para el procesamiento de la muestra de liofilizado de sanky (*Corryocactus brevistylus*), se prepararon extractos a partir de tres concentraciones distintas: 0.1 g, 0.2 g y 0.3 g del material, disueltos cada uno en 1 mL de metanol al 100 %, obteniéndose concentraciones iniciales de 0.1, 0.2 y 0.3 g/mL, respectivamente. Las soluciones fueron protegidas de la luz y sometidas a un tratamiento con ultrasonido (40 kHz, 50 °C) durante 5 minutos. Posteriormente, fueron centrifugadas a 14,500 rpm por 15 minutos, y el sobrenadante fue evaporado a 40 °C durante 60 minutos. Finalmente, el residuo seco fue reconstituido con 5 mL de agua Mili-Q. Este procedimiento fue realizado por triplicado, siguiendo el protocolo adaptado de Salazar et al. (46). Para la evaluación antioxidante mediante DPPH, se empleó el protocolo Santos et al. (47), con ligeros cambios. En cada pocillo se colocaron 20 µL del extracto y 280 µL de una solución de DPPH previamente preparada. Las microplacas fueron incubadas en oscuridad durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Al término del tiempo de reacción, la absorbancia de cada pocillo fue medida en un lector de microplacas a una longitud de onda de 517 nm. Debido a la alta pigmentación del extracto de sanky, se preparó una muestra en blanco específica para cada ensayo, a fin de evitar interferencias en las lecturas de absorbancia. La absorbancia del blanco fue restada de la absorbancia de la muestra tratada. La capacidad antioxidante fue calculada a partir del porcentaje de inhibición del radical DPPH, y los resultados fueron expresados como micromol equivalentes de Trolox por gramo de muestra (µmol TE/g).

Para las muestras del fermentado se consideró, el mismo protocolo de Santos et al. (47), se realizó una dilución 1:50 con agua Mili-Q con el objetivo de situar la absorbancia dentro del rango lineal del ensayo. Posteriormente, se tomaron 20 µL de la muestra diluida y se añadieron 280 µL de la solución de DPPH en cada pocillo de la microplaca. La mezcla fue incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente (25 °C), en ausencia de luz y con agitación constante a 400 rpm. Se realizaron cinco réplicas por muestra para asegurar la precisión de los

resultados. Finalmente, se registraron las absorbancias a 517 nm y los valores obtenidos se emplearon para calcular el porcentaje de inhibición del radical. La actividad antioxidante fue expresada en micromol equivalentes de Trolox por mililitro de muestra ($\mu\text{mol TE/mL}$).

Tabla 3. Preparación de muestras para el ensayo DPPH en microplaca.

Muestra	Sol. DPPH (μl)	Muestra (μl)	Metanol (μl)	Volumen total (μl)
Control DPPH	280	-	20	300
Blanco de reactivos	-	-	300	300
Blanco de la muestra	-	20	280	300
Muestra del liofilizado	280	20	-	300
Muestra del fermentado	280	20	-	300

Nota: Elaboración propia.

b. Método ABTS-TEAC (Capacidad antioxidante de equivalente al Trolox)

El ensayo TEAC es una técnica espectrofotométrica que evalúa la capacidad de los antioxidantes para inhibir la absorbancia del catión radical ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)), un cromóforo azul-verde con un espectro de absorción característico. Los cationes radicales de ABTS se generan utilizando oxidantes fuertes, como el persulfato potásico, que en presencia de metamioglobina producen un radical intermedio (ferrimioglobina) que reacciona con ABTS. Los antioxidantes neutralizan estos cationes mediante la transferencia de electrones o átomos de hidrógeno (mecanismos ET y HAT), lo que reduce la coloración del cromóforo y disminuye la absorbancia, Figura 4. El porcentaje de inhibición del catión radical ABTS por la muestra antioxidante se mide en un tiempo fijo y se expresa en equivalentes de Trolox (48).

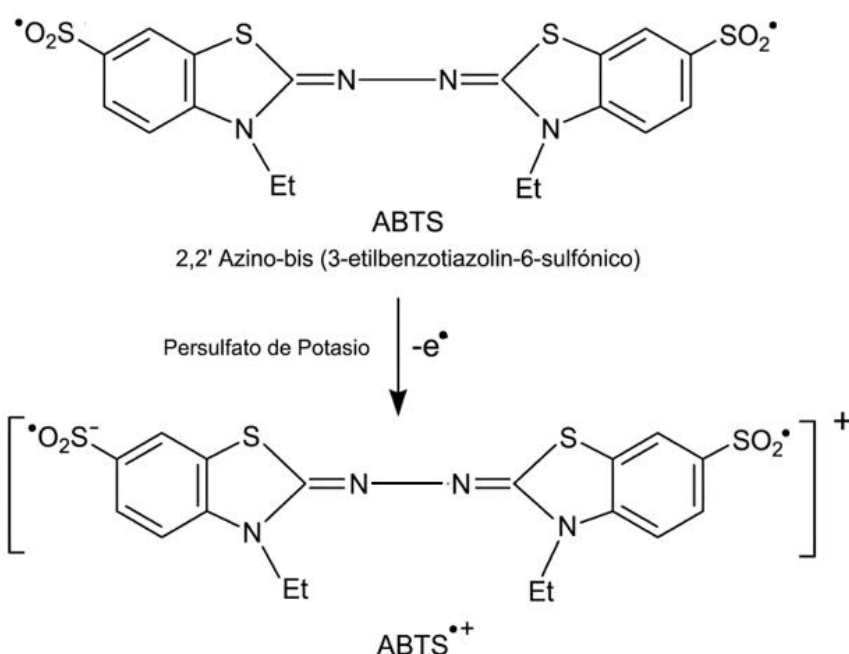


Figura 4. Formación del radical ABTS mediante el persulfato de potasio

Para la preparación de los reactivos, se elaboró un buffer PBS con un volumen final de 500 mL y un pH de 7.4. Para ello, se pesaron 217.6 mg de fosfato de sodio dibásico y 133.46 mg de fosfato de sodio monobásico, los cuales se disolvieron en agua MilliQ. Posteriormente, se preparó una solución stock de ABTS con una concentración de 10.5 mM y un volumen final de 15 mL. La cantidad necesaria de ABTS se calculó con la fórmula correspondiente de $10.5\text{mM} = X / (548.68 \times 0.01\text{L})$. Se pesaron 57.61 mg de ABTS que es representado como “X”, los cuales se disolvieron en un microtubo cubierto con papel de aluminio, y luego se ajustó el volumen a 10 mL en una fiola protegida de la luz. Para la preparación del persulfato de potasio, se calculó la cantidad necesaria para obtener una concentración de 2.45 mM y un volumen final de 50 mL, utilizando la siguiente fórmula $2.45\text{mM} = X / (270.32 \times 0.05\text{L})$. Se pesaron 33.11 mg de persulfato de potasio, los cuales se disolvieron en un microtubo, y se ajustó el volumen a 50 mL en una fiola protegida de la luz. La formación del radical ABTS se realizó mezclando 6 mL de la solución stock de ABTS (10.5 mM) con 3 mL de la solución de persulfato de potasio (2.45 mM), obteniendo un volumen final de 9 mL. La mezcla se transfirió a un frasco limpio cubierto con papel de aluminio y se dejó reaccionar en oscuridad y a temperatura ambiente durante 16 a 18 horas (preparada un día antes de su uso). La solución obtenida se utilizó durante un máximo de una semana. Para mejorar su estabilidad, se diluyó con buffer PBS 5 mM hasta completar un volumen de 15 mL. La solución madre de Trolox, utilizada para la curva de calibración, se preparó pesando 2.5 mg de Trolox, los cuales se disolvieron en 1 mL de etanol en un microtubo. Una vez disuelto, se añadió agua Mili-Q hasta completar un volumen final de 10 mL en una

fiola. La curva de calibración se realizó mediante la preparación de 10 disoluciones en microtubos, siguiendo las concentraciones establecidas en la Tabla 4 para su evaluación en el análisis correspondiente.

Tabla 4. Datos de la curva patrón de Trolox.

Trolox (μl)	Buffer PBS (μl)
0	800
25	775
50	750
75	725
100	700
125	675
150	650
200	600
250	550
300	500

Nota: Elaboración propia.

Para la carga en microplaca, se colocaron 20 μL de cada dilución de Trolox en los pocillos correspondientes, seguidos de la adición de 180 μL de la solución diluida de ABTS. Las muestras se incubaron durante 6 minutos a temperatura ambiente y protegidas de la luz, con agitación dentro del lector de microplacas. Posteriormente, se realizaron las lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 734 nm. Cada punto fue procesado por quintuplicado. Para establecer la absorbancia control (valor de referencia para el cálculo del porcentaje de inhibición), se preparó una muestra en la microplaca mezclando 20 μL de metanol con 180 μL de la solución de ABTS recién preparada.

Para la preparación de la muestra de liofilizado de *sanky* (*Corryocactus brevistylus*), se siguió el protocolo de Salazar et al. (46) y se determinaron previamente las condiciones óptimas de extracción del liofilizado con el objetivo de maximizar la recuperación de antioxidantes hidrofílicos (Figura 5). Para el procesamiento, se prepararon extractos a partir de tres concentraciones diferentes: 0.1 g, 0.2 g y 0.3 g del material liofilizado, disueltos cada uno en 1 mL de metanol al 100 %, lo que generó concentraciones iniciales de 0.1, 0.2 y 0.3 g/mL, respectivamente. Los extractos fueron protegidos de la luz directa y sometidos a ultrasonido

(40 kHz, 50 °C) durante 5 minutos. Luego, se centrifugaron a 14,500 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante fue evaporado a 40 °C por 60 minutos. Finalmente, el residuo se reconstituyó con 5 mL de agua Mili-Q. Este procedimiento se repitió tres veces. Para el ensayo ABTS, en cada pocillo de la microplaca se mezclaron 20 µL del extracto con 180 µL de la solución de stock de ABTS. Las mediciones se realizaron a 734 nm, luego de 6 minutos de reacción a una temperatura constante de 25 °C, con agitación a 400 rpm dentro del lector de microplacas, en ausencia de luz para evitar la degradación de compuestos sensibles (49). La capacidad antioxidante se determinó calculando el porcentaje de inhibición del radical ABTS, usando como referencia el valor de absorbancia control. Posteriormente, se aplicó la ecuación de la curva de calibración de Trolox para estimar los equivalentes de Trolox (µmol TE/pocillo) y se expresó finalmente como µmol TE/g de liofilizado o por mL de muestra, según corresponde.

Para las muestras líquidas, como la bebida fermentada de kombucha, se siguió lo propuesto por Santos et al. (47), realizando una dilución 1:50 con agua Mili-Q con el objetivo de situar la absorbancia dentro del rango lineal del ensayo. Luego, se tomaron 20 µL de la muestra diluida y se mezclaron con 180 µL de la solución de trabajo de ABTS, para cada muestra se realizó 5 réplicas para asegurar la precisión de los resultados. La mezcla se incubó durante 6 minutos a temperatura ambiente (25 °C) en agitación controlada (400 rpm) y en oscuridad, para evitar la degradación del radical. Finalmente, se registraron las absorbancias a 734 nm, y los datos obtenidos se utilizaron para el cálculo del porcentaje de inhibición del radical ABTS y los equivalentes de Trolox (µmol TE/mL) aplicando la ecuación de la curva de calibración. Todas las mezclas realizadas se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Preparación de muestras para el ensayo ABTS en microplaca.

Muestra	Sol. ABTS (µl)	Muestra (µl)	Metanol (µl)	Volumen total (µl)
Control ABTS (Abs. control)	180	-	20	200
Blanco de reactivos	-	-	200	200
Muestra del liofilizado	180	20	-	200
Muestra del fermentado	180	20	-	200

Nota: Elaboración propia.

2.3.8 Evaluación de polifenoles totales

Se determinó la concentración de polifenoles totales por el método de Folin Ciocalteu un método utilizado para determinar el contenido de compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en una reacción redox entre los compuestos fenólicos y el reactivo de Folin-Ciocalteu, que contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en aszbásico, esta reacción genera un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de polifenoles Figura 5 y se mide espectrofotométricamente a 765 nm.

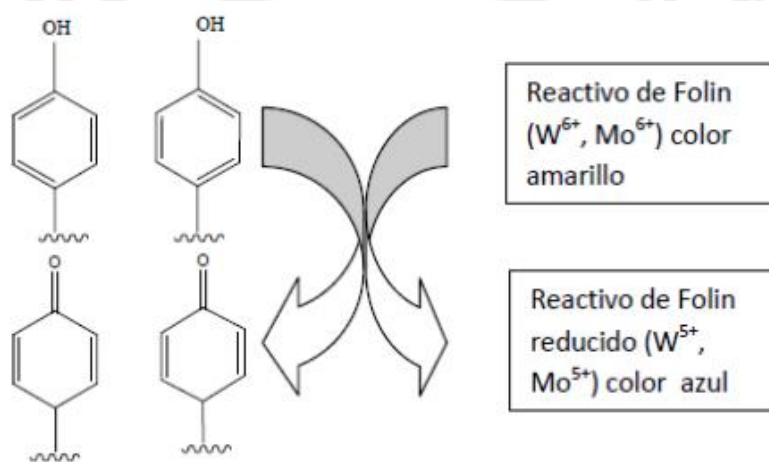


Figura 5. Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu

El ácido fosfomolibdotúngstico del reactivo, inicialmente de color amarillo, es reducido por los grupos fenólicos presentes en la muestra, lo que produce el cambio de color azul. Los resultados se cuantifican mediante una curva estándar de ácido gálico, que es el patrón recomendado. Este método, además de medir el contenido de polifenoles, está relacionado con la actividad antioxidante de las muestras, ya que los compuestos fenólicos suelen correlacionarse con la capacidad antioxidante de alimentos vegetales, como jugos de frutas.

Se elaboró la metodología descrita por Catalina Urbano (50) con modificaciones para cumplir el objetivo, se preparó la solución de carbonato de sodio monohidratado disolviendo 1 g del compuesto en 10 ml de agua destilada. Para el estándar de referencia de ácido gálico, se disolvieron 10 mg de ácido gálico en 2 ml de agua destilada, obteniendo una solución stock de 5000 ppm. A partir de esta solución, se preparó una dilución a 1000 ppm mezclando 400 µl de la solución stock con 1600 µl de agua destilada. Adicionalmente, se realizó una dilución 1:4 del reactivo de Folin-Ciocalteu 2N, mezclando 2500 µl del reactivo con agua destilada hasta completar un volumen final de 10 ml. Los equipos se mantuvieron a temperatura ambiente de

25 °C y las muestras se agitaron durante 5 minutos antes de proceder con la adición de la solución de carbonato de sodio al 10 %. La mezcla se dejó en reposo durante 2 horas para garantizar una adecuada reacción, tras lo cual se realizó la lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 765 nm (Tabla 6).

Tabla 6. Preparación de la curva de calibración para polifenoles totales.

Concentración deseada (ppm)	Volumen de solución 1000 ppm de ác. gálico (ul)	Volumen de agua destilada (ul)	Volumen final (ul)
10	10	990	1000
20	20	980	1000
50	50	950	1000
80	80	920	1000
100	100	900	1000

Nota: Elaboración propia.

Se realizó una regresión lineal utilizando la curva de calibración del estándar, lo que permite obtener la ecuación de la recta. La ecuación de la recta fue expresada como: $ABS = m[x] + b$, donde "x" representa el valor de los polifenoles totales expresado en equivalentes de ácido gálico (en mg/mL), "y" es el valor de la absorbancia, "m" es la pendiente de la recta y "b" es el intercepto con el eje y. Para calcular los equivalentes másicos en ácido gálico, se utilizó la fórmula $[x] = (y - b) / m$, donde "x" representa la cantidad de polifenoles totales equivalentes másicos en ácido gálico en mg/mL.

Para determinar el contenido de polifenoles totales de la muestra de liofilizado, se prepararon extractos en tres concentraciones diferentes, pesando 0.1 g, 0.2 g y 0.3 g del material en tubos Eppendorf y disolviéndolos en 1 mL de metanol al 100%, obteniendo así concentraciones iniciales de 0.1 g/mL, 0.2 g/mL y 0.3 g/mL, respectivamente. Los tubos fueron protegidos de la luz directa y sometidos a ultrasonido a una frecuencia de 40 kHz y una temperatura de 50 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se centrifugaron a 14,500 rpm durante 15 minutos, y el sobrenadante fue eliminado por evaporación a 40 °C durante 60 minutos. El residuo obtenido se reconstituyó con 5 mL de agua Mili-Q. Este procedimiento fue repetido tres veces, basándose en lo desarrollado por Salazar et al. (46). La cuantificación se llevó a cabo en microplacas de 96 pocillos, añadiendo 25 µL del extracto, seguido de 100 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido 1:4). La mezcla fue agitada automáticamente dentro del lector de microplacas a

temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, se incorporaron 75 μL de una solución de carbonato de sodio al 10%, y se realizó la medición de la absorbancia a 765 nm (50).

En el caso de la muestra líquida de kombucha, esta se analizó directamente sin necesidad de una extracción previa, ya que los compuestos fenólicos se encuentran disueltos en la matriz líquida. Previamente, la muestra fue diluida en una proporción 1:50 con agua Mili-Q, a fin de adecuar su concentración al rango de lectura del espectrofotómetro. El procedimiento seguido fue el descrito por (50) que consistió en añadir 25 μL de la muestra fermentada diluida, 100 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido 1:4), agitar la microplaca automáticamente a temperatura ambiente durante 5 minutos, incorporar 75 μL de una solución de carbonato de sodio al 10% y realizar la lectura de la absorbancia a 765 nm. Cada muestra fue analizada por quintuplicado para asegurar la precisión y reproducibilidad de los resultados (Tabla 7).

Tabla 7. Preparación de muestras para el ensayo de polifenoles totales.

Muestra	Muestra (μL)	Reactivo de Folin-Ciocalteu (μL)	Carbonato de Sodio (μL)	Volumen total (μL)
Blanco de Folin-Ciocalteu	-	100	75	175
Blanco de muestra	25	-	75	100
Muestra del liofilizado	25	100	75	200
Muestra del fermentado	25	100	75	200

Nota: Elaboración propia.

2.4 Ensayos

2.4.1 Preparación de la Kombucha

Para el protocolo de elaboración de Kombucha, se basó siguiendo el procedimiento descrito por Marsh (51), con ligeras modificaciones. Se lavaron los materiales de vidrio y utensilios con

Stellarsan, un desinfectante empleado para material que entra en contacto con alimentos y se esterilizaron en una autoclave a 121 °C a 15 PSI durante 15 minutos. Luego, se realizó la preparación de la Kombucha madre hirviendo 300 mL de agua. De este volumen, 150 mL se emplearon para infusionar té negro al 5% durante 10 minutos, con el objetivo de reducir el contenido de taninos. Posteriormente, las hojas de té fueron filtradas, y se disolvió un 9% de azúcar en la infusión. A continuación, se añadieron 150 mL de agua tibia a 30 °C para no afectar la simbiosis del *SCOBY*. Finalmente, se incorporó un 10% de líquido iniciador y un 2% de *SCOBY*. El recipiente se cubrió con un paño poroso estéril (gasa) y se dejó fermentar durante 15 días a temperatura ambiente. (Figura 6). La kombucha madre obtenida se utilizó como fuente del *SCOBY* comercial tanto para los ensayos fermentativos principales como para el aislamiento microbiológico posterior.

