

**Maria Estefania Romeu Pagès**

**Producció de una beguda semblant a la  
Kombutxa a partir de  
brisa de raïm blanc: avaluació de la seva  
capacitat antioxidant**

**TREBALL DE FI GRAU**

**dirigit per la Dra. Carmen Portillo Guisado**

**Grau de Nutrició Humana i Dietètica**



**UNIVERSITAT ROVIRA i VIRGILI**  
**Facultat de Medicina**  
**i Ciències de la Salut**

**Reus**

**2024**

## ÍNDEX

<b>RESUM</b> .....	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>ABREVIACIONS</b> .....	<b>6</b>
<b>1. Introducció</b> .....	<b>7</b>
1.1. La Kombutxa.....	7
1.2. Els residus sòlids del raïm.....	8
1.3. Antioxidants i beneficis per la salut.....	9
1.4. Aplicacions de la brisa en la indústria alimentaria.....	11
1.5. Beneficis de la kombutxa per a la salut.....	11
<b>2. Hipòtesis i objectius</b> .....	<b>12</b>
<b>3. Material i mètodes</b> .....	<b>13</b>
3.1. Mostres i matèries primeres de fermentació.....	13
3.2. Preparació i fermentació de les kombutxes.....	13
3.3. Enumeració i aïllament de BAL, BAA i llevats.....	16
3.4. Identificació molecular dels microorganismes.....	17
3.5. Determinació química.....	19
<b>3.5.1. Densitat de les kombutxes</b> .....	<b>19</b>
<b>3.5.2. pH i acidesa total</b> .....	<b>19</b>
<b>3.5.3. Principals metabòlits de la kombutxa</b> .....	<b>19</b>
3.5.4. Determinació de la concentració fenòlica total.....	19
3.5.5. Determinació de l'activitat antioxidant.....	19
3.6. Anàlisi sensorial.....	20
3.7. Anàlisi estadístic.....	21
<b>4. Resultats</b> .....	<b>21</b>
4.1. Recompte i morfologia de Bacteris i llevats.....	22
4.2. Identificació molecular.....	24
4.3. Composició química de les begudes fermentades de Kombucha.....	26
4.3.1. La densitat i la fermentació.....	26
4.3.2. pH i Acidesa Total.....	26
4.3.3. Principals metabòlits.....	27
4.3.4. Determinació de la concentració fenòlica total.....	29
4.3.5. Activitat antioxidant.....	29
4.5. Anàlisi sensorial.....	30
4.6. Anàlisi estadística.....	30
<b>5. Conclusions</b> .....	<b>31</b>
<b>6. Agraïments</b> .....	<b>32</b>
<b>7. Annexos</b> .....	<b>33</b>
<b>8. Bibliografia</b> .....	<b>37</b>

## ÍNDIX FIGURES

*Figura 1. Propietats nutricionals del raïm.*

*Figura 2. Beneficis del raïm per a la salut.*

*Figura 3. Producció de les kombutxes de l'experiment dos i Biofilm.*

*Figura 4. Procés de producció de les kombutxes per duplicat, experiment dos.*

*Figura 5. Inici de la fermentació de les kombutxes.*

*Figura 6. Població microbiològica de la kombutxa líquida.*

*Figura 7. Comptatge Càmara Neubauer*

*Figura 8. Medis per a la sembra de microorganismes.*

*Figura 9. Preparació de les PCR*

*Figura 10. Mostres de cultius emmagatzemades (part superior llevats i inferior bactèries)*

*Figura 11. Tast de les tres kombutxes en copes fosques*

*Figura 12. Resultats d'exemple de PCR*

*Figura 13. Patrons de la densitat durant la fermentació de Kombutxa en els diferents substrats*

*Figura 14. pH de les Kombutxes durant els 14 dies de fermentació*

*Figura 15. Acidesa total de les Kombutxes durant la fermentació.*

*Figura 16. Increment d'antocians durant la fermentació.*

*Figura 17. Capacitat antioxidant dels tres Kombutxa.*

*Figura 18. Atributs organolèptics de les tres kombutxa analitzats en anàlisi sensorial descriptiva.*

## ÍNDIX TAULES

*Taula 1. Resum de bactèries en GYC i MRS, llevats en YPD i WLN de cada kombutxa*

*Taula 2. Morfologia i nombre de bactèries i llevats.*

*Taula 3. Resultat de la seqüenciació de les colònies.*

*Taula 4. Resultats dels principals metabòlits existents.