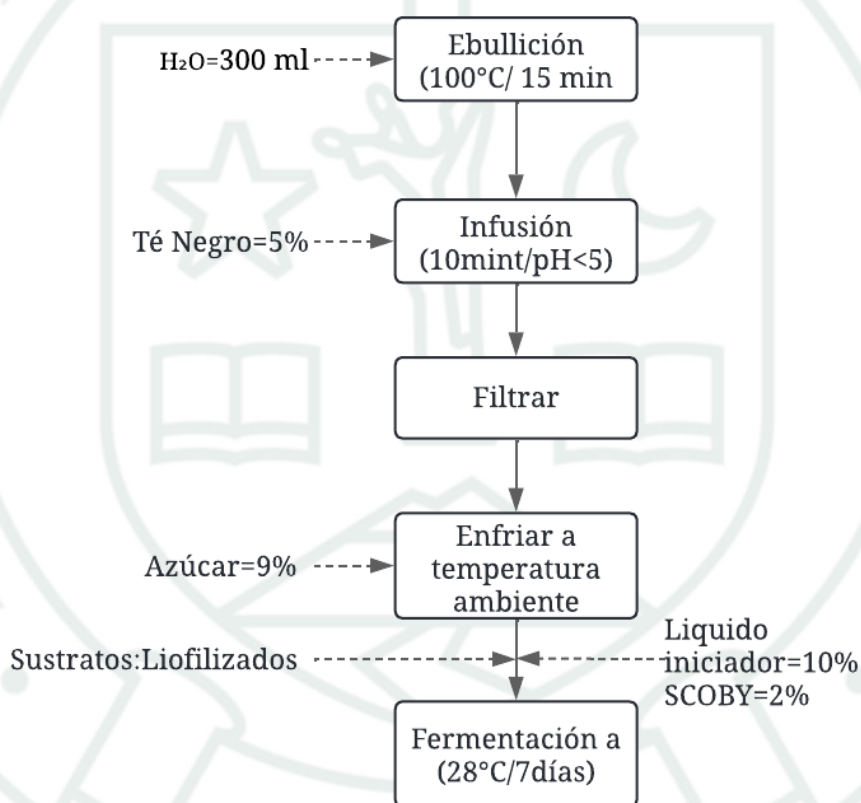


Figura 6. Diagrama de flujo de preparación de Kombucha

2.4.2 Aislamiento e identificación de microorganismos de la Kombucha

El aislamiento e identificación de levaduras y bacterias ácido-acéticas se realizó a partir del *SCOBY* comercial utilizado como inóculo principal en la fermentación de kombucha. Esta etapa tuvo como finalidad caracterizar microbiológicamente el consorcio empleado en el estudio y no sustituir el sistema experimental principal basado en *SCOBY* comercial.

2.4.2.1 Aislamiento de levaduras

Se utilizó el medio de cultivo YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) enriquecido con extracto de levadura 10g/L, peptona 20 g/L, dextrosa 20 g/L, agar- agar al 2% suplementado con cloranfenicol, con el fin de fomentar el crecimiento de las levaduras presentes en *SCOBY*. Una vez en el laboratorio se realizó el triturado de *SCOBY* con líquido iniciador y 250 uL de solución salina.

Posteriormente, el triturado se trasladó a tubos de ensayo de 2,25 mL previamente esterilizados y se realizó diluciones en serie 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} . Después se tomó 0,1 ml de los últimos tubos de ensayo para realizar el aislado con un asa de siembra de Drigalski sobre el medio de cultivo YPD previamente preparado y esterilizado (Anexo 9).

Tras la incubación, habiendo pasado 48 horas después de la siembra se realizó la cosecha de las levaduras aisladas. Posterior a esto, se realizó tres subcultivos (pasaje) de las levaduras presente en el medio YPD con sacarosa para garantizar su pureza, y así se registró sus características morfológicas de las colonias.

2.4.2.1.1 Evaluación morfológica de las levaduras

Para la evaluación morfológica de las levaduras presentes en las muestras, se utilizó el protocolo de Cramuti (52), se empleó el método de tinción con azul de metileno para la observación de las levaduras en el microscopio. Las muestras de levaduras fueron preparadas mediante la extensión de un pequeño volumen de cultivo sobre un portaobjetos limpio, seguido de la fijación con calor. Posteriormente, se aplicó la solución de azul de metileno sobre la preparación, dejando actuar el colorante durante aproximadamente 1 minuto. Las preparaciones teñidas se observaron utilizando un microscopio óptico bajo un objetivo de inmersión (100X).

2.4.2.1.2 Identificación bioquímica de levaduras

Se realizaron diferentes pruebas bioquímicas que se describen en *The Yeasts, a Taxonomic Study, Volume 1* (53), Las pruebas realizadas incluyeron diversos análisis para caracterizar las propiedades de las cepas evaluadas y sus condiciones más aptas para su crecimiento. La prueba de catalasa consistió en añadir una gota de peróxido de hidrógeno a una pequeña cantidad de la colonia de levadura. La aparición de burbujas indicó la liberación de oxígeno, confirmando así la presencia de la enzima catalasa en la cepa analizada.

Para analizar la tolerancia a la salinidad, se empleó un medio que contenía extracto de levadura (1 g/L), cloruro de sodio al 10%, y glucosa al 5%. Los medios fueron preparados en base a 100 mL de volumen final.

La hidrólisis de urea se evaluó utilizando un medio de 1000 mL, compuesto por peptona (1 g/L), dextrosa (1 g/L), cloruro de sodio (5 g/L), fosfato monopotásico (0.8 g/L), agar-agar al 2%, y rojo de fenol como indicador (0.0012 g/L).

Respecto a la tolerancia al ácido acético, se utilizó un medio para 100 mL, compuesto por glucosa (10 g/L), triptona (1 g/L), extracto de levadura (1 g/L), agar-agar (2 g/L) y ácido acético (1 mL) y su posterior proceso de autoclavado.

El crecimiento a distintas temperaturas (25 °C, 30 °C, 37 °C y 40 °C) se evaluó utilizando un medio que contenía extracto de malta (3 g/L), peptona (5 g/L) y glucosa (10 g/L).

Para la fermentación de carbohidratos, se utilizó un sistema con campanas de Durham, empleando tres tipos de azúcares (glucosa, sacarosa y maltosa) en un medio suplementado con extracto de levadura (4,5 g/L), peptona (7,5 g/L) y rojo de fenol como indicador de pH.

La tolerancia al etanol se evaluó en un medio compuesto por extracto de malta (3 g/L), peptona (5 g/L) y glucosa (10 g/L), al que se añadieron tres concentraciones diferentes de etanol (1%, 2.5% y 5%).

Finalmente, el crecimiento a diferentes valores de pH (4, 5, 6 y 7) se analizó en un medio que contenía tripteína (5 g/L), peptona de carne (5 g/L) y glucosa (20 g/L). El pH fue ajustado utilizando ácido clorhídrico 0,1N y solución de hidróxido de sodio 0,1N.

2.4.2.1.3 Identificación molecular de levaduras

Para la extracción de ADN se basó en el protocolo propuesto por Montes (54), utilizando el método de shock térmico. El procedimiento consistió en cultivar las cepas seleccionadas durante 24 horas en caldo YPD a 37 °C con agitación a 130 rpm. Posteriormente, se recuperó el pellet celular mediante centrifugación a baja velocidad durante 10 minutos y se lavó con 200 µL de agua Mili-Q autoclavada. Luego, se agregaron 200 µL de agua Mili-Q autoclavada y se llevó el pellet a un termobloque a 100 °C durante 45 minutos.

A continuación, se enfrió rápidamente en baño de hielo durante 10 minutos, facilitando la ruptura de la membrana celular por choque térmico. Posteriormente, se añadieron 2 µL de Tris 1 M (pH 8) y 2 µL de EDTA 1 mmol (pH 8), seguido de sonicación durante 5 minutos. Luego,

se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos y se transfirió el sobrenadante (ADN) a un microtubo nuevo.

La pureza del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, siguiendo el protocolo de Montes (54), utilizando tampón TAE 1X y Midori Green Advance DNA Stain. Se empleó Quick-Load® 1 kb DNA Ladder como marcador de peso molecular. Las muestras se corrieron a 100 V durante 40 minutos en un sistema de electroforesis horizontal. Se sembraron 10 µL de ADN mezclados con 4 µL de buffer de carga. Las bandas fueron visualizadas mediante transiluminado (Anexo 12). Para la amplificación de las regiones ITS del ADN ribosomal se siguió el protocolo propuesto por Marsh (51). La reacción de PCR se realizó en un volumen de 25 µL, conteniendo 200 µM de dNTPs, 1 µM de cada cebador, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 2 mM de MgCl₂, 2 U de Taq polimerasa (Thermo Scientific) y 50 ng de ADN (Rodas, Ferrer, & Pardo, 2003). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Los cebadores utilizados fueron ITS1 e ITS4, cuyas secuencias fueron reportadas por Vegas (55) y se representan en la Tabla 8. Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante comparación con la base de datos GenBank utilizando el software BLAST para su identificación taxonómica.

La identificación molecular de las levaduras se realizó mediante la amplificación de la región ITS del ADN ribosomal utilizando los cebadores ITS 1 e ITS 4, seguida de la comparación de las secuencias obtenidas con la base de datos GenBank mediante el programa BLAST

Tabla 8. Cebadores utilizados para la identificación de levaduras.

Cebadores
ITS'1 y ITS'4
ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')
ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

2.4.2.2 Aislamiento de bacterias ácido - acéticas

Para el aislamiento de bacterias ácido-acéticas, se utilizó el medio MYP compuesto por manitol (20 g/L), extracto de levadura (10 g/L), glucosa (10 g/L), sulfato de magnesio (0.1 g/L), agar-agar al 2%, y se suplementó con etanol al 2,5% y ácido acético al 0,5% (56). En el laboratorio, se añadió una porción del *SCOBY* al medio y se dejó incubar durante 7 días a una temperatura de 30 °C. Tras observar el crecimiento de celulosa en el medio. Se procedió a realizar diluciones

utilizando el sobrenadante del medio, estas diluciones se transfirieron a tubos de ensayo estériles de 2,25 mL, y se efectuaron diluciones en serie de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , Anexo 10. Con el objetivo de obtener cepas puras de las bacterias presentes en el *SCOBY* se realizó, tres subcultivos (pasaje).

2.4.2.2.1 Evaluación morfológica de las bacterias ácido-acéticas

La evaluación morfológica de las bacterias ácido-acéticas se realizó mediante tinción de Gram, un método que permite distinguir entre bacterias Grampositivas y Gramnegativas, basado en las diferencias en la pared celular. Para ello, se tomó una pequeña cantidad de la colonia bacteriana aislada y se preparó una extensión sobre un portaobjetos limpio. La muestra fue fijada con calor y luego se sometió a la tinción de Gram siguiendo un protocolo estándar. El procedimiento de tinción consistió en aplicar el cristal violeta sobre la preparación durante un minuto, seguido de la adición de yodo, que actúa como mordiente, durante otro minuto. Posteriormente, se decoloró la muestra con alcohol o acetona durante 20 segundos. Para finalizar, se añadió safranina durante un minuto, lo que permitió teñir las bacterias Gram negativas, mientras que las Gram positivas retuvieron el cristal violeta (57). Las preparaciones teñidas fueron observadas bajo un microscopio óptico utilizando un objetivo de inmersión (100X).

2.4.2.2.2 Identificación bioquímica de bacterias ácido-acéticas

Para la identificación bioquímica, se utilizó el medio GYC compuesto por glucosa al 2%, extracto de levadura al 1%, carbonato de calcio al 0,3% y agar-agar al 2%, suplementado con etanol al 5%. Este medio permitió evaluar la capacidad de las bacterias para producir un halo alrededor de las colonias. Además, se realizó una prueba de oxidación con acetato, utilizando un medio que contenía extracto de levadura al 0,3%, peptona al 0,2%, acetato de sodio al 0,2% y un indicador basándonos en lo propuesto por Salazar (58), ya sea púrpura de bromocresol o rojo de fenol, al 0,002%. Este ensayo se llevó a cabo a un pH de 6,8 durante 15 días a 30 °C.

2.4.2.2.3 Identificación molecular de bacterias ácido-acéticas

Para la extracción de ADN se utilizó un cultivo con 24 horas de crecimiento en el medio MYP previamente descrito. Se empleó el kit Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit siguiendo las instrucciones del fabricante (59). Inicialmente, se recolectaron entre 50 y 100 mg de biomasa o hasta 200 µL de muestra líquida, los cuales se colocaron en un tubo de extracción. Se agregó

Buffer Bashing a la muestra para facilitar la lisis celular, proceso que se llevó a cabo mediante agitación intensa con un vortex.

Posteriormente, se centrifugó la muestra a alta velocidad para separar los residuos celulares, transfiriéndose el sobrenadante a un tubo limpio. Se añadió el buffer de unión al ADN para precipitar las proteínas y otras impurezas, seguido de una nueva centrifugación (59). El sobrenadante clarificado se cargó en una columna de extracción diseñada para retener específicamente el ADN, eliminando contaminantes mediante lavados sucesivos con los buffers de limpieza proporcionados por el kit. Finalmente, el ADN purificado fue eluido con el buffer de elución y almacenado a -20 °C. Luego de la obtención del ADN genómico, se evaluó su pureza mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, siguiendo el procedimiento descrito por Montes (54). Para ello, se utilizó tampón TAE 1X y Midori Green Advance DNA Stain como agente revelador. Las muestras se sembraron mezclando 10 µL del sobrenadante con 4 µL de buffer de carga, y fueron corridas a 100 V durante 40 minutos en un sistema de electroforesis horizontal. Se utilizó el marcador Quick-Load® 1 kb DNA Ladder como referencia de peso molecular. La visualización de las bandas se realizó mediante un transiluminador UV.

Posteriormente, se llevó a cabo la amplificación del gen ribosomal 16S mediante PCR, en un volumen final de 25 µL que contenía 200 µM de dNTPs, 1 µM de cada cebador, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 2 mM de MgCl₂, 2 U de Taq polimerasa (Thermo Scientific) y 50 ng de ADN genómico, de acuerdo con el protocolo descrito por Rodas et al. (60). La reacción se ejecutó en un termociclador Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Se emplearon los cebadores universales descritos en la Tabla 9 utilizados para la identificación molecular de bacterias, reportados por Edwards et al. (61). El programa de amplificación comprendió una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, hibridación a 56 °C durante 30 segundos y una extensión a 72 °C por 1 minuto. Finalmente, se realizó una extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

La identificación molecular de las bacterias ácido-acéticas se llevó a cabo mediante la amplificación del gen 16S rRNA utilizando cebadores universales, y las secuencias obtenidas fueron compradas con la base de datos GenBank mediante Blast para su identificación taxonómica.

Tabla 9. Cebadores utilizados para la identificación de bacterias ácido-acéticas.

Cebadores
PA y PH
PH (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA- 3')
PA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG- 3')

2.4.2.3 Aislamiento de bacterias lácticas

Para aislar bacterias lácticas, se empleó el medio MRS (*Man, Rogosa y Sharpe*) enriquecido con peptona 10 g/L, extracto de carne 80 g/L, extracto de levadura 4 g/L, glucosa 20 g/L, fosfato de potasio dibásico 2g/L, acetato de sodio 3,015 g/L, trimonio citrato 1,859 g/L, sulfato de magnesio 0.2 g/L, sulfato de manganeso 0.027 g/L, tween 80 1 ul/L, agar-agar al 2% y para inhibir el crecimiento de levaduras u otros microorganismos no deseados se suplemento con cicloheximida 60 ul/L (62).

2.4.2.4 Preparación y preservación de Cepas en Crioviales

Para la preservación, se prepararon crioviales para cada tipo de microorganismo. En levaduras, se utilizó el sobrenadante del caldo YPD, mientras que para las bacterias acéticas se empleó el caldo del medio MYP. Los crioviales se almacenaron a -80°C.

2.4.3 Fermentación de Kombucha suplementado con liofilizado de Sanky

En esta etapa se evaluaron distintas concentraciones de liofilizado de sanky en kombucha: 2,5 %, 5 % y 10 %. Para ello, se siguió el protocolo de fermentación previamente descrito, con la diferencia de que, antes de incorporar el SCOBY comercial y el líquido iniciador, se añadió el liofilizado correspondiente a cada tratamiento. Este procedimiento constituyó el sistema experimental principal del estudio, en el cual la fermentación se realizó empleando el SCOBY comercial en su estado original y su respectivo líquido iniciador.

Los tratamientos se organizaron de la siguiente manera:

K0: Kombucha (Blanco)

K1: Kombucha + Sanky 2.5%

K2: Komucha + Sanky 5%

K3: Kombucha + Sanky 10%

Para la recolección de muestras, se extrajeron 5 mL de cada frasco en cabina estéril y se transfirieron a tubos Falcon. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm y 10 °C, empleándose únicamente el sobrenadante para los análisis posteriores.

Los ensayos de fermentación se realizaron por duplicado independiente para cada tratamiento, desde 0 hasta 168 horas. Las evaluaciones incluyeron la determinación de azúcares reductores, pH, acidez titulable, sólidos solubles, actividad antioxidante por DPPH, actividad antioxidante por ABTS-TEAC y contenido de polifenoles totales. Los resultados fisicoquímicos, antioxidantes y de polifenoles presentados en esta investigación corresponden a esta fermentación realizada con SCOBY comercial suplementado con sanky.

Preparación de Bebida - producción de medio de fermentación

De manera complementaria al sistema experimental principal, se realizó un ensayo exploratorio utilizando cepas aisladas e identificadas a partir del SCOBY comercial, con la finalidad de describir su comportamiento en un medio de fermentación estandarizado. Este ensayo no formó parte del análisis comparativo principal entre concentraciones de sanky, sino que tuvo un carácter descriptivo.

Se preparó un medio de fermentación de 200 mL, compuesto por té negro (*Camellia sinensis*) al 5 %, sanky (*Corryocactus brevistylus*) liofilizado al 10 % y azúcar al 9 %, disueltos en agua. La mezcla se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Posteriormente, se reactivaron 2 cepas de levaduras y 2 cepas de bacterias ácido-acéticas previamente aisladas e identificadas, a partir de crioviales, empleando sus medios respectivos: YPD para levaduras y GYC para bacterias ácido-acéticas. Ya reactivadas, los cultivos se centrifugaron y se transfirieron a volúmenes de 20 mL en matraces de 100 mL (63).

A partir del medio de fermentación esterilizado, se realizó la inoculación en condiciones estériles dentro de una cámara de flujo laminar, de los microorganismos aislados tales como 2 cepas de levaduras y 2 cepas de bacterias ácido acéticas en una proporción de 1:1, los cuales serán equivalentes al 10 % (V/V) de inóculo. La fermentación se llevó a cabo durante 7 días a 28 °C, evitando la luz solar directa (63). Al inicio y al finalizar la fermentación se medirá el crecimiento de los microorganismos por siembra en superficie en placas en los medios YPD y medio GYC. Asimismo, se medirán el pH, azúcares reductores, grados brix, acidez titulable, y las pruebas de actividad antioxidante. Los datos obtenidos en esta etapa fueron considerados

como información complementaria para describir el comportamiento de las cepas aisladas y no como parte del análisis comparativo principal entre concentraciones de sanky.

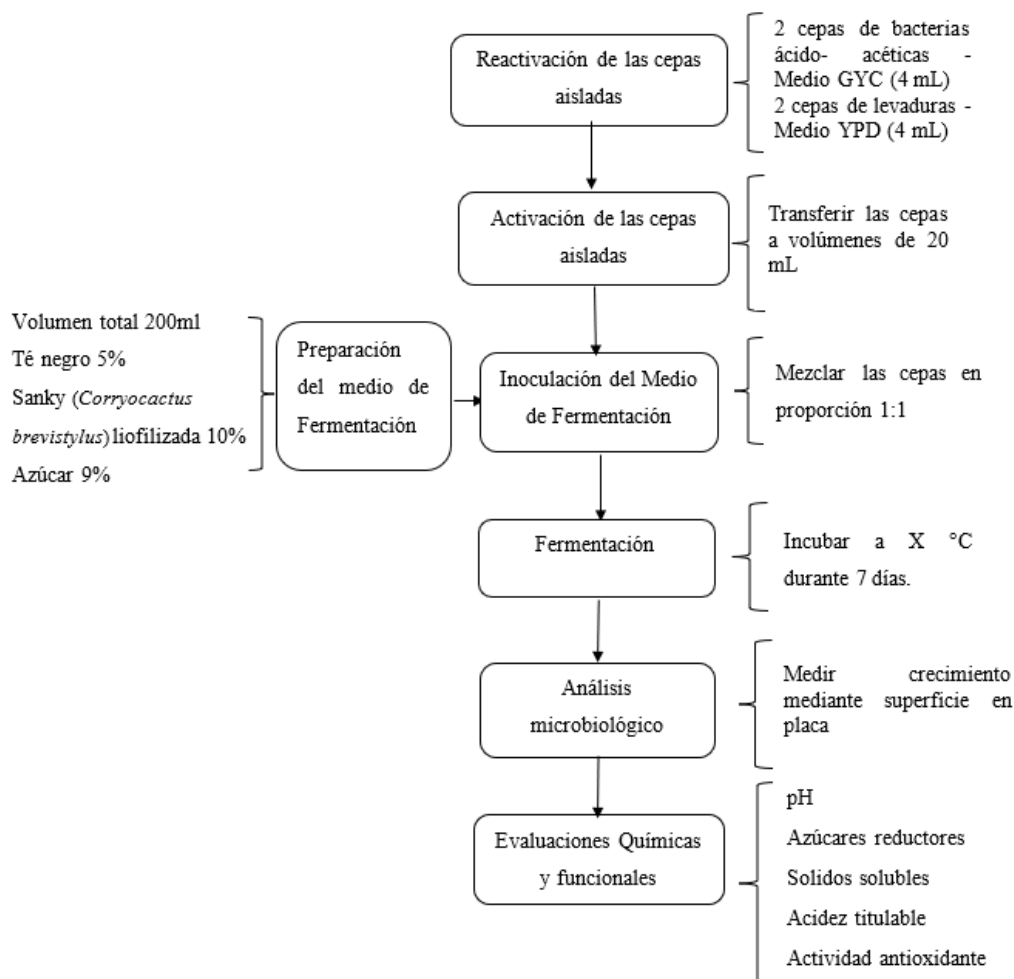


Figura 7. Esquema de preparación de bebida

2.4.4 Análisis de los resultados y elaboración de cuadros

Los ensayos de fermentación se realizaron por duplicado independiente para cada tratamiento (K0, K1, K2 y K3), considerándose como repeticiones experimentales. Asimismo, cada análisis fisicoquímico y de actividad antioxidante (ABTS, DPPH y compuestos fenólicos totales) se realizó en cinco repeticiones analíticas.

Los resultados de los ensayos se expresaron como media $\pm$ desviación estándar. Para el análisis estadístico se utilizó el software SPSS, aplicando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para evaluar diferencias significativas entre los tratamientos con diferentes concentraciones de sanky y tiempos de fermentación. Cuando se detectaron diferencias significativas, se empleó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$.

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Aislamiento de microorganismos

Se aisló 6 cepas de levaduras y 4 cepas de bacterias ácido acéticas siguiendo la metodología descrita previamente. Durante los aislamientos se empleó antibióticos tales como cloranfenicol y cicloheximida para evitar crecimiento de contaminantes.

3.1.1 Aislamiento de levaduras

A partir de kombucha comercial se obtuvieron 6 aislados en medio YPD en base al protocolo mostrado en la Figura 8, no hubo crecimiento bacteriano debido al uso de cloranfenicol. En las placas, se observaron crecimiento de colonias circulares de color crema como se aprecia en la Figura 9.

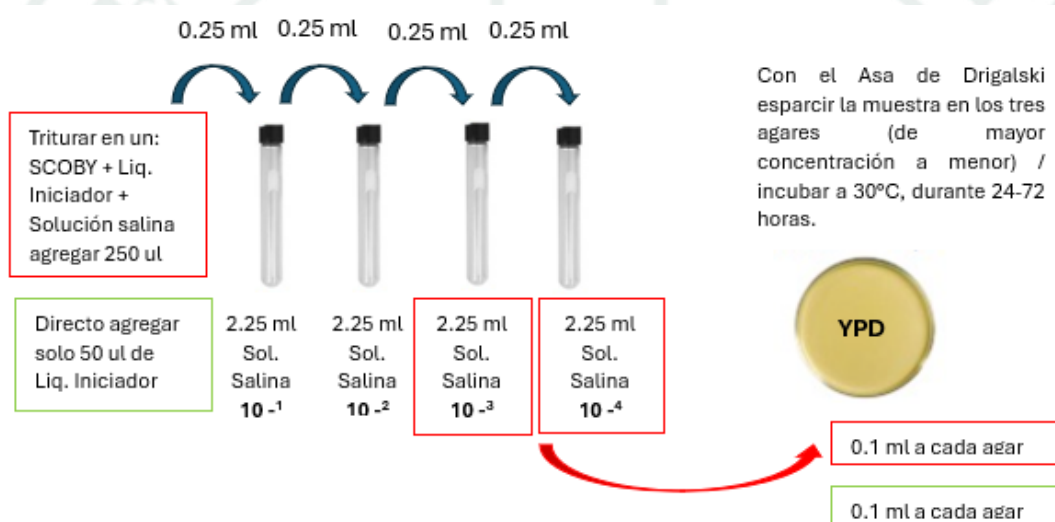


Figura 8. Protocolo para el aislamiento de levaduras



Figura 9. Crecimiento de colonias en medio YPD

Con respecto a las características microscópicas, en los 6 aislados se observaron con tinción azul de metileno, en su totalidad presentaron formas ovaladas y alargadas, como se demuestra en la Figura 9. Algunos estudios demuestran que, las morfologías más frecuentes son las formas

ovoides, esféricas y elipsoidales (64,65), alineándose con los resultados de nuestro estudio. En la Tabla 10 se presenta los resultados de las características morfológicas y microscópicas de las levaduras aisladas.

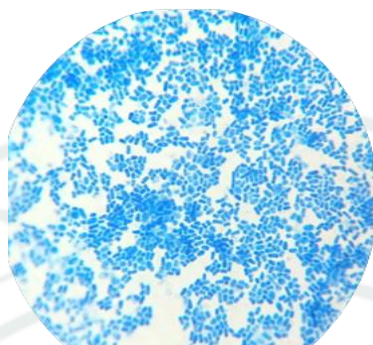


Figura 10. Morfología microscópica de levaduras (100X)

Tabla 10. Caracterización morfológica de levaduras aisladas de kombucha comercial

Aislados	Medio de cultivo	Pruebas	
		Morfología	Características macroscópicas
<i>NI16-44</i>	YPD	Levaduras ovoides alargadas	La colonia presenta una forma circular con borde entero, elevación convexa baja, superficie lisa, consistencia cremosa y un color crema.
<i>NI16-32</i>		Levaduras ovoides	
<i>NI16-31</i>		Levaduras ovoides	
<i>NI135-4</i>		Levaduras ovoides	
<i>NI13-53</i>		Levaduras ovoides pequeñas	
<i>NI13-41</i>		Levaduras ovoides	

Nota: Elaboración propia.

3.1.2 Aislamiento de bacterias ácido-acéticas

A partir de una kombucha comercial se obtuvieron 4 aislados en medio MYP utilizando el protocolo descrito en la Figura 11, no hubo crecimiento de hongos debido al uso de cicloheximida. En las placas, se observaron colonias circulares de color beige (Figura 12).

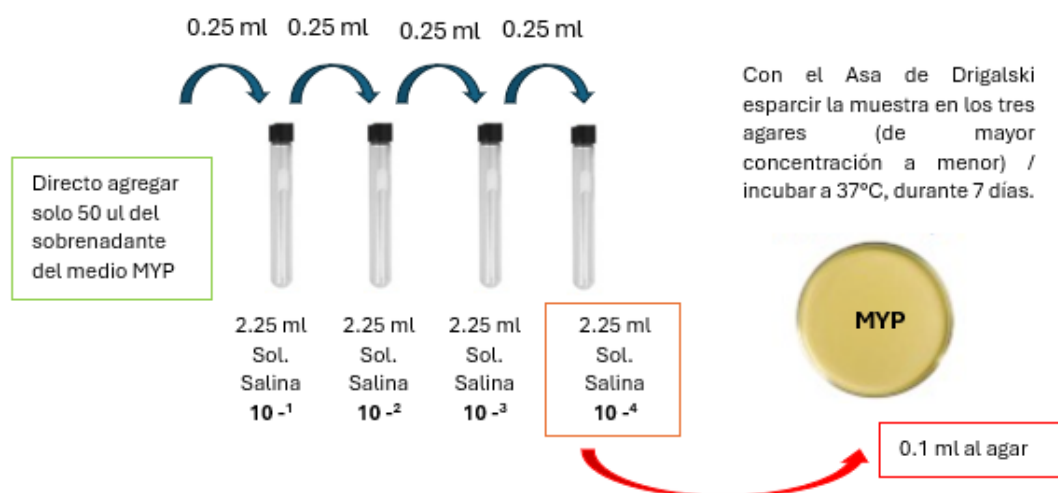


Figura 11. Protocolo para el aislamiento de bacterias ácido-acéticas

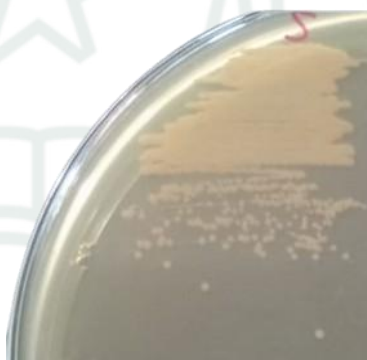


Figura 12. Crecimiento de colonias en medio MYP

Con respecto a las características microscópicas, se observaron bacilos individuales y en cadena, tinción Gram (-) (Figura 13). Este hallazgo es congruente por lo reportado en la literatura, donde se describe que son bacilos Gram negativos de forma elíptica a cilíndrica, con un metabolismo aerobio obligado (66). En la Tabla 11 se presentan los resultados de las características morfológicas y microscópicas de las 4 bacterias aisladas.

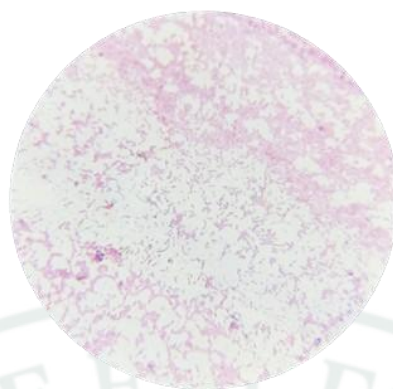


Figura 13. Tinción Gram de bacterias ácido-acéticas (100X)

Tabla 11. Características de bacterias ácido-acéticas aisladas de kombucha comercial

Aislados	Medio de cultivo	Morfología	Pruebas
			Características macroscópicas
<i>NIH12-31</i>	MYP	Bacterias en forma de bacilos, en pares o en cadenas.	La colonia presenta una forma circular con borde entero, elevación convexa baja, superficie lisa, consistencia húmeda y un color beige.
<i>NIH12-32</i>	MYP	Bacterias en forma de bacilos, en pares o en cadenas.	
<i>NIH12-43</i>	MYP	Bacterias en forma de bacilos, en pares o en cadenas.	
<i>NIH12-44</i>	MYP	Bacterias en forma de bacilos, en pares o en cadenas.	

Nota: Elaboración propia.

3.1.3 Identificación bioquímica

3.1.4 Identificación bioquímica de levaduras

De las 6 levaduras aisladas se realizaron diferentes pruebas bioquímicas para comprobar sus capacidades de adaptación y cualidades presentes en las levaduras aisladas.

3.1.4.1 Prueba de catalasa

Se observa una totalidad de resultados positivos que indica que estas levaduras aisladas producen la enzima catalasa como se observa en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Prueba de catalasa

Nº Cepa	Aislados	Catalasa
1	<i>NIII6-44</i>	+
2	<i>NIII6-32</i>	+
3	<i>NIII6-31</i>	+
4	<i>NIII35-4</i>	+
5	<i>NIII3-53</i>	+
6	<i>NIII3-41</i>	+

Nota: Elaboración propia.

3.1.4.2 Tolerancia de salinidad

Se observa resultados negativos que indican inhibición del crecimiento debido a altas concentraciones de sal (10% NaCl) y glucosa (5%). **Tabla 13**.

Tabla 13. Tolerancia de salinidad

Nº Cepa	Aislados	10% NaCl / 5% Glucosa
1	<i>NIII6-44</i>	-
2	<i>NIII6-32</i>	-
3	<i>NIII6-31</i>	-
4	<i>NIII35-4</i>	-
5	<i>NIII3-53</i>	-
6	<i>NIII3-41</i>	-

Nota: Elaboración propia.

3.1.4.3 Hidrólisis de urea

Se observa una totalidad de resultados que ninguna de estas cepas de levadura produce la enzima ureasa, la cual es responsable de descomponer la urea en amoníaco y dióxido de carbono, Figura 14. Por lo tanto, estas cepas no tienen la capacidad de hidrolizar la urea bajo las condiciones de prueba utilizadas (Tabla 14).

Tabla 14. Hidrólisis de urea

Nº Cepa	Aislados	Urea
1	<i>NII16-44</i>	-
2	<i>NII16-32</i>	-
3	<i>NII16-31</i>	-
4	<i>NII135-4</i>	-
5	<i>NII13-53</i>	-
6	<i>NII13-41</i>	-

Nota: Elaboración propia.

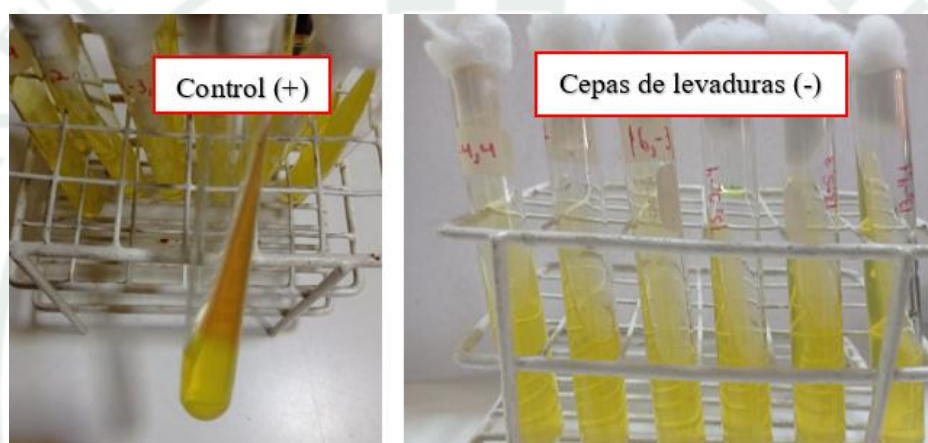


Figura 14. Resultados de hidrólisis de urea.

3.1.4.4 Tolerancia al ácido acético

Estos resultados indican que solo dos cepas tienen la capacidad de sobrevivir y posiblemente prosperar en ambientes con alta concentración de ácido acético (37%), lo que sugiere una posible adaptación a condiciones ácidas semejantes a las presentes durante la fermentación, como se observa en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Tolerancia al ácido acético.

Nº Cepa	Aislados	A las 24h a 37%
		Ácido acético
1	<i>NII16-44</i>	+
2	<i>NII16-32</i>	-
3	<i>NII16-31</i>	-

4	<i>NII135-4</i>	-
5	<i>NII13-53</i>	+
6	<i>NII13-41</i>	-

Nota: Elaboración propia.

Las cepas tolerantes (NII16-44 y NII13-53) corresponden a *Starmerella bacillaris* y *Brettanomyces bruxellensis* respectivamente (Tablas 22 y 23). Guzmán (67), reportó que solo el 30% de levaduras aisladas de kombucha toleran ácido acético al 37%, coincidiendo con el 33.3% (2 de 6 cepas) encontrado en este estudio. Así mismo, se añade que, las bacterias altamente tolerantes modifican la composición lipídica de su membrana celular en respuesta al ácido, aumentando la proporción de ácidos grasos insaturados, como el ácido cis-vaccénico, garantizando la fluidez e integridad de la membrana (68).

3.1.4.5 Temperatura

Las cepas aisladas presentan una afinidad por temperaturas intermedias entre 30 °C y 37 °C y su crecimiento es restringido a temperaturas más bajas o altas (25 °C y 40 °C). Curiosamente, dos aislamientos no lograron un crecimiento a 37 °C como lo muestra la Tabla 16. (Anexo 11).

Tabla 16. Crecimiento a diferentes temperaturas.

Nº Cepa	Aislados	Crecimiento 25 °C	Crecimiento 30 °C	Crecimiento 37 °C	Crecimiento 40 °C
1	<i>NII16-44</i>	-	+	+	-
2	<i>NII16-32</i>	-	+	-	-
3	<i>NII16-31</i>	-	+	+	-
4	<i>NII135-4</i>	-	+	+	-
5	<i>NII13-53</i>	-	+	+	-
6	<i>NII13-41</i>	-	+	-	-

Nota: Elaboración propia.

3.1.4.6 Fermentación de carbohidratos

Estos resultados indican que todas las cepas fueron capaces de fermentar los tres azúcares evaluados (glucosa, sacarosa y maltosa), evidenciado por el cambio de color del medio. Además, la presencia de burbujas en la campana de Durham confirma la producción de gas en

algunas de ellas como se muestra en la Figura 15, lo que sugiere actividad fermentativa y capacidad de metabolizar estos sustratos bajo las condiciones evaluadas (Tabla 17).

Tabla 17. Fermentación en carbohidratos y producción de gas.

Nº Cepa	Aislados	Glucosa	Sacarosa	Maltosa
1	<i>NI116-44</i>	+ (gas presente)	+ (gas presente)	+ (gas presente)
2	<i>NI116-32</i>	+ (gas presente)	+ (gas presente)	+ (gas presente)
3	<i>NI116-31</i>	+ (gas presente)	+ (gas presente)	+ (gas presente)
4	<i>NI1135-4</i>	+ (gas presente)	+ (gas presente)	+ (gas presente)
5	<i>NI113-53</i>	+ (gas presente)	+ (gas presente)	+ (gas presente)
6	<i>NI113-41</i>	+ (gas presente)	+ (gas presente)	+ (gas presente)

Nota: Elaboración propia.

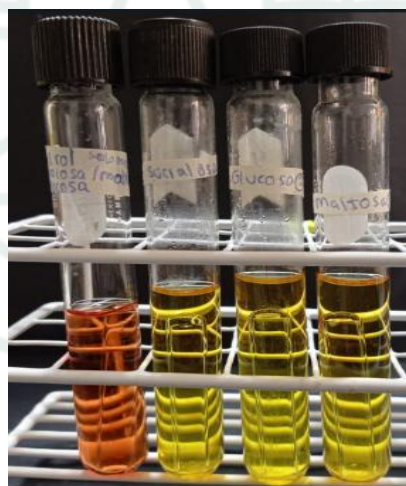


Figura 15. Evidencia de fermentación y producción de gas

3.1.4.7 Tolerancia de etanol

Estos resultados indican que la mayoría de las cepas pueden tolerar bajas concentraciones de etanol (1% y 2.5%), pero su crecimiento se ve comprometido en concentraciones más altas (5%). En la Tabla 18, se demuestra que las cepas 4 y 6 destacan por su capacidad para tolerar incluso el 5% de etanol, lo que podría estar relacionado con su adaptación a ambientes fermentativos (Anexo 11).

Tabla 18. Tolerancia de etanol a diferentes cantidades.

Nº Cepa	Aislados	Etanol 1%	Etanol 2.5%	Etanol 5%
1	<i>NIII6-44</i>	+	+(débil)	+
2	<i>NIII6-32</i>	+	+(débil)	+(débil)
3	<i>NIII6-31</i>	+	+(débil)	+
4	<i>NIII35-4</i>	+	+(débil)	+
5	<i>NIII3-53</i>	+	+(débil)	
6	<i>NIII3-41</i>	+(turbidez)	+(débil)	+(débil)

Nota: Elaboración propia.

3.1.5 pH

Los resultados demostrados en la Tabla 19 muestra que la mayoría de las cepas tienen una buena tolerancia a diferentes niveles de pH, con algunas variaciones específicas entre ellas. La cepa 2 y las cepas 4 y 5 parecen ser las más robustas, mostrando crecimiento en todos los niveles de pH probados. Por otro lado, la cepa 6 es menos tolerante, especialmente a pH 7, donde no muestra crecimiento (Anexo 11).

Tabla 19. Crecimiento a diferentes pH.

Nº Cepa	Aislados	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
1	<i>NIII6-44</i>	+	+	+	+

2	<i>NIII6-32</i>	+	+	+	+
3	<i>NIII6-31</i>	(débil)	(débil)	(débil)	(débil)
4	<i>NIII35-4</i>	+	+	+	+
5	<i>NIII3-53</i>	+	+	+	+
6	<i>NIII3-41</i>	+	+	+	-
		(débil)	(débil)	(débil)	

Nota: Elaboración propia.



Figura 16. Pruebas bioquímicas para levaduras

3.1.6 Identificación bioquímica de bacterias ácido-acéticas

De las 4 bacterias aisladas se realizaron diferentes pruebas bioquímicas para observar sus cualidades presentes.

3.1.6.1 Capacidad oxidativa sobre el etanol

La presencia de halos en el medio indica que la bacteria posee actividad acética y es capaz de oxidar el etanol, como se evidencia en la Figura 17. En la Tabla 20 se puede evidenciar que la cepa número 2, 3 y 4 mostraron un resultado positivo, sin embargo, solo las cepas 3 y 4 fueron seleccionadas para la siguiente prueba.

Tabla 20. Capacidad oxidativa sobre el etanol.

Nº Cepa	Aislados	Capacidad oxidativa
1	<i>NIII2-31</i>	-
2	<i>NIII2-32</i>	+
3	<i>NIII2-43</i>	+
4	<i>NIII2-44</i>	+

Nota: Elaboración propia.

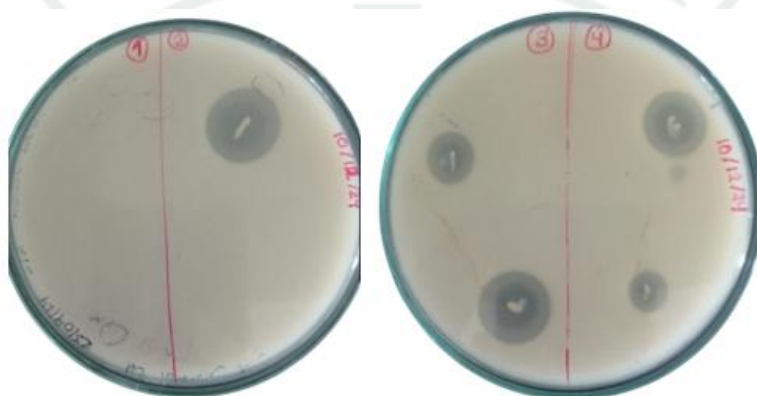


Figura 17. Formación de halos.

3.1.6.2 Oxidación de acetato

La capacidad de oxidar el acetato presente se confirmó a través del cambio de color observado en las dos cepas evaluadas, demostrando como se muestra en la Figura 18 y la Tabla 21.

Tabla 21. Oxidación de acetato

Nº Cepa	Aislados	Control	Rojo de fenol	Azul de Bromocresol
1	<i>NIII2-43</i>	-	+	+
2	<i>NIII2-44</i>	-	+	+

Nota: Elaboración propia.

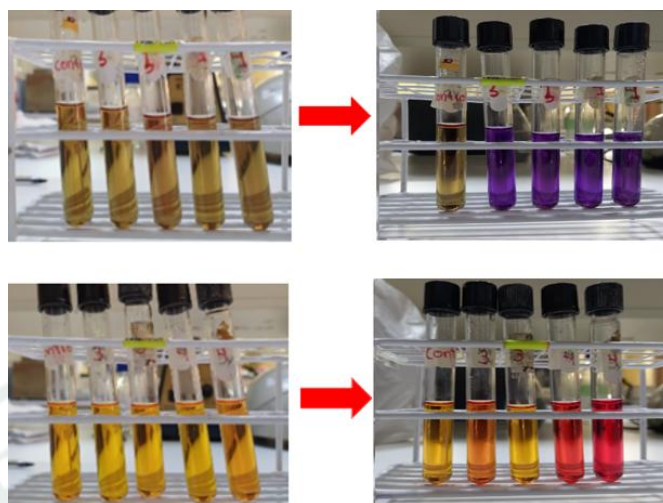


Figura 18. Viraje con los distintos indicadores

3.1.6.3 Formación de celulosa

La producción de celulosa se observó en el medio de cultivo estándar, lo que sugiere la capacidad de la bacteria para sintetizar este biopolímero. Este resultado es compatible con la presencia de bacterias ácido-acéticas con potencial celulogénico, como se muestra en la Figura 19.

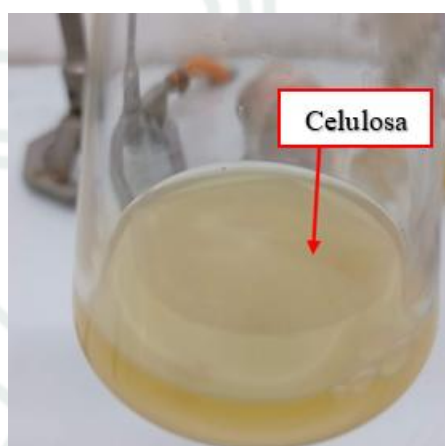


Figura 19. Formación de celulosa.

3.1.7 Identificación molecular

A partir del aislamiento inicial, se obtuvieron 10 cepas correspondientes a levaduras y bacterias ácido-acéticas (Figura 20). Sin embargo, para la identificación molecular se seleccionaron cuatro cepas representativas, correspondientes a dos levaduras y dos bacterias ácido-acéticas. El análisis de las secuencias parciales obtenidas mostró mayor similitud con dos géneros de levaduras, *Starmerella* y *Brettanomyces*. En la Tabla 22 se presentan porcentajes de similitud

superiores al 95%, obtenidos mediante comparación bioinformática con el algoritmo BLASTn, lo que permitió establecer una asignación taxonómica referencial para las levaduras aisladas de kombucha comercial (Anexo 13 y Anexo 14).



Figura 20. Análisis molecular para levaduras

Tabla 22. Similitud de secuencias de levaduras aisladas en kombucha comercial

Aislado	Taxón significativo	Proximidad relativa al taxón indicado (%ID)
NI16-44	<i>Starmerella bacillaris</i>	96.98%
NI 13-53	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	96.79%

Nota: Elaboración propia.

De igual forma, las secuencias parciales de dos bacterias ácido-acéticas mostraron mayor similitud con especies del género *Komagataeibacter*, cuyos porcentajes de similitud se presentan en la Tabla 23, a partir de las secuencias obtenidas (Anexo 15 y Anexo 16).

Tabla 23. Similitud de secuencias de bacterias ácido-acéticas de kombucha comercial

Aislado	Taxón significativo	Proximidad relativa al taxón indicado (%ID)
NI112-43	<i>Komagataeibacter oboediens</i>	98.31%
NI112-44	<i>Komagataeibacter xylinus</i>	96.85%

Nota: Elaboración propia.

Al inicio del estudio se realizó el aislamiento y caracterización de levaduras y bacterias ácido-acéticas provenientes de una kombucha comercial. Se observó que las cepas aisladas presentaron tolerancia a condiciones de estrés, como ácido acético (37%), etanol (hasta 5%) y pH ácido, lo que indica que poseen características compatibles con microorganismos que suelen desarrollarse en sistemas fermentativos de kombucha.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Guzmán (67), quien señala que el aislamiento de cepas específicas permite estandarizar bebidas fermentadas con potencial antioxidante. Asimismo, la similitud observada con *Brettanomyces bruxellensis* coincide con reportes previos que describen la presencia de este género en fermentaciones (69).

De igual manera, la similitud observada con *Starmerella bacillaris* es consistente con lo reportado por Tu (70), quien indica su participación en la producción de ácidos orgánicos y mejora del perfil sensorial en fermentaciones.

Cabe precisar que la identificación de las cepas tuvo un enfoque descriptivo del consorcio microbiano presente en la kombucha analizada. Estas no fueron empleadas de manera individual ni se realizó la reconstitución del consorcio para los ensayos de fermentación, los cuales se llevaron a cabo utilizando el SCOBY comercial en su estado original, con el fin de preservar la dinámica microbiana propia del sistema fermentativo. Por tanto, los resultados de identificación molecular permiten describir microorganismos compatibles con el consorcio presente en la kombucha comercial evaluada.

En conjunto, la tolerancia a pH ácido, ácido acético y etanol, la capacidad de fermentar carbohidratos, la oxidación de etanol y acetato, y la formación de celulosa constituyen evidencias indirectas de que los aislados presentan características compatibles con microorganismos asociados al proceso fermentativo de kombucha.

3.2 Determinación de la concentración adecuada de sanky para una bebida funcional.

3.2.1 Características del sanky

Los resultados de la cuantificación proximal muestran que el fruto presenta un alto contenido de humedad (94,70%), superior a los demás componentes evaluados. Asimismo, el contenido de fibra total (soluble e insoluble) fue de 2,34%, evidenciando su aporte dentro de la composición del fruto (Tabla 24). Estos valores son altamente consistentes, en la mayoría de los componentes, con los reportados en la literatura para esta especie. En particular, coinciden con los hallazgos de Nolzco y Guevara (71), quienes analizaron la pulpa de sanqui, reportando valores de 95,2% de humedad, 0,4% de cenizas, 0,0% de grasa, 1,3% de proteína y 0,9% de fibra. El reporte completo del análisis proximal emitido por el laboratorio se presenta en el Anexo 2.

Tabla 24. Análisis proximal de sanky fresco (*Corryocactus brevistylus*).

ENSAYO	ESPECIFICACIONES	MÉTODO	RESULTADOS
HUMEDAD	-	AOAC Oficial Method 966.2	94.70%
CENIZAS	-	AOAC Oficial Method 941.12	0.32%
GRASAS	-	AOAC Oficial Method 930.09	0.00%
PROTEÍNAS	-	AOAC Oficial Method 977.02	1.32%
FIBRAS	-	AOAC Oficial Method 930.10	2.34%
CARBOHIDRATOS	-	AOAC Oficial Method 931.02	1.32%

Nota: Elaboración propia.

De manera complementaria, se realizó el análisis proximal del sanky liofilizado, cuyos resultados evidenciaron una disminución considerable del contenido de humedad (5,25%) debido al proceso de deshidratación. Asimismo, se observó un incremento relativo en los demás componentes, principalmente en el extracto libre de nitrógeno (81,71%), seguido de extracto etéreo (4,05%), fibra cruda (3,16%) y cenizas (3,08%), como consecuencia de la concentración de sólidos presentes tras la liofilización. El informe completo emitido por el Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos de la Universidad Nacional Agraria La Molina se presenta en el Anexo 3.

Tabla 25. Análisis proximal de sanky (*Corryocactus brevistylus*) liofilizado.

ENSAYO	ESPECIFICACIONES	MÉTODO	RESULTADOS
HUMEDAD	-	AOAC Oficial Method 950.46	5.25%
PROTEÍNA TOTAL	-	AOAC Oficial Method 984.13	2.75%
EXTRACTO ETÉREO	-	AOAC Oficial Method 2003.05	4.05%
FIBRA CRUDA	-	AOAC Oficial Method 962.09	3.16%
CENIZAS	-	AOAC Oficial Method 942.05	3.08%
EXTRACTO LIBRE DE NITRÓGENO	-	Cálculo por diferencia	81.71%

Nota: Elaboración propia.

3.2.2 Variación de pH en el tiempo de fermentación

Inicialmente, el control presentó un pH de 3,75, mientras que las formulaciones con sanky al 2,5%, 5% y 10% registraron valores de 3,39; 3,23 y 3,09, respectivamente (Figura 21). A medida que avanzó la fermentación, el pH disminuyó progresivamente en todas las muestras. A partir de las 96 horas, el descenso fue más pronunciado, evidenciando un incremento en la acidez del medio.

Este comportamiento fue consistente en todos los tratamientos; sin embargo, la formulación con 10% mostró la mayor reducción, alcanzando aproximadamente pH 3,00 a las 168 h, en comparación con el control (pH de 3,39)

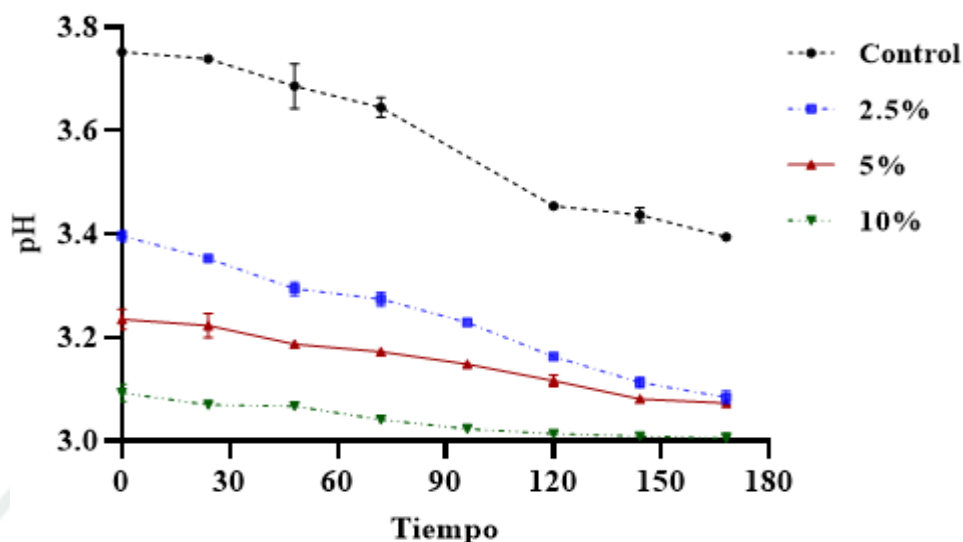


Figura 21. Variación de pH en 168 horas.

Nota: Control= 0% de sanky liofilizado

El valor final de pH en K3 (3.00) fue inferior al reportado por Jakubczyk et al. (72) para kombucha convencional (pH 3.45) Y está dentro del rango reportado por Villarreal-Soto et al. (73) , quienes indicaron que el pH de la kombucha típicamente desciende de 5.0-4.0 a 2.5-3.5 durante la fermentación debido a la producción de ácidos orgánicos por bacterias acéticas. Este descenso se atribuye a la acumulación de ácido acético, generado a partir de la oxidación del etanol producido por las levaduras durante la fermentación de los azúcares del medio, proceso mediado principalmente por *Komagataeibacter oboediens* y *K. xylinus* (74).

3.2.3 Variación de Ácido acético (%) en el tiempo de fermentación

Durante las primeras 24 horas, las concentraciones de ácido acético se mantuvieron relativamente estables; sin embargo, a partir de las 48 horas se observó un incremento progresivo. La formulación con 10% de sanky alcanzó el valor más alto, llegando aproximadamente a 4,74% hacia las 144 horas, mientras que el control presentó valores menores a 3,41% (Figura 22).

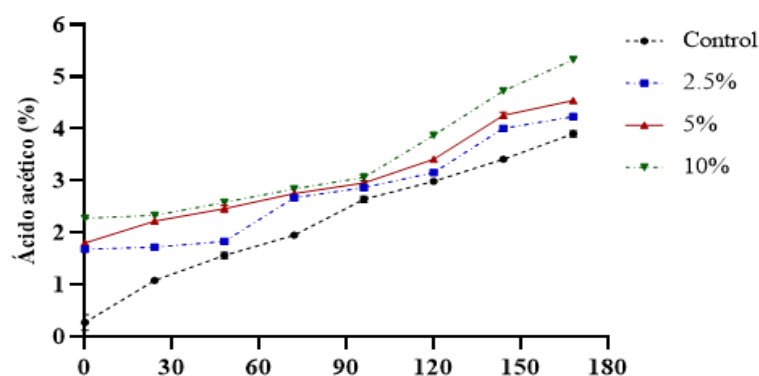


Figura 22. Variación de ácido acético a 28° C en 168 horas.

El análisis de varianza (Tabla 26), indicó que el porcentaje de sanky liofilizado influyó significativamente en la producción de ácido acético ($p < 0,05$), con un nivel de confianza del 95%, esto indica que los factores que influyeron significativamente para el porcentaje de ácido acético fue el porcentaje de sanky (*Corryocactus brevistylus*) liofilizado ($p < 0.05$), con un nivel de confianza del 95%.

El valor máximo de 4.74% en K3 es superior al rango típico de kombucha convencional (0.5-2.0% ácido acético) reportado por Jayabalan et al. (7), quienes señalaron que la producción de ácidos orgánicos depende de las cepas de bacterias acéticas presentes y de la disponibilidad de sustrato. En nuestros resultados, la producción de ácido acético se correlacionó positivamente con el tiempo de fermentación, alcanzando su valor máximo a las 168 horas, lo que evidencia que periodos prolongados favorecen la acumulación de este metabolito.

Tabla 26. Análisis de varianza de un factor a la vez para el porcentaje de ácido acético.

Fuente	Suma de cuadrados	df	Media cuadrada	F	p
Intercepto	193.2578	1	193.2578	13374.24	0.000000
Porcentaje de sanky liofilizado	2.6050	3	0.8683	60.09	0,000877
Error	0.0578	4	0.0144		
Total	2.6628	7			

Nota: Elaboración propia.

El análisis de Tukey (Tabla 27) evidenció diferencias significativas entre el control y los tratamientos con sanky. No se observaron diferencias significativas entre 2,5% y 5%, mientras que el 10% presentó un comportamiento diferenciado respecto a los demás tratamientos.

Tabla 27. Análisis de Tukey de un factor a la vez para el porcentaje de ácido acético.

	Control	K1	K2	K3
Control		0.001007	0.002205	0.016492
K1 (2.5%)	0.001007		0.170457	0.008107
K2 (5%)	0.002205	0.170457		
K3 (10%)	0.016492	0.008107	0.043844	

Nota: Elaboración propia.

3.2.4 Variación de sólidos solubles (°Brix) en el tiempo de fermentación

Los sólidos solubles totales (°Brix) mostraron una tendencia decreciente durante la fermentación. Inicialmente, el control presentó 10 °Brix, mientras que las formulaciones con sanky registraron valores mayores (11, 12 y 15 °Brix para 2,5%, 5% y 10%, respectivamente). Con el transcurso del tiempo, todas las muestras disminuyeron hasta aproximadamente 3 °Brix a las 168 h, lo que evidencia el consumo de azúcares durante el proceso fermentativo (Figura 23).

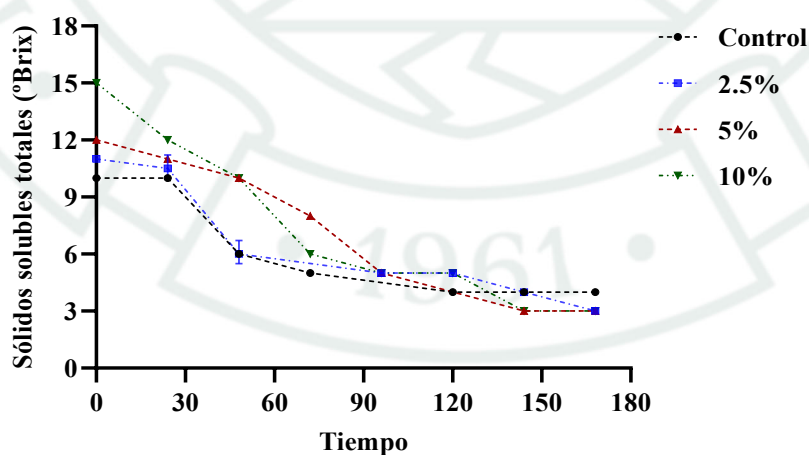


Figura 23. Variación de los sólidos solubles (°Brix) a 28° C en 168 horas

3.2.5 Variación de azúcares reductores (g/L) en el tiempo de fermentación

Los azúcares reductores mostraron una disminución progresiva a lo largo de las 168 horas de fermentación. Inicialmente, las concentraciones fueron mayores en los tratamientos con sanky, destacando el 10%. A las 48 horas se evidenció una reducción marcada en todos los tratamientos, lo que indica un consumo activo de estos compuestos por los microorganismos (Figura 24).

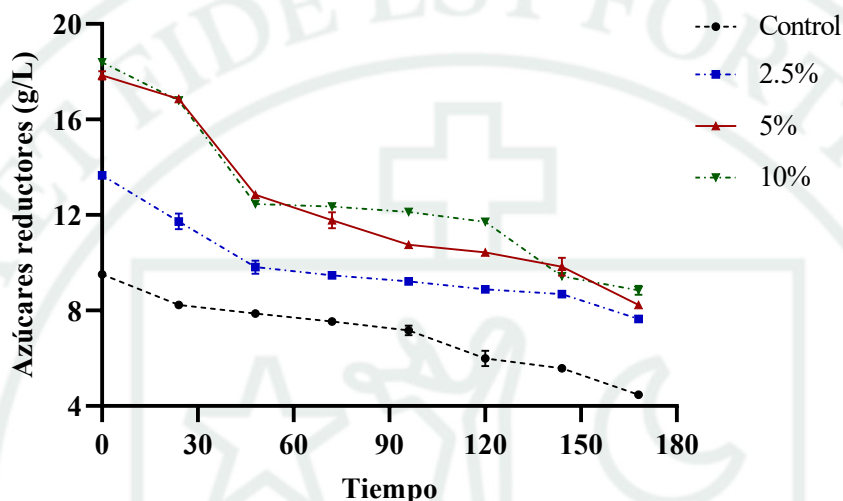


Figura 24. Variación de los azúcares reductores a 28° C en 168 horas.

El tratamiento K3 (10% sanky) partió de la concentración inicial más alta y a pesar de consumir aproximadamente 10 g/L durante la fermentación, mantuvo la concentración final más alta, superando al control. Un estudio que analizó la fermentación de kombucha a 28°C durante 15 días reportó que la concentración de azúcares reductores disminuye drásticamente en los primeros 3-5 días, correlacionándose con el crecimiento de *Komagataeibacter* spp. y levaduras (75).

Esto indica que la adición de sanky aporta un excedente de azúcares que no es completamente metabolizado por el consorcio microbiano en 168 horas. La prueba de Tukey (Tabla 29) mostró que no existen diferencias significativas entre K2 y K3 ($p=0.9905$), lo que sugiere que la capacidad de consumo de azúcares por parte del consorcio microbiano se satura a partir del 5% de sanky en las condiciones evaluadas (13).

El análisis de varianza (Tabla 28) evidenció que el porcentaje de sanky influyó significativamente en los azúcares reductores ($p<0,05$).

Tabla 28. Análisis de varianza de un factor de azúcares reductores

Fuente	Suma de cuadrados	df	Media cuadrado	F	<i>p</i>
Intercepto	456.1319	1	456.1319	9002.237	0.000000
Porcentaje de sanky liofilizado	33.8445	3	11.2815	222.652	0,000066
Error	0.2027	4	0.0507		
Total	34.0472	7			

Nota: Elaboración propia.

El análisis de Tukey (Tabla 29) mostró diferencias significativas entre el control y los tratamientos con sanky. Asimismo, los tratamientos de 5% y 10% no presentaron diferencias significativas entre sí, indicando un comportamiento similar.

Tabla 29. Análisis de Tukey de un factor a la vez para los azúcares reductores

	Control	K1	K2	K3
Control		0.041363	0.000362	0.000367
K1 (2.5%)	0.041363		0.000523	0.000551
K2 (5%)	0.000362	0.000523		0.990505
K3 (10%)	0.000367	0.000551	0.990505	

Nota: Elaboración propia.

En cuanto a la discusión de estos resultados, el efecto de la concentración de sanky en la fermentación y en las variables fisicoquímicas se evaluó empleando diferentes proporciones (2,5%, 5% y 10%) a 28 °C. Esta temperatura permitió condiciones estables para la actividad del consorcio microbiano, lo que concuerda con lo señalado por Jayabalan (76) y Li (77), quienes indican que temperaturas moderadas favorecen la producción equilibrada de metabolitos.

El pH mostró un descenso progresivo durante la fermentación, siendo más pronunciado en la formulación con 10%, lo que evidencia una mayor acidificación del medio. Este comportamiento es consistente con lo reportado por Jakubczyk (82) y Robles (78), quienes describen una disminución del pH asociada a la producción de ácidos orgánicos en kombucha.

En concordancia con lo anterior, la variable ácido acético (%) mostró incrementos asociados tanto al tiempo como a la concentración de sanky. En los resultados, la formulación con 10% presentó los valores más altos hacia el final del proceso (alcanzando alrededor de 4,74%), mientras que el control se mantuvo en valores menores ($\approx 3,41\%$), lo cual evidencia que la adición de sanky De manera similar, el incremento de ácido acético estuvo influenciado tanto por el tiempo como por la concentración de sanky, destacando el tratamiento al 10%. Este resultado concuerda con estudios previos que reportan un aumento de acidez durante la fermentación (72)(78).

En cuanto a los sólidos solubles, se observó una disminución progresiva, atribuida al consumo de azúcares por los microorganismos, en concordancia con lo descrito por Guzmán (67) y Robles (78).

Finalmente, la reducción de azúcares reductores confirma la utilización de sustratos durante el proceso fermentativo. Sin embargo, a pesar de que la concentración de sanky aumentó hasta 10%, las pruebas de Tukey no mostraron diferencias significativas entre K2 y K3 para el consumo de azúcares reductores ($p=0,9905$), lo que indica que la capacidad de asimilación del consorcio microbiano se satura a partir del 5% de sanky en las condiciones evaluadas. Este fenómeno se explica porque la velocidad de consumo de sustrato tiene un límite superior a una temperatura y pH determinados; una vez alcanzada la máxima actividad enzimática, el excedente de azúcares permanece sin metabolizar (74). En conjunto, estos resultados evidencian que la adición de sanky influye en la dinámica fermentativa, modificando el perfil fisicoquímico del sistema, lo cual coincide con lo reportado para bebidas fermentadas enriquecidas con frutas (79).

3.3 Determinación de capacidad antioxidante

3.3.1 Método DPPH

Siguiendo la metodología empleada para la prueba de DPPH, se elaboró una curva de calibración utilizando como estándar al Trolox. Para ello, se determinaron la absorbancia correspondiente a diferentes concentraciones de Trolox, midiendo a una longitud de onda de 517 nm. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 20 y Anexo 6, y a partir de ellos se construyó la curva estándar que relaciona la concentración de Trolox ($\mu\text{g/mL}$) con el porcentaje de inhibición del radical DPPH.

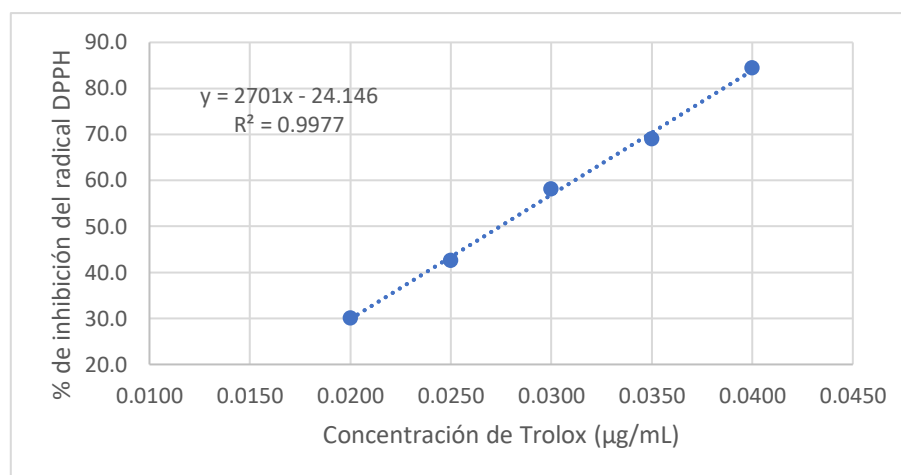


Figura 25. Curva de calibración para Trolox-DPPH.

La ecuación de la recta obtenida fue:

$$y = 2701x - 24.146$$

Con un coeficiente de correlación $R^2 = 0.9977$, lo cual indica un excelente ajuste del modelo lineal a los datos experimentales.

En la Tabla 30 se representan los resultados obtenidos de la actividad antioxidante mediante el método DPPH, utilizando extractos de sanky (*Corryocactus brevistylus*) previamente preparados a diferentes concentraciones de liofilizado. A partir de las absorbancias promedio se calculó el porcentaje de inhibición del radical DPPH y la capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox.

Se observó una tendencia creciente en el porcentaje de inhibición y en la capacidad antioxidante conforme se incrementó la cantidad de liofilizado, lo que evidencia una relación directa entre la concentración de muestra y su potencial antioxidante.

Tabla 30. Actividad antioxidante de sanky liofilizado por DPPH

Muestra (g de liofilizado)	0.1		0.2		0.3	
	NºLecturas	Absorbancia	NºLecturas	Absorbancia	NºLecturas	Absorbancia
1		0.6585	1	0.6292	1	0.5995
2		0.6610	2	0.6315	2	0.6060
3		0.6625	3	0.6279	3	0.6029
4		0.6602	4	0.6305	4	0.6002
5		0.6577	5	0.6299	5	0.6025

Promedio	0.6600	Promedio	0.6298	Promedio	0.6022
% Inhibición	34.0915	% Inhibición	37.1053	% Inhibición	39.8594
Capacidad antioxidante (μmol TE/g de liofilizado)	7.6533	Capacidad antioxidante (μmol TE/g de liofilizado)	11.4660	Capacidad antioxidante (μmol TE/g de liofilizado)	22.9066
D.E	0.0006	D.E	0.0006	D.E	0.0024
CV%	0.01	CV%	0.01	CV%	0.01

Nota: Elaboración propia.

En el caso de la bebida fermentada, la Tabla 31 muestra los valores promedio de la actividad antioxidante determinada por el método DPPH, junto a su desviación estándar. Se observó un incremento progresivo de la capacidad antioxidante durante el proceso de fermentación en todas las formulaciones evaluadas.

Asimismo, las muestras suplementadas con sanky presentaron mayores niveles de actividad antioxidante en comparación con el control, siendo este efecto más evidente a medida que aumentó la concentración del liofilizado. La formulación con mayor porcentaje de sanky presentó el valor más alto al final del proceso, mientras que el control también mostró un incremento, aunque de menor magnitud.

Tabla 31. Actividad antioxidante (DPPH) en kombucha con sanky liofilizado.

Muestra	Tiempo de fermentación hrs								
	0 hrs			98 hrs			168 hrs		
	% Inhibición	μmol TE/mL	D.E	% Inhibición	μmol TE/mL	D.E	% Inhibición	μmol TE/mL	D.E
K1 Control	41.6477	1.2180	0.0006	44.5530	1.2717	0.0013	52.9948	1.4280	0.0007
K2 Control									
K1 (2.5%)	44.1948	1.2651	0.0018	47.3269	1.3231	0.0014	55.3146	1.4709	0.0012
K2 (2.5%)									
K1 (5%)	46.0710	1.2998	0.0011	49.0945	1.3558	0.0014	56.8214	1.4988	0.0014
K2 (5%)									
K1 (10%)	47.9219	1.3341	0.0014	50.8454	1.3882	0.0015	58.2255	1.5248	0.0012
K2 (10%)									

Nota: Elaboración propia.

La combinación de añadir sanky liofilizado al 10% y fermentar durante 168 h produjo un valor de capacidad antioxidante (1,5248 μmol TE/mL) un 25,2% superior al del control inicial (0 h, sin sanky). Al comparar únicamente el efecto del sanky a igual tiempo de fermentación (168

h), el incremento fue del 6,8% respecto al control (1,4280 $\mu\text{mol TE/mL}$) (Tabla 31). Lee et al. (35) evaluaron kombucha enriquecida con trigo sarraceno y bardana, encontrando valores de actividad antioxidante por DPPH que aumentaron significativamente durante la fermentación debido al alto contenido de polifenoles de estas matrices vegetales.

La ausencia de diferencias significativas entre 98 y 168 h ($p=0,256$, Figura 21) indica que la capacidad antioxidante alcanza una meseta a partir de las 98 h, además ello sugiere un plateau antioxidante, fenómeno reportado por Villarreal-Soto et al. (73), posiblemente por degradación de compuestos lábiles bajo pH ácido (13).

La ausencia de diferencias significativas entre 98 y 168 h ($p=0,256$, Figura 26) indica que la capacidad antioxidante alcanza una meseta a partir de las 98 h, además ello sugiere un plateau antioxidante, fenómeno reportado por Villarreal-Soto et al. (17), posiblemente por degradación de compuestos lábiles bajo pH ácido (13). En la Figura 21 y Tabla 31 se muestran las diferencias identificadas mediante ANOVA. Se determinó que tanto el tiempo como la concentración tienen un efecto significativo en la capacidad antioxidante. Asimismo, se observó que no existen diferencias significativas entre 98 y 168 horas, indicando que la respuesta antioxidante alcanza un comportamiento estable a partir de las 98 h de fermentación.

Tabla 32. Análisis de varianza de tiempo y concentración para la capacidad antioxidante

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Media cuadrada	Valor F	Valor p
Concentración	3	11.5051	3.83505	101.98	0.000
Tiempo	2	1.6339	0.81695	21.72	0.000
Error	18	0.6769	0.03761		
Falta de ajuste	6	0.2910	0.04851	1.51	0.256
Error puro	12	0.3859	0.03215		
Total	23	13.8160			

Nota: Elaboración propia.

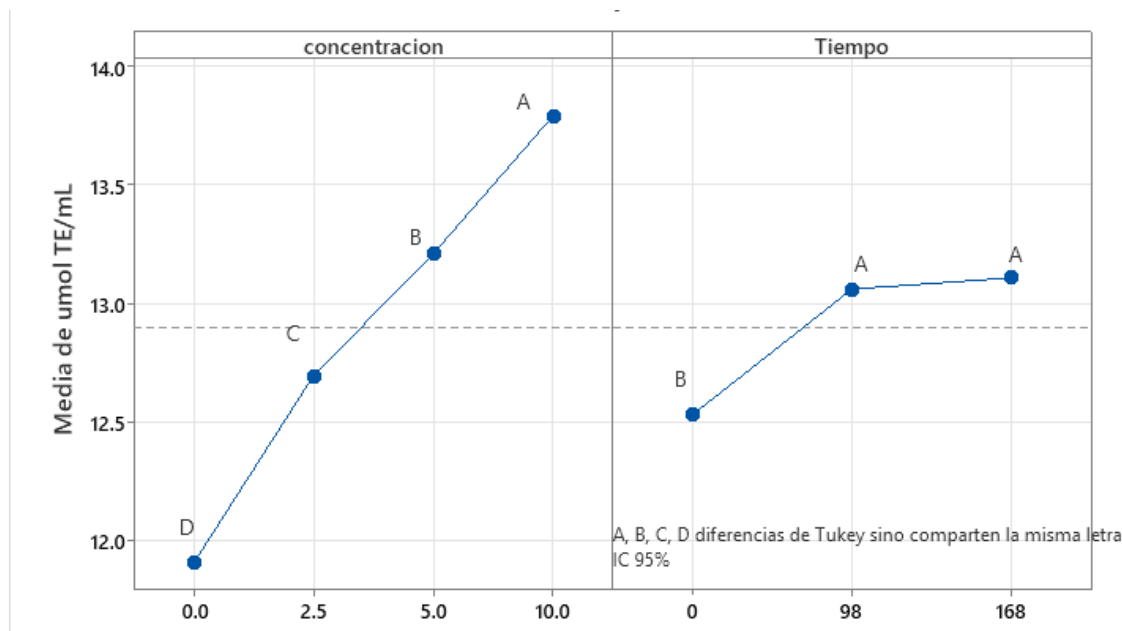


Figura 26. Efectos principales y comparación Tukey para la capacidad antioxidante DPPH

Así mismo, el comportamiento dosis-dependiente del sanky liofilizado puede explicarse por su rica composición fitoquímica. Las referencias mencionan que esta fruta es una fuente importante de compuestos bioactivos, incluyendo ácidos hidroxicinámicos y flavonoides, los cuales son responsables directos de su capacidad para neutralizar radicales libres (80). Por lo tanto, el aumento del porcentaje de inhibición del DPPH al añadir más fruta era un hallazgo esperado y confirma su potencial como ingrediente funcional.

3.3.2 Método ABTS-TEAC

Utilizando la metodología para ABTS previamente descrita, se obtuvieron los datos que se pueden apreciar en la Figura 27, los cuales se observan las absorbancias de la curva estándar de Trolox medida a una longitud de onda de 734 nm.

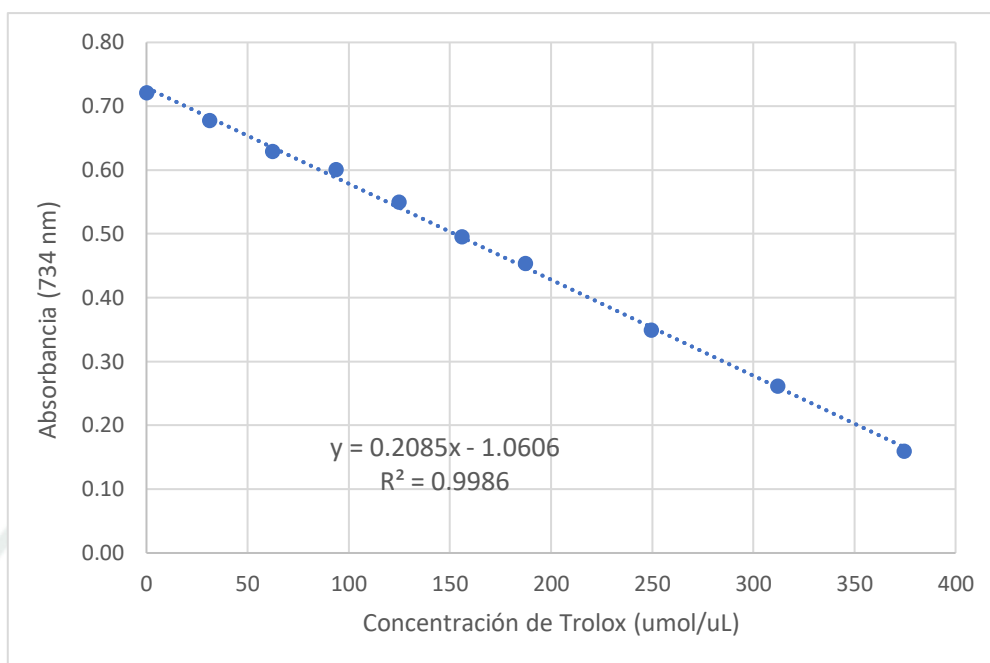


Figura 27. Datos de la curva de calibración para Trolox-ABTS.

Los valores obtenidos permitieron generar la curva de calibración (Anexo 7), que representa la relación entre la concentración de Trolox y la absorbancia correspondiente. La ecuación de la recta obtenida fue:

$$y = 0.2085x - 1.0606$$

Para determinar la actividad antioxidante del liofilizado de sanky (*Corryocactus brevistylus*), se evaluaron extractos preparados a diferentes concentraciones siguiendo el protocolo descrito. Las absorbancias fueron corregidas mediante el blanco y se calculó el porcentaje de inhibición del radical ABTS, así como la capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox.

Los resultados mostraron una relación proporcional entre la cantidad de muestra utilizada y la capacidad antioxidante, evidenciando mayores valores en las concentraciones más altas del liofilizado.

Tabla 33. Actividad antioxidante de sanky liofilizado por ABTS.

Muestra (g de liofilizado)	0.1		0.2		0.3	
	NºLecturas	Absorbancia	NºLecturas	Absorbancia	NºLecturas	Absorbancia
1		0.5780	1	0.4976	1	0.4452
2		0.5715	2	0.4923	2	0.4518
3		0.5756	3	0.4959	3	0.4490
4		0.5740	4	0.4935	4	0.4478

5	0.5747	5	0.4948	5	0.4499
Promedio	0.5748	Promedio	0.4948	Promedio	0.4487
% Inhibición	47.9005	% Inhibición	55.1468	% Inhibición	59.3231
Capacidad antioxidante (μmol TE/g de liofilizado)	32.6811	Capacidad antioxidante (μmol TE/g de liofilizado)	46.6253	Capacidad antioxidante (μmol TE/g de liofilizado)	90.4885
D.E	0.0024	D.E	0.0020	D.E	0.0024
CV%	0.41	CV%	0.41	CV%	0.54

Nota: Elaboración propia.

En la Tabla 32 se presentan los resultados obtenidos. Se observa una disminución progresiva de la absorbancia conforme aumenta la cantidad de liofilizado, lo que se traduce en un incremento del porcentaje de inhibición del radical ABTS y, por tanto, de la capacidad antioxidante. Este comportamiento evidencia una relación directamente proporcional entre la concentración de muestra y la respuesta antioxidante.

El extracto preparado con mayor cantidad de liofilizado (0.3 g) mostró el mayor nivel de actividad antioxidante, seguido por las concentraciones intermedias y bajas, lo que indica una mayor disponibilidad de compuestos antioxidantes en extractos más concentrados. Asimismo, los valores de desviación estándar y coeficiente de variación fueron bajos en todas las concentraciones evaluadas, lo que refleja una adecuada repetibilidad del método.

Estos resultados respaldan la selección del extracto de mayor concentración como representativo del potencial antioxidante del liofilizado de sanky.

Tabla 34. Actividad antioxidante (ABTS) en kombucha con sanky liofilizado.

Muestra	Tiempo de fermentación hrs					
	0 hrs		98 hrs		168 hrs	
	μmol TE/mL Promedio	D.E	μmol TE/mL Promedio	D.E	μmol TE/mL Promedio	D.E
K1 Control	11.7339	0.0037	12.0238	0.0028	11.9593	0.0024
K2 Control						
K1 (2.5%)	12.3190	0.0060	12.8830	0.0038	12.8817	0.0028
K2 (2.5%)						
K1 (5%)	12.8606	0.0039	13.3626	0.0027	13.4019	0.0020
K2 (5%)						

K1 (10%)	13.2128	0.0031	13.9705	0.0025	14.1858	0.0017
K2 (10%)						

Nota: Elaboración propia.

En la bebida fermentada, las absorbancias registradas fueron corregidas por el valor promedio del blanco y la actividad antioxidante fue expresada como $\mu\text{mol TE/mL}$ (Tabla 34). Se observó una tendencia creciente de la capacidad antioxidante con el tiempo de fermentación, siendo más notoria en las muestras suplementadas con mayores concentraciones de sanky.

Los valores de ABTS fueron 9.3 veces superiores a los de DPPH en K3 (14.19 vs 1.52 $\mu\text{mol TE/mL}$), esta diferencia es consistente con lo reportado por Munteanu & Apetrei (81), quienes explican que el método ABTS es más sensible porque el radical ABTS es soluble tanto en medios acuosos como orgánicos, permitiendo detectar un espectro más amplio de antioxidantes (hidrofílicos e hidrofóbicos), mientras que el DPPH es más selectivo para compuestos lipofílicos. El incremento del 18.6% en K3 respecto al control confirma que el sanky aporta compuestos antioxidantes de naturaleza predominantemente hidrofílica, consistentes con el análisis proximal (Tabla 24).

El aumento de la actividad antioxidante durante la fermentación responde a un mecanismo enzimático. Wang y colaboradores en el año 2024 (82) demostraron que las enzimas del SCOBY (como la tanasa) hidrolizan polifenoles complejos de matrices vegetales, liberando metabolitos de menor peso molecular con mayor capacidad antioxidante. Este fenómeno explica por qué las formulaciones con sanky superaron al control, especialmente a las 168 h.

En la Figura 28 y Tabla 35 se muestran las diferencias identificadas mediante ANOVA. Se determinó que tanto el tiempo como la concentración influyen significativamente en la capacidad antioxidante. Asimismo, no se observaron diferencias significativas entre 98 y 168 horas, indicando que el sistema alcanza una estabilización a partir de este punto.

Tabla 35. ANOVA de tiempo y concentración para capacidad antioxidante ABTS

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Media cuadrada	Valor F	Valor p
Tiempo	2	1.6339	0.81695	21.72	0.000
concentración	3	11.5051	3.83505	101.98	0.000
Error	18	0.6769	0.03761		

Falta de ajuste	6	0.2910	0.04851	1.51	0.256
Error puro	12	0.3859	0.03215		
Total	23	13.8160			

Nota: Elaboración propia.

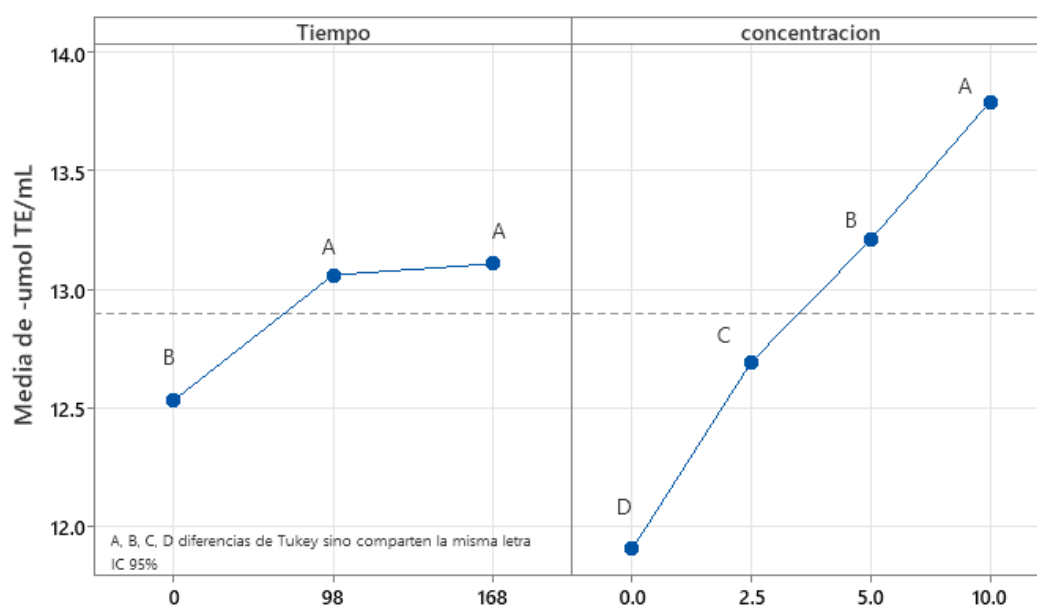


Figura 28. Efectos principales y comparación Tukey para la capacidad antioxidante ABTS

En ABTS se mantuvo el patrón de incremento de la capacidad antioxidante con la concentración del liofilizado y con la suplementación en la kombucha. La significancia estadística del tiempo y la concentración ($p < 0.001$), junto con la ausencia de diferencias entre 98 y 168 h, respaldan que la ganancia antioxidante se estabiliza luego de 98 h de fermentación.

Este comportamiento fue consistente con lo descrito para bebidas tipo kombucha, en las que el té aporta compuestos fenólicos predominantes (p. ej., EGCG y ácido gálico) que contribuyen al potencial antioxidante y pueden ser modificados por la fermentación (49), y con reportes donde un mayor contenido de fenoles se asocia a mayor capacidad antioxidante en sistemas fermentados o enriquecidos con extractos vegetales (47). En conjunto, el método ABTS mostró valores superiores al DPPH, lo cual es esperable debido a su mayor sensibilidad frente a un espectro más amplio de compuestos antioxidantes presentes en matrices acuosas fermentadas, reforzando la interpretación del efecto positivo de la suplementación con sanky.

3.4 Determinación de polifenoles totales

Para la cuantificación del contenido de polifenoles totales en las muestras de kombucha y liofilizado, se utilizó el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, una de las técnicas más ampliamente empleadas para la determinación de compuestos fenólicos mediante espectrofotometría en lector de microplacas, previamente descrita en la metodología.

En la Figura 29, se muestra la relación entre la absorbancia y la concentración de ácido gálico en mg/L, lo que permitió obtener la ecuación de la recta Anexo 5.

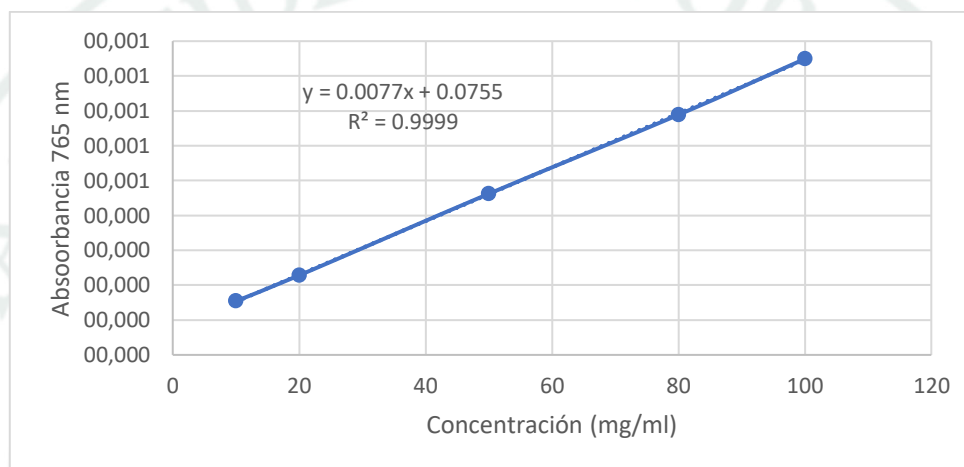


Figura 29. Curva de calibración para polifenoles totales.

En el gráfico del Anexo 5, se representa la regresión lineal obtenida a partir de las distintas concentraciones de ácido gálico utilizadas como estándar, junto con los valores promedio de absorbancia medidos a 765 nm. A partir de estos datos, se obtuvo la ecuación de la recta:

$$Y = 0.0077x + 0.0755$$

Y donde “y” es la absorbancia y “x” a la concentración de polifenoles totales expresada como equivalente de ácido gálico (mg/mL). El coeficiente de determinación ($R^2 = 0.9999$) indica una alta linealidad, lo que respalda la precisión del método para la cuantificación de compuestos fenólicos en las muestras analizadas.

El análisis de polifenoles totales en el extracto liofilizado de *sanky* (*Corryocactus brevistylus*) mostró diferencias en función de la cantidad de muestra utilizada. Con el objetivo de caracterizar el contenido fenólico del insumo empleado en la formulación, se evaluaron tres concentraciones. La muestra de 0.1 g presentó un valor bajo (0.2597 mg EAG/g), asociado a una señal cercana al límite de cuantificación, por lo que no se consideró representativa. En contraste, las muestras de 0.2 g y 0.3 g mostraron valores de 14.63 y 18.88 mg EAG/g,

respectivamente (Tabla 36), evidenciando un incremento del contenido fenólico con la masa analizada. En base a ello, se seleccionó la concentración de 0.3 g como referencia para la caracterización del liofilizado.

Tabla 36. Contenido de polifenoles totales en sanky (*Corryocactus brevistylus*) liofilizado

Muestra (g de liofilizado)	0.1	0.2	0.3
Nº lecturas	Absorbancia	Nº lecturas	Absorbancia
	a		a
1	0.0749	1	0.1321
2	0.0761	2	0.1309
3	0.0746	3	0.1330
4	0.0754	4	0.1324
5	0.0759	5	0.1306
Promedio	0.0754	Promedio	0.1318
Concentración (mg EAG/g)	0.2597	Concentración (mg EAG/g)	14.6338
D.E	0.0285	D.E	0.2642
CV%	11.0	CV%	1.81

Nota: Elaboración propia.

Posteriormente, se evaluó la concentración de polifenoles totales en las muestras de kombucha elaboradas con diferentes concentraciones de liofilizado de sanky (2.5%, 5% y 10%), además del control sin adición. El análisis se realizó a 0, 98 y 168 horas de fermentación. La cuantificación se llevó a cabo empleando una dilución 1:50 de las muestras fermentadas, expresando los resultados como mg de ácido gálico equivalente por mL (mg EAG/mL). Se realizaron cinco repeticiones por muestra, calculándose el promedio y la desviación estándar.

En la Tabla 37 se presentan los valores obtenidos, donde se observa una tendencia creciente del contenido de polifenoles tanto con el tiempo de fermentación como con el incremento del porcentaje de liofilizado de sanky en la formulación.

Tabla 37. Contenido de polifenoles totales en bebida tipo kombucha con sanky liofilizado

Muestra	Tiempo de fermentación hrs					
	0 hrs		98 hrs		168 hrs	
	Con. EAG (mg/mL)	D.E (±)	Con. EAG (mg/mL)	D.E (±)	Con. EAG (mg/mL)	D.E (±)
K1						
Control	2.3277	0.0036	2.8482	0.0066	2.9507	0.0010
K2						
Control						

K1 (2.5%) K2 (2.5%)	2.4675	0.0143	3.1109	0.0043	3.1400	0.0055
K1 (5%) K2 (5%)	2.5551	0.0141	3.3193	0.0093	3.4225	0.0066
K1 (10%) K2 (10%)	2.6423	0.0071	3.3517	0.0110	3.5760	0.0083

Nota: Elaboración propia.

La concentración de polifenoles totales aumentó progresivamente a lo largo de la fermentación en todas las muestras. La kombucha control presentó un incremento de 2.3277 ± 0.0036 mg EAG/mL a 2.9507 ± 0.0010 mg EAG/mL tras 168 horas, lo que puede atribuirse al metabolismo del consorcio SCOBY, el cual libera y transforma compuestos fenólicos provenientes del té.

En las muestras suplementadas con sanky, se observó un mayor contenido de polifenoles desde el inicio del proceso. A las 168 horas, la formulación con 10% alcanzó el valor más alto (3.5760 ± 0.0083 mg EAG/mL), seguida por las concentraciones de 5% y 2.5%, evidenciando que el liofilizado actúa como una fuente adicional de compuestos fenólicos durante la fermentación.

El valor de 3.5760 mg EAG/mL en K3 supera en 96.5% al reportado por Contreras-López et al. (30) en infusiones de sanky sin fermentar, demostrando que la fermentación kombucha potencia la liberación de polifenoles desde la matriz del sanky.

Jayabalan et al. (75), señalaron en su revisión que la fermentación de kombucha puede incrementar el contenido de compuestos fenólicos debido a la hidrólisis enzimática de taninos y polifenoles conjugados por las β -glucosidasas microbianas, además Lee et al. (35) también reportaron altos contenidos de polifenoles en kombuchas enriquecidas con plantas ricas en compuestos bioactivos, confirmando que la suplementación con matrices vegetales potencia el perfil fenólico de la bebida

La correlación muy fuerte con ABTS ($r=0.942$, $p<0.001$) y fuerte con DPPH ($r=0.887$, $p<0.001$) confirma que los polifenoles son los principales responsables de la actividad antioxidante (83). El liofilizado de sanky (18.88 mg EAG/g) presentó valores comparables a otros frutos andinos como la tuna (15-25 mg EAG/g) según Obregón-La Rosa et al. (5) .

En la Figura 30 y Tabla 38 se presentan las diferencias evaluadas mediante ANOVA, donde se evidencia que tanto el tiempo como la concentración tienen un efecto significativo sobre el contenido de polifenoles totales ($p<0.001$).

Tabla 38. ANOVA de tiempo y concentración a la vez para el contenido de polifenoles.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Media cuadrada	Valor F	Valor p
Modelo	11	3.69529	0.33594	4587.82	0.000
Lineal	5	3.61531	0.72306	9874.73	0.000
Tiempo	2	2.79244	1.39622	19067.95	0.000
concentración	3	0.82287	0.27429	3745.92	0.000
Interacciones de 2 términos	6	0.07999	0.01333	182.06	0.000
Tiempo*concentración	6	0.07999	0.01333	182.06	0.000
Error	12	0.00088	0.00007		
Total	23	3.69617			

Nota: Elaboración propia.

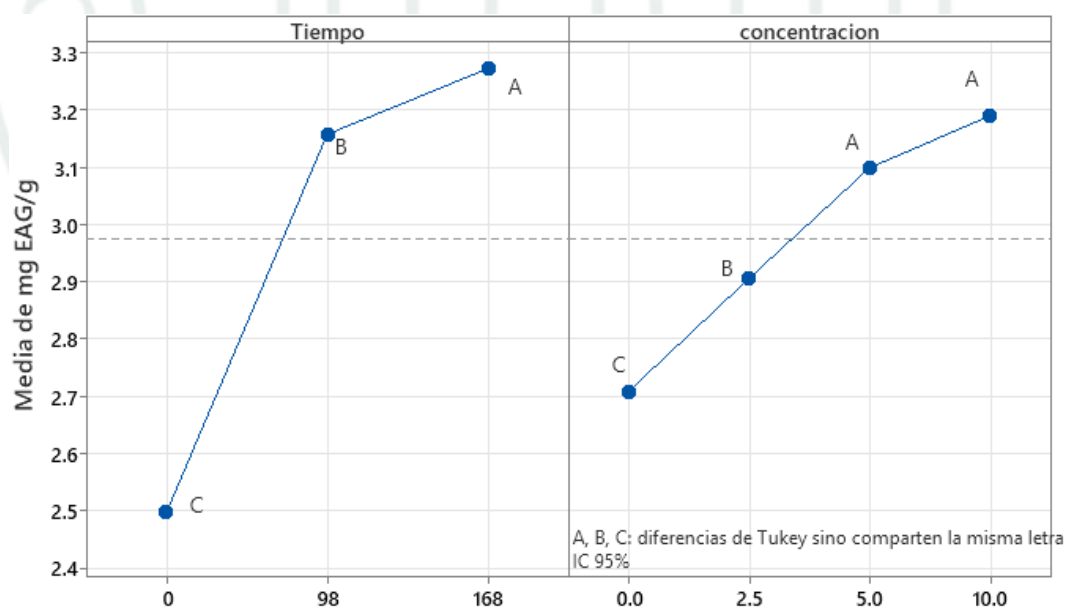


Figura 30. Efectos principales y comparación Tukey para polifenoles totales

Los resultados del análisis estadístico muestran que el incremento en el contenido de polifenoles esta influenciado significativamente por ambos factores evaluados. Asimismo, la prueba de Tukey indica diferencias entre niveles de concentración, siendo las formulaciones con mayor porcentaje de sanky las que presenan valores superiores.

Asimismo, la interacción tiempo $\times$ concentración también resultó significativa ($p < 0.001$), lo que indica que el efecto del tiempo varió según el nivel de concentración evaluado. Los resultados del análisis estadístico muestran que el incremento en el contenido de polifenoles estuvo influenciado significativamente por ambos factores y por su acción conjunta. En este modelo, la falta de ajuste es explicada al incorporar la interacción entre tiempo y concentración, por lo que el error residual corresponde únicamente al error puro. Asimismo, la prueba de Tukey indicó diferencias entre niveles de concentración, siendo las formulaciones con mayor porcentaje de sanky las que presentaron valores superiores. La calibración con ácido gálico mostró una linealidad elevada ($R^2 = 0.9999$), confirmando la confiabilidad del método. En el liofilizado, la mayor concentración evaluada presentó el mayor contenido fenólico, mientras que valores bajos de masa evidenciaron limitaciones analíticas asociadas a la sensibilidad del método. En la kombucha, se observó un incremento sostenido de polifenoles con el tiempo y la concentración, lo que respalda el efecto de la suplementación con sanky como fuente de compuestos fenólicos. Estos resultados son consistentes con reportes previos que asocian el contenido de fenoles con el aumento de la actividad antioxidante en sistemas fermentados (45,48). Asimismo, las diferencias observadas pueden atribuirse a factores como la matriz analizada, condiciones de extracción y transformaciones durante la fermentación (36).

CONCLUSIONES

PRIMERA: Se aislaron exitosamente 2 cepas de levaduras y 2 cepas de bacterias ácido-acéticas a partir de una kombucha comercial, las cuales presentaron características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas compatibles con microorganismos típicos del consorcio SCOBY. La identificación molecular indicó similitud con *Starmerella bacillaris* y *Brettanomyces bruxellensis* como levaduras, y con *Komagataeibacter oboediens* y *Komagataeibacter xylinus* como bacterias ácido-acéticas, lo que permitió describir la composición microbiana asociada al proceso fermentativo.

SEGUNDA: La concentración de sanky liofilizado y el tiempo de fermentación influyeron de manera conjunta en el comportamiento fermentativo y en las variables fisicoquímicas evaluadas. Se observó que el incremento en la concentración de sanky se asoció con una mayor acidificación del sistema y un aumento en la producción de ácido acético, mientras que el avance del tiempo de fermentación favoreció la disminución de sólidos solubles y azúcares reductores, mostrando una relación entre estas variables y el desarrollo del proceso fermentativo.

TERCERA: La actividad antioxidante de la kombucha, evaluada mediante los métodos DPPH y ABTS, mostró un incremento asociado tanto al tiempo de fermentación como a la concentración de sanky añadida. Se observó que mayores niveles de suplementación y tiempos más prolongados favorecieron el aumento del potencial antioxidante, alcanzando los valores más altos en el tratamiento con 10%; sin embargo, la ausencia de diferencias significativas entre 98 y 168 h indica que el sistema tiende a estabilizar su capacidad antioxidante a partir de ese intervalo.

CUARTA: El contenido de polifenoles totales en la kombucha aumentó progresivamente en función del tiempo de fermentación y del porcentaje de sanky incorporado, evidenciando que ambos factores contribuyen al incremento de compuestos fenólicos durante el proceso. La mayor concentración de polifenoles se observó en el tratamiento con 10%, lo que sugiere que la suplementación con sanky constituye un aporte adicional de compuestos bioactivos y favorece el perfil antioxidante de la bebida en las condiciones evaluadas.

RECOMENDACIONES

Se recomienda conservar y reactivar por separado las cepas identificadas (*Starmerella bacillaris*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Komagataeibacter oboediens* y *K. xylinus*) y evaluar su desempeño como cultivo iniciador controlado (mezclas definidas), con el fin de reducir la variabilidad entre lotes y asegurar la reproducibilidad en pH, acidez, consumo de azúcares y formación de celulosa durante la fermentación. Asimismo, se recomienda limitar el número de pasajes o subcultivos de cada cepa (preferentemente ≤ 3) durante su uso operativo, empleando bancos de conservación (crioviales) para la reactivación periódica, con el objetivo de evitar inestabilidad genética, pérdida de actividad fermentativa y riesgos de contaminación.

Para la elaboración de la bebida funcional se recomienda emplear 10% de sanky liofilizado y un tiempo de fermentación de 98 horas a 28 °C, ya que desde este punto se alcanza un desempeño antioxidante óptimo (sin diferencias significativas frente a 168 h) y se mantiene un perfil fisicoquímico adecuado. En caso de requerir el máximo contenido de polifenoles y capacidad antioxidante, el proceso puede extenderse hasta 168 horas, condición en la cual se alcanzan los valores más altos sin evidenciar incrementos críticos de acidez, manteniéndose dentro de rangos fisicoquímicos aceptables.

Se recomienda implementar controles microbiológicos y fisicoquímicos por lote (recuento de levaduras y bacterias ácido-acéticas, ausencia de contaminantes, pH, °Brix, azúcares reductores y % de ácido acético), además de definir límites de aceptación para asegurar inocuidad, estabilidad y uniformidad sensorial del producto final.

Se recomienda complementar la caracterización bioactiva con la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos específicos (mediante HPLC/UPLC) y con pruebas de estabilidad durante almacenamiento (vida útil), incluyendo evaluación sensorial y aceptación del consumidor, para sustentar con mayor solidez la viabilidad tecnológica y comercial de la kombucha suplementada con sanky liofilizado.

REFERENCIAS

1. Fekete M, Lehoczki A, Kryczyk-Poprawa A, Zábó V, Varga J, Bálint M, et al. Functional Foods in Modern Nutrition Science: Mechanisms, Evidence, and Public Health Implications. *Nutrients*. 2025 Jun 28;17(13):2153.
2. Preciado AM. Desarrollo, caracterización y evaluación in vitro de una bebida funcional a base de extractos optimizados de jamaica y té verde. Tesis para optar el Grado Académico de Magister en Ciencias. Sonora: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.; 2016.
3. Kitwetcharoen H, Phung LT, Klanrit P, Thanonkeo S, Tippayawat P, Yamada M, et al. Kombucha Healthy Drink—Recent Advances in Production, Chemical Composition and Health Benefits. *Fermentation* 2023, Vol 9, Page 48 [Internet]. 2023 Jan 6 [cited 2026 Jun 7];9(1):48. Available from: <https://www.mdpi.com/2311-5637/9/1/48/htm>
4. Xiong RG, Wu SX, Cheng J, Saimaiti A, Liu Q, Shang A, et al. Antioxidant Activities, Phenolic Compounds, and Sensory Acceptability of Kombucha-Fermented Beverages from Bamboo Leaf and Mulberry Leaf. *Antioxidants*. 2023 Aug 6;12(8):1573.
5. Obregón-La Rosa AJ, Augusto-Elías-Peñafliel CC, Contreras-López E, Arias-Arroyo GC, Bracamonte-Romero M. Características fisicoquímicas, nutricionales y morfológicas de frutas nativas. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*. 2021 Jan 30;23(1):17–25.
6. Ismaiel AA, Bassyouni RH, Kamel Z, Gabr SM. Detoxification of Patulin by Kombucha tea culture. *CYTA - Journal of Food*. 2016;14(2):271–9.
7. Jayabalan R, Malbaša R V., Lončar ES, Vitas JS, Sathishkumar M. A review on kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2014;13(4):538–50.
8. Villarreal-Soto SA, Beaufort S, Bouajila J, Souchard JP, Taillandier P. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *J Food Sci* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2026 Jun 7];83(3):580–8. Available from: [/doi/pdf/10.1111/1750-3841.14068](https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068)

9. Harrison K, Curtin C. Microbial Composition of SCOBY Starter Cultures Used by Commercial Kombucha Brewers in North America. *Microorganisms*. 2021 May 14;9(5):1060.
10. Zhang H, Qi R, Mine Y. The impact of oolong and black tea polyphenols on human health. *Food Biosci*. 2019;29(February 2018):55–61.
11. Reiss J. Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Z Lebensm Unters Forsch*. 1994;198(3):258–61.
12. Bauer-Petrovska B, Petrushevska-Tozi L. Mineral and water soluble vitamin content in the Kombucha drink. *Int J Food Sci Technol*. 2000;35(2):201–5.
13. Chen C, Liu BY. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *J Appl Microbiol*. 2000;89(5):834–839.
14. Júnior JC da S, Meireles Mafaldo Í, de Lima Brito I, Tribuzy de Magalhães Cordeiro AM. Kombucha: Formulation, chemical composition, and therapeutic potentialities. *Curr Res Food Sci*. 2022;5(November 2021):360–5.
15. Sievers M, Lanini C, Weber A, Schuler-Schmid U, Teuber M. Microbiology and Fermentation Balance in a Kombucha Beverage Obtained from a Tea Fungus Fermentation. *Syst Appl Microbiol*. 1995;18(4):590–4.
16. Villarreal-Soto SA, Beaufort S, Bouajila J, Souchard JP, Taillandier P. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Reseñas concisas yHipótesis en ciencia de los alim*. 2018;83(3):580–8.
17. Díez-Ozaeta I, Astiazaran OJ. Recent advances in Kombucha tea: Microbial consortium, chemical parameters, health implications and biocellulose production. *Int J Food Microbiol*. 2022;377(1).
18. Su J, Tan Q, Wu S, Abbas B, Yang M. Application of Kombucha Fermentation Broth for Antibacterial, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Processes. *Int J Mol Sci*. 2023;24(18):13984.
19. Rojas T, Fuentes Campos ME, Contreras-López E, Gómez S, Muñoz Jáuregui AM. Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de la cáscara de sanky (*Corryocactus brevistylus*). *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 2018;85(2):258–67.

20. Natusfera. Ministerio Español de Ciencia e Innovación. 2020. *Corryocactus brevistylus*. Available from: <https://spain.inaturalist.org/taxa/438379-Corryocactus-brevistylus>
21. Málaga Villanueva C, Rodríguez Coaguila M. “Proceso para la obtención de un néctar funcional a partir de sanky (*Corryocactus brevistylus*) maracuyá (*Passiflora edulis*), y agua mineral procedente de la Yura.” 2014;121.
22. Paul MA, Emiliós Patsalides P, McDonald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*. 2002;127:183–98.
23. Kumar S, Chaitanya RK, Preedy V. Assessment of Antioxidant Potential of Dietary Components. *HIV/AIDS*. 2018;239–53.
24. Munteanu IG, Apetrei C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *Int J Mol Sci*. 2021;22(7).
25. Gobierno del Perú. Decreto legislativo que aprueba la ley de inocuidad de los alimentos. Lima; 2008.
26. Peng Z, Gan X, Liu J, Xin B, Zhong C. Utilizing the SacB-mediated gene editing system in *Komagataeibacter xylinus* to explore the function of bacterial cellulose synthase. *J Biotechnol*. 2025 Nov;407:48–58.
27. Díaz-Silva V. Nueva bebida análoga a la kombucha hecha de molle, matico y cedron: perfiles bioactivo y sensorial. Tesis para optar título profesional de ingeniera agroindustrial. Trujillo: Universidad Privada del Norte; 2020.
28. Pachas JC. Contenido de Polifenoles totales y capacidad antioxidante en cervezas artesanales e industriales . *Peruvian Agricultural Research* [Internet]. 2019 [cited 2026 Mar 9];1(1):27–30. Available from: <https://revistas.unjfsc.edu.pe/index.php/PeruvianAgriculturalResearch/article/view/480/455>
29. Surco-Laos F, Ayquipa Paucar H, Quispe Gamboa W, García Ceccarelli J. Determinación de polifenoles totales y actividad antioxidante de extracto de semillas de uvas residuos de la producción de piscos. *Rev Soc Quím Perú* 86(2). 2020;2(82).

30. Contreras López E, Muñoz AM, Fernández Jerí Y, Anaya-Meléndez F. Actividad antioxidante, compuestos fenólicos y evaluación sensorial de formulaciones para infusión a base de cáscara de sanky (*Corryocactus brevistylus*) y canela (*Cinnamomum verum*). *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 2022;88(1):13–24.
31. Morales M. Estandarización del proceso de fermentación y evaluación sensorial de una bebida tipo kombucha utilizando infusiones herbales. Tesis para optar el grado de maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. México: Universidad Autónoma de Querétaro; 2021.
32. Villamar Mota MA. Evaluación de la capacidad antioxidante y conteo de probióticos de una bebida kombucha (*Manchurian fungus*) elaborada con Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*). Tesis para optar título profesional en Ingeniería Agrícola. Guayaquil: Universidad Agraria del Ecuador; 2021.
33. Morán Sevillano KJ, Quimis Latorre DG. Evaluación de las propiedades físico-químicas y actividad antioxidante de una bebida fermentada a base de kombucha y extracto de hoja de banano. Tesis para optar título profesional en Ingeniería Química. Guayaquil: Universidad de Guayaquil; 2022.
34. Morales Moreira AF. Aplicación de mucílago de cacao como fuente de azúcares en el proceso fermentativo del scoby (*Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast*) para obtener una bebida fermentada. Tesis para optar título de Ingeniero Agroindustrial. Quevedo: Universidad Técnica Estatal de Quevedo; 2022.
35. Lee YJ, Kang HJ, Yi SH, Jung YH. Antioxidant Properties of Kombucha Made with Tartary Buckwheat Tea and Burdock Tea. *Prev Nutr Food Sci*. 2023 Sep 30;28(3):347–52.
36. ElNaker NA, Daou M, Ochsenkühn MA, Amin SA, Yousef AF, Yousef LF. A metabolomics approach to evaluate the effect of lyophilization versus oven drying on the chemical composition of plant extracts. *Sci Rep*. 2021 Nov 22;11(1):22679.
37. Lorenz G. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem* [Internet]. 1959 [cited 2025 Jan 15];31(3):426–8. Available from:
<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=r>

ja&uact=8&ved=2ahUKEwivr6XIsPGKAxV8IbkGHc8CLYUQFnoECCUQAQ
&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Fprofile%2FWj_Colonna%2Fpost%2FDetermination_of_alpha-Amylase_activity%2Fattachment%2F5b60660d4cde265cb652d86c%2FAS%253A654449118830592%25401533044237158%2Fdownload%2FDinitrosalicylic%2BAcid%2BMethod%2Bfor%2BReducing%2BSugar%2B7-31-18.pdf&usg=AOvVaw1gm-CZ8bek5P9RU_WKATse&opi=89978449

38. Tena M, Jorrín J. Extracción y ensayo de la actividad invertasa de levadura de panadería [Internet] [Tesis de grado]. Universidad de Córdoba; 2008 [cited 2025 Jan 15]. Available from: <https://www.virtualpro.co/biblioteca/extraccion-y-ensayo-de-la-actividad-invertasa-de-levadura-de-panaderia>
39. Routh J, Eyman D, Burton D. Compendio Esencial de Química General, Orgánica y Bioquímica, tomos I y II. Segunda. Bogotá, Colombia: Editorial Reverté; 1990. 78–81 p.
40. Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem*. 1959 Mar 1;31(3):426–8.
41. López A. Estandarización química de una bebida fermentada de Kombucha a base de té verde, té de limón y e infusión hojas de guayaba. *Revista de Investigación Académica Sin Frontera: División de Ciencias Económicas y Sociales*. 2022 Dec 14;(38).
42. AOAC. Association of Official Analytical Chemistry. 18th ed. Gaithersburg, MD : AOAC International; 2005.
43. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. *Assoc Off Anal Chem Int*. 1999;2–66.
44. Moreno BL, Deaquiz Oyola YA. Caracterización de parámetros fisicoquímicos en frutos de mora (*Rubus alpinus* Macfad). *Acta Agron*. 2015 Dec 29;65(2):130–6.
45. Pastor C, Gonzáles C. Determinación de los sólidos solubles de un alimento con un alto y un bajo contenido en agua. 2012.

46. Pires J, Torres P, dos Santos D, Chow F. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo [Internet]. 2017 [cited 2025 Jan 15]; Available from: https://www.researchgate.net/publication/324452827_Ensaio_em_microplaca_d_o_potencial_antioxidante_atraves_do_metodo_de_sequestro_do_radical_livre_DPPH_para_extratos_de_algas
47. Salazar Garcés EC, Sailema Ortiz ML, Palacios Duchicela RH, Carrera Borja WX, Zambrano Mendoza CA. Efecto de solvente y temperatura para la extracción de compuestos fenólicos en hojas de fresa. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*. 2023 Jun 16;7(3):2563–75.
48. Santos J, Torres P, Santos Déborah. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas January 2017. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 2017;
49. Limaymanta J, Retuerto MG, Tarazona JP, Cosquillo MF, Villafuerte U, Ramos E. CARACTERIZACIÓN FÍSICO – QUÍMICA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE LOS FRUTOS DE CAESALPINIA SPINOSA (MOLINA) KUNTZE “TARA.” *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 2023 Sep 30;89(04):25–38.
50. C Moreira D. ABTS decolorization assay – in vitro antioxidant capacity v1. 2019.
51. Urbano C. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES EN PRODUCTOS ELABORADOS CON TÉ VERDE POR MÉTODO COLORIMÉTRICO FOLIN CIOCALTEU. [Internet] [Tesis de grado]. UNIVERSIDAD ICESI; 2016 [cited 2025 Jan 15]. Available from: <https://repository.icesi.edu.co/server/api/core/bitstreams/5f9b8cf2-8d24-7785-e053-2cc003c84dc5/content>
52. Marsh AJ, O’Sullivan O, Hill C, Ross RP, Cotter PD. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiol*. 2014 Apr;38:171–8.

53. Caramuti V, Ruiz M, Gallace M, Dalmasso L. MICROSCOPIA PARA LABORATORIOS CERVECEROS. 2019.
54. Kurtzman C, Fell J, Boekhout T. The Yeasts, a Taxonomic Study [Internet]. 5th ed. Vol. 1. 2011 [cited 2025 Jan 15]. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Alaa-Niamah/post/How_much_sugar_needed_to_add_to_media_for_screening_osmotolerant_yeast/attachment/6071d12c220bc500014fd7b7/AS%3A1011080784531466%401618071852682/download/Brewing+yeast+and+fer+%282%29.pdf
55. Montes J. Caracterización molecular de bacterias con actividad L-asparaginasa aisladas de las Salinas de Pilluana, Maras y Chilca [Internet] [Tesis de grado]. [Lima]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos ; 2018 [cited 2025 Jan 9]. Available from: <https://core.ac.uk/download/pdf/323346779.pdf>
56. VEGAS C, ZAVALA AI, CANALES PE, ESTEVE-ZARZOSO B. Yeasts Associated with Various Amazonian Native Fruits. Pol J Microbiol. 2020 Sep 1;69(3):251–61.
57. Ndoye B, Lebecque S, Dubois-Dauphin R, Tounkara L, Guiro AT, Kere C, et al. Thermoresistant properties of acetic acids bacteria isolated from tropical products of Sub-Saharan Africa and destined to industrial vinegar. Enzyme Microb Technol [Internet]. 2006 Aug [cited 2025 Jan 15];39(4):916–23. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141022906000421>
58. Ramos B, Bucio A, Bautista C, Arabda E, Izquierdo F. Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso crema tropical. Universidad y Ciencia [Internet]. 2009 [cited 2025 Jan 27];25(2):159–71. Available from: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0186-29792009000200006&script=sci_abstract&tlng=pt
59. Salazar L. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE THEOBROMA CACAO L. DE LA VARIEDAD “CHUNCHO” OBTENIDA EN CUZCO, PERÚ [Internet] [Tesis de grado]. [Lima]: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2017 [cited 2025 Jan 15]. Available from:

https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/1436/Aislamiento_SalazarAlvarez_Lilian.pdf?sequence=1

60. ZYMO RESEARCH. Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit [Internet]. 2024 [cited 2025 Jan 15]. Available from: <https://zymoresearch.eu/products/quick-dna-fungal-bacterial-miniprep-kit?srsId=AfmBOoo-YcGUy2EyZFUlQ84B-P14fMMfdGaBYCHbjI2o2ppzzKFqJsed>
61. Rodas AM, Ferrer S, Pardo I. 16S-ARDRA, a Tool for Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Grape Must and Wine. *Syst Appl Microbiol*. 2003;26(3):412–22.
62. Edwards U, Rogall T, Blöcker H, Emde M, Böttger EC. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res*. 1989;17(19):7843–53.
63. Maciuca OM, Sánchez-Juanes F, Menéndez E. Aislamiento e identificación de microorganismos presentes en bebidas probióticas: el caso de la kombucha. *FarmaJournal*. 2022 Nov 25;7(2):29–39.
64. Martínez Á, Correa A. PRODUCCIÓN DE BIOMATERIAL ELABORADO CON SCOBY DE KOMBUCHA CASERO [Internet] [Tesis de grado]. [Medellín]: UNIVERSIDAD EAFIT; 2023 [cited 2025 Jan 27]. Available from: <https://repository.eafit.edu.co/server/api/core/bitstreams/638a4a84-84c7-4c55-aa68-803c91438d1a/content>
65. Yonas V, Harouna DV, Roger DD, Bruno FY, Daoudou B. Characterization of Yeast Species Isolated from Grapefruit and their Potentials in Local Wine Production. *J Pure Appl Microbiol*. 2025 Jun 1;19(2):1204–24.
66. Chavez CM, Groenewald M, Hulfachor AB, Kpurubu G, Huerta R, Hittinger CT, et al. The cell morphological diversity of *Saccharomycotina* yeasts. *FEMS Yeast Res* [Internet]. 2024 Jan 9 [cited 2026 May 31];24. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/femsyr/foad055>
67. Ferrer S, Mañes-Lázaro R, Benavent-Gil Y, Yépez A, Pardo I. *Acetobacter musti* sp. nov., isolated from bobal grape must. *Int J Syst Evol Microbiol* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2026 May 31];66(2):957–61. Available from:

<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.000818;jsessionid=-pwo4-DAIOJtWillbKuBifytLIacWC98SG702mEt.mbslive-10-240-10-70>

68. Guzmán M. Resistencia de microorganismos aislados de kombucha a condiciones del tracto gastrointestinal in vitro [Internet] [Tesis de maestría]. [Guadalajara]: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.; 2021 [cited 2025 Feb 7]. Available from: <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/766/1/M%C3%B3nica%20Aidee%20Guzm%C3%A1n%20Ortiz.pdf>
69. Trček J, Jernejc K, Matsushita K. The highly tolerant acetic acid bacterium *Gluconacetobacter europaeus* adapts to the presence of acetic acid by changes in lipid composition, morphological properties and PQQ-dependent ADH expression. *Extremophiles* [Internet]. 2007 Jul [cited 2026 May 31];11(4):627–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17487444/>
70. Lindsay MA, Granucci N, Greenwood DR, Villas-Boas SG. Fermentative Production of Volatile Metabolites Using *Brettanomyces bruxellensis* from Fruit and Vegetable By-Products. *Fermentation*. 2022 Sep 12;8(9):457.
71. Tu C, Hu W, Tang S, Meng L, Huang Z, Xu X, et al. Isolation and identification of *Starmerella davenportii* strain Do18 and its application in black tea beverage fermentation. *Food Science and Human Wellness*. 2020 Dec;9(4):355–62.
72. Nolasco D, Guevara A. Estudio de las principales características fisicoquímicas y comportamiento del Sanqui (*Corryocactus brevistylus* subsp. *puquiensis* (Rauh & Backeberg) Ostolaza) en almacenamiento. *Anales científicos UNALM*. 2009;70(1):1–8.
73. Jakubczyk K, Gutowska I, Antoniewicz J, Janda K. Evaluation of Fluoride and Selected Chemical Parameters in Kombucha Derived from White, Green, Black and Red Tea. *Biol Trace Elem Res*. 2021 Sep 8;199(9):3547–52.
74. Villarreal-Soto SA, Beaufort S, Bouajila J, Souchard J, Taillandier P. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *J Food Sci*. 2018 Mar 6;83(3):580–8.

75. Wang B, Rutherford-Markwick K, Zhang XX, Mutukumira AN. Kombucha: Production and Microbiological Research †. Foods [Internet]. 2022 Nov 1 [cited 2026 May 31];11(21):3456. Available from: <https://www.mdpi.com/2304-8158/11/21/3456/htm>
76. Barbosa CD, Trovatti Uetanabaro AP, Rodrigues Santos WC, Caetano RG, Albano H, Kato R, et al. Microbial–physicochemical integrated analysis of kombucha fermentation. LWT. 2021 Aug;148:111788.
77. Jayabalan R, Marimuthu S, Thangaraj P, Sathishkumar M, Binupriya AR, Swaminathan K, et al. Preservation of Kombucha Tea—Effect of Temperature on Tea Components and Free Radical Scavenging Properties. J Agric Food Chem. 2008 Oct 8;56(19):9064–71.
78. Li B, Wang X, Wang P. Microorganisms and bacterial cellulose stability of Kombucha under different manufacture and storage conditions. J Food Sci. 2024 May 9;89(5):2921–32.
79. Robles V. Determinación De Parámetros De Fermentación Para La Producción De Kombucha Utilizando Una Población Mixta De Microorganismos Denominado Fermento De Té. Tesis para optar título profesional de ingeniero agroindustrial. Abancay: Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac; 2011.
80. Ruiz L, Mendoza L, Van C, Pescuma M, Mozzi F. Fermentación de jugos y bebidas a base de frutas. In: Alimentos fermentados: microbiología, nutrición, salud y cultura [Internet]. Instituto Danone; 2020 [cited 2025 Feb 7]. p. 273–96. Available from: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/120385>
81. Areche C, Hernandez M, Cano T, Ticona J, Cortes C, Simirgiotis M, et al. *Corryocactus brevistylus* (K. Schum. ex Vaupel) Britton & Rose (Cactaceae): Antioxidant, Gastroprotective Effects, and Metabolomic Profiling by Ultrahigh-Pressure Liquid Chromatography and Electrospray High Resolution Orbitrap Tandem Mass Spectrometry. Front Pharmacol [Internet]. 2020 Apr 8 [cited 2026 May 31];11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32322203/>
82. Munteanu IG, Apetrei C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. Int J Mol Sci. 2021 Mar 25;22(7):3380.

83. Liang W, Wang X, Zhang L, Jiao S, Song H, Sun J, et al. Changes and biotransformation mechanism of main functional compounds during kombucha fermentation by the pure cultured tea fungus. Food Chem [Internet]. 2024 Nov 15 [cited 2026 May 31];458. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38943965/>
84. Rojas T, Fuentes Campos ME, Contreras-López E, Gómez S, Muñoz-Jáuregui AM. Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de la cáscara de sanky (*Corryocactus brevistylus*). Revista de la Sociedad Química del Perú [Internet]. 2016 [cited 2026 May 19];85(2). Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2019000200012

ANEXOS

Anexo 1. Materiales empleados en la elaboración de tesis

Tabla 39. Materiales, reactivos, equipos de análisis y procesos

Categoría	Nombre	Marca / Especificación
Reactivo	ABTS	MILIPORE
Reactivo	Acetato de sodio	AMRESCO
Reactivo	Ácido acético	MERCK
Reactivo	Ácido clorhídrico	MERCK
Reactivo	Ácido gálico	SIGMA ALDRICH
Reactivo	Agar-agar	OXOID
Reactivo	Azul de bromotimol	—
Reactivo	Carbonato de calcio	MERCK
Reactivo	Cicloheximida	CALBIOCHEM
Reactivo	Citrato de triamonio	MERCK
Reactivo	Cloruro de sodio	MERCK
Reactivo	Dextrosa	BD
Reactivo	DPPH	SIGMA ALDRICH
Reactivo	Etanol absoluto	MERCK
Reactivo	Extracto de carne	OXOID
Reactivo	Extracto de levadura	OXOID
Reactivo	Extracto de malta	MERCK
Reactivo	Fosfato de potasio dibásico	J.T BAKER
Reactivo	Fosfato de sodio monobásico	J.T BAKER
Reactivo	Fosfato monopotásico	MERCK
Reactivo	Glicerol	MERCK
Reactivo	Glucosa	MERCK
Reactivo	Hidróxido de sodio	MERCK
Reactivo	Manitol	SIGMA

Categoría	Nombre	Marca / Especificación
Reactivo	Metanol	MERCK
Reactivo	Peptona	BD
Reactivo	Rojo fenol	—
Reactivo	Stellarsan	—
Reactivo	Sulfato de magnesio	MERCK
Reactivo	Sulfato de manganeso	MERCK
Reactivo	Trimonio citrato	MERCK
Reactivo	Triptona	OXOID
Reactivo	TROLOX	SIGMA
Reactivo	Tween 80	—
Material de laboratorio	Agua destilada	—
Material de laboratorio	Asa de siembra	—
Material de laboratorio	Asa de siembra Drigalski	—
Material de laboratorio	Bisturí (N.º 10 y 11)	—
Material de laboratorio	Campana de Durham	—
Material de laboratorio	Cronómetro	—
Material de laboratorio	Matraces (25 y 100 ml)	—
Material de laboratorio	Micropipetas (10, 200 y 1000 µl)	—
Material de laboratorio	Microplacas	—
Material de laboratorio	Microtubos	—
Material de laboratorio	Pipetas	—
Material de laboratorio	Placas Petri	—
Material de laboratorio	Probetas (50, 250 y 500 ml)	—
Material de laboratorio	Termómetro	—
Material de laboratorio	Tubos Falcon	—
Material de laboratorio	Tubos de crioviales	—
Material de laboratorio	Tubos de ensayo	—

Categoría	Nombre	Marca / Especificación
Material de laboratorio	Varilla de vidrio	—
Equipo de análisis	Espectrofotómetro	EPPENDORF
Equipo de análisis	Lector multimodal de microplacas	TECAN
Equipo de análisis	Microscopio electrónico	OPTIKA
Equipo de análisis	pH metro	HANNA
Equipo de análisis	Potenciómetro	—
Equipo de análisis	Refractómetro óptico (0–32 °Brix, ATC)	PRECISSO
Equipo de análisis	Termociclador	APPLIED BIOSYSTEMS
Equipo de proceso	Autoclave	—
Equipo de proceso	Balanza analítica	EPPENDORF
Equipo de proceso	Centrífuga 5610R	EPPENDORF
Equipo de proceso	Cocinilla	—
Equipo de proceso	Incubadora	PRECISION
Equipo de proceso	SHAKER	PRECISION
Equipo de proceso	Sonicador	BRANSON
Equipo de proceso	Termoblock	LABNET
Equipo de proceso	Transiluminador	—

Anexo 2. Reporte de análisis del sanky (*Corryocactus brevistylus*)

Tabla 40. Análisis proximal del sanky (*Corryocactus brevistylus*)



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica

CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO – CCA

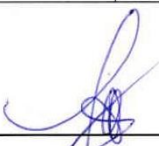
REPORTE DE ANÁLISIS N° 00301-CCA-2024

SOLICITADO POR*
DIRECCIÓN*
MUESTRA*
DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO RECEPCIONADO
VARIEDAD RECEPCIONADA*
PRINCIPIO ACTIVO*
NÚMERO DE LOTE*
CANTIDAD
ORDEN DE ANÁLISIS
FECHA DE RECEPCIÓN
FECHA DE FABRICACIÓN*
FECHA DE VENCIMIENTO*
EJECUCIÓN DEL ENSAYO
FECHA DE EMISIÓN

: NICOLE TORRES BUSCAGLIA
: AREQUIPA – CERRO COLORADO
: FRUTO FRESCO SANKY/ SANCAYO
: 03 unidades de Fruta Sanky, sin rotulado.
: -
: -
: -
: 03 unidades
: 0252-2024
: 19 de agosto del 2024
: -
: -
: Del 20 de agosto del 2024 al 03 de septiembre del 2024
: 04 de septiembre del 2024

N° CAS*: -

ANÁLISIS PROXIMAL			
ENSAYO	ESPECIFICACIONES	MÉTODO	RESULTADOS
HUMEDAD	-	AOAC Official Method 966.2	94.7 %
CENIZAS	-	AOAC Official Method 941.12	0.32 %
GRASAS	-	AOAC Official Method 930.09	0.00 %
PROTEÍNAS	-	AOAC Official Method 977.02	1.32 %
FIBRAS	-	AOAC Official Method 930.10	2.34 %
CARBOHIDRATOS	-	AOAC Official Method 931.02	1.32 %



Q.F. Paul Iván Gutiérrez Elescano
Director del Centro de Control Analítico





*Datos proporcionados por el cliente

Los resultados son válidos solo para la muestra ensayada.

*El presente código QR contiene el
único documento válido emitido.

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002, Jardín Botánico – Lima 1 – Perú Teléfonos: 619-7000 anexo 4824 - 982949135 – Lima 1
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

Anexo 3. Reporte de análisis del sanky (*Corryocactus brevistylus*) liofilizado

Tabla 41. Análisis proximal del sanky (*Corryocactus brevistylus*) liofilizado



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE ZOOTECNIA - DEPARTAMENTO ACADEMICO DE NUTRICION
LABORATORIO DE EVALUACION NUTRICIONAL DE ALIMENTOS
"Año de la recuperación y consolidación de la economía peruana"



INFORME DE ENSAYO LENA N° 0328/2025

SOLICITANTE : NICOL TORRES
NOMBRE DEL PRODUCTO : SANKY LIOFILIZADO
FECHA DE RECEPCION : 25/03/2025
IDENTIFICACION : AQ25-0328

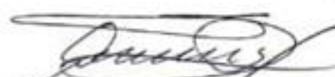
RESULTADOS DE ANALISIS

CODIGO	AQ25-0328
MUESTRA	SANKY LIOFILIZADO
a.- HUMEDAD, %	5.25
b.- PROTEINA TOTAL (N x 6.25), %	2.75
c.- EXTRACTO ETereo, %	4.05
d.- FIBRA CRUDA, %	3.16
e.- CENIZA, %	3.08
f.- EXTRACTO LIBRE DE NITRóGENO, %	81.71

Métodos utilizados:

- a.- Humedad: AOAC (2005), 950.46
- b.- Proteína total: AOAC (2005), 984.13
- c.- Extracto Etéreo: AOAC (2005), 2003.05
- d.- Fibra cruda: AOAC (2005), 962.09
- e.- Ceniza: AOAC (2005), 942.05

Atentamente,


Ph.D. Carlos Vilchez Perales
Jefe del Laboratorio de Evaluación
Nutricional de Alimentos

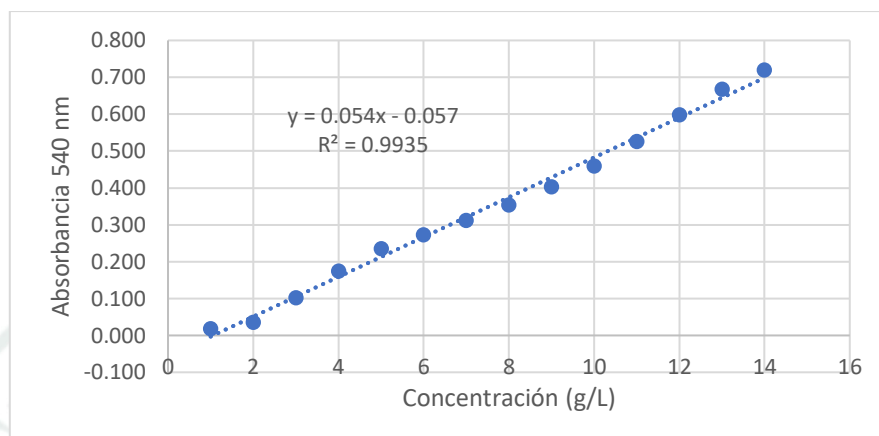


La Molina, 07 de Abril del 2025

Av. La Molina s/n Lima 12. E-mail: lana@lamolina.edu.pe
Teléfonos: 614-7800 Anexo: 266 / Directo 348-0830

Anexo 4. Curva de calibración de Azúcares reductores

Figura 31. Curva de calibración utilizando glucosa como estándar



Anexo 5. Valores de absorbancia obtenidos por espectrofotometría

Tabla 42. Datos de la curva de calibración para polifenoles totales.

Nº	Concentración (ppm)	Absorbancia a 765 nm					Abs Promedio	D.E
		1	2	3	4	5		
1	10	0.1540	0.1551	0.1562	0.1531	0.1525	0.1542	0.0015
2	20	0.2255	0.2297	0.2304	0.2262	0.2289	0.2281	0.0022
3	50	0.4612	0.4641	0.4652	0.4599	0.4603	0.4621	0.0024
4	80	0.6941	0.6851	0.6889	0.6910	0.6842	0.6887	0.0041
5	100	0.8631	0.8311	0.8503	0.8440	0.8572	0.8491	0.0124

Anexo 6. Valores de absorbancia para determinación de actividad antioxidante DPPH

Tabla 43. Datos de la curva de calibración para Trolox-DPPH.

Nº	Trolox (µg/mL)	Absorbancia a 765 nm					Absorbancia Control: 0.7163		D.E
		1	2	3	4	5	Abs Promedio	% Inhibición	
1	0	0.6980	0.7010	0.7000	0.7020	0.6990	0.7000	30.0979	0.0016
2	0.5	0.5750	0.5730	0.5760	0.5720	0.5740	0.5740	42.6802	0.0016
3	1	0.4170	0.4200	0.4190	0.4210	0.4180	0.4190	58.1586	0.0016
4	1.5	0.3100	0.3090	0.3120	0.3110	0.3080	0.3100	69.0433	0.0016
5	2	0.1550	0.1560	0.1570	0.1550	0.1560	0.1558	84.4418	0.0008

Anexo 7. Valores de absorbancia para determinación de actividad antioxidante ABTS

Tabla 44. Curva de calibración de Trolox -ABTS

N °	Trolox μL	umol/μ L	Absorbancia a 734 nm					Absorbancia Control: 0.7214		
			1	2	3	4	5	Abs Promedio	% Inhibición	D.E
			0.721	0.721	0.721	0.721	0.721			0.000
1	0.0000	0.0000	2	6	5	3	4	0.7214	0.0000	2
	25.000	31.213	0.682	0.672	0.677	0.677	0.678			0.003
2	0	8	8	6	3	5	0	0.6776	6.0660	6
	50.000	62.427	0.625	0.631	0.628	0.628	0.628			0.002
3	0	6	5	9	7	5	9	0.6287	12.8500	3
	75.000	93.641	0.606	0.594	0.600	0.600	0.600			0.004
4	0	4	1	9	2	6	7	0.6005	16.7591	0
	100.00	124.85	0.555	0.543	0.549	0.548	0.550			0.004
5	00	52	3	0	1	9	5	0.5494	23.8481	4
	125.00	156.06	0.497	0.494	0.495	0.495	0.495			0.001
6	00	90	3	1	6	8	7	0.4957	31.2864	1
	150.00	187.28	0.456	0.450	0.453	0.453	0.453			0.002
7	00	28	4	4	2	5	7	0.4534	37.1445	1
	200.00	249.71	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348			0.000
8	00	03	7	7	7	7	7	0.3487	51.6634	0
	250.00	312.13	0.261	0.261	0.261	0.261	0.261			0.000
9	00	79	6	6	6	6	6	0.2616	63.7372	0
1	300.00	374.56	0.163	0.155	0.158	0.160	0.159			0.002
0	00	55	1	9	5	3	2	0.1594	77.9041	6

Anexo 8. Secuencia de ADN NI16-44

NI16-44:

CTTTAAACTTTTATATTTGTTCTGAAACAATGAAAATTTAAACTTTCAACAACG
GATCTCTTGGTTCTCGTATCGATGAAAAACGCATCAAAGCGCGATAGGTAGTGCG
AATTGCAAACGTGAGTCATTGAATTTTGAACGCATATTGCGCTGTTAGTTTGTCT
AATATCATGCTTGTGAGTGATAATCTTCCT

Anexo 9. Resultados de identificación mediante algoritmo BLAST

Job Title: Nucleotide Sequence
RID: [SGB3BZ5B013](#) Search expires on 01-17 04:45 am [Download All](#) ▼
Program: BLASTN [Citation](#) ▼
Database: core_nt [See details](#) ▼
Query ID: IcllQuery_1190839
Description: None
Molecule type: dna
Query Length: 199
Other reports: [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) ?

Filter Results

Organism: only top 20 will appear ☐ exclude
Type common name, binomial, taxid or group name
[+ Add organism](#)

Percent Identity: to E value: to Query Coverage: to
[Filter](#) [Reset](#)

Sequences producing significant alignments Download ▼ Select columns ▼ Show 100 ▼ ?

☒ select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Starmerella bacillaris strain 7M-11 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and int...	Starmerella bacill...	335	335	100%	1e-87	96.98%	889	OK181155.1
☒	Starmerella bacillaris isolate B_62 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene, compl...	Starmerella bacill...	335	335	100%	1e-87	96.98%	413	KU950230.1
☒	Starmerella aff. zemliniana Cz10 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and inte...	Starmerella aff. z...	335	335	100%	1e-87	96.98%	399	KT933400.1

Anexo 10. Secuencia de ADN NI13-44

NI 13-53:

AGCGCAACGAATTGCGATACTTAATGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCAAG
TTCTTGAACGCACATTGGGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCAAGCCTGTTTGAGCG
TCATTTCCTTCTCACTATTTAGTGGTTATGAGATTACTCGAGGGTGGGGTTCGGTGA
AGAGCGCAACGAAATTCGTTAAGTAATTTGAATTTCTTCTTTTCTTGACTCTTTGA
ATT

Anexo 11. Resultados de identificación mediante algoritmo BLAST

Job Title

Nucleotide Sequence

RID

[S0J08A9G013](#)

Search expires on 01-11 05:04 am

[Download All](#)

Program

BLASTN [Citation](#)

Database

core_nt [See details](#)

Query ID

lcl|Query_4594955

Description

None

Molecule type

dna

Query Length

448

Other reports

[Distance tree of results](#)
[MSA viewer](#)

Filter Results

Organism

only top 20 will appear

☐ exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity

to

E value

to

Query Coverage

to

Filter

Reset

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

Sequences producing significant alignments

Download

Select columns

Show 100

☒ select all

100 sequences selected

[GenBank](#)
[Graphics](#)
[Distance tree of results](#)
[MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Dekkera bruxellensis voucher Bb_Tou_Fr1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, int...	Brettanomyces...	261	261	35%	7e-65	96.79%	449	JQ327829.1
☒	Brettanomyces bruxellensis isolate 27 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequenc...	Brettanomyces...	261	261	35%	7e-65	96.79%	450	MT734875.1
☒	Brettanomyces bruxellensis voucher ILUVV-VAMIS-W18.1O small subunit ribosomal RNA...	Brettanomyces...	261	261	35%	7e-65	96.79%	389	MH252557.1

Anexo 12. Secuenciación de ADN NII12-43

NII12-43:

AGCGAAGGCTGGCGGCATGCTTAACACATGCAAGTCGCACGAACCTTTCGGGGT
GAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGGATCTATCCACGGGTGGGGGATAAC
TTTGGGAAACTGAAGCTAATACCGCATGACACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTC
GTCTGTGGAGTAACCTGCGTTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAA
GGCGATGATCGATAGCTGG

Anexo 13. Resultados de identificación mediante algoritmo BLAST

Job Title

Nucleotide Sequence

RID

[8TFPZWK3015](#)

Search expires on 08-02 21:19 pm

[Download All](#)

Program

BLASTN [Citation](#)

Database

core_nt [See details](#)

Query ID

lcl|Query_3787985

Description

None

Molecule type

dna

Query Length

236

Other reports

[Distance tree of results](#)
[MSA viewer](#)

Filter Results

Organism

only top 20 will appear

☐ exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity

to

E value

to

Query Coverage

to

Filter

Reset

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

Sequences producing significant alignments

Download

Select columns

Show 100

☒ select all

100 sequences selected

[GenBank](#)
[Graphics](#)
[Distance tree of results](#)
[MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Komagataeibacter oboediens strain NCIB 8034 chromosome, complete genome	Komagataeibacter oboediens	414	2073	100%	2e-111	98.31%	3495026	CP117861.1
☒	Komagataeibacter oboediens strain BPZTR01 chromosome, complete genome	Komagataeibacter oboediens	414	2073	100%	2e-111	98.31%	2642352	CP043481.1
☒	Komagataeibacter intermedius strain SLAM-NK6B chromosome, complete genome	Komagataeibacter intermedius	414	2073	100%	2e-111	98.31%	3610659	CP185240.1

Anexo 14. Secuenciación de ADN NII12-44

NII12-44:

TCTCGCATACA ACTGCAAAAGAATGGCACGGCTTCAGGCAGCATAAGCCGGGTC
AGCCTCGGCGTTATCAGCCGCAAAATGCCAGCCCCGAAGGCTGCTAGAGCAGAT
CCAGTTTGAATGGACACGTTTCGAACTGGTGAA

Anexo 15. Resultados de identificación mediante algoritmo BLAST

Job TitleNucleotide Sequence

RID8TRGGP2Y015Search expires on 08-02 23:32 pmDownload All

ProgramBLASTN Citation

Databasecore_ntSee details

Query IDlcllQuery_113575

DescriptionNone

Molecule typedna

Query Length140

Other reportsDistance tree of resultsMSA viewer

Filter Results

Organismonly top 20 will appearexclude

Type common name, binomial, taxid or group name

+ Add organism

Percent IdentityE valueQuery Coverage

to to to

FilterReset

DescriptionsGraphic SummaryAlignmentsTaxonomy

Sequences producing significant alignmentsDownloadSelect columnsShow100

☒ select all30 sequences selected

GenBankGraphicsDistance tree of resultsMSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒ Komagataeibacter xylinus strain DSM 2325 chromosome	Komagataeibacter xyli...	231	2869	100%	1e-56	96.85%	3353346	CP025269.1
☒ Komagataeibacter nataicola strain FWP-2023 chromosome complete genome	Komagataeibacter nata...	187	4172	95%	3e-43	96.49%	3533141	CP134885.1
☒ Komagataeibacter nataicola strain RZS01 complete sequence	Komagataeibacter nata...	187	7394	95%	3e-43	96.49%	3485191	CP019875.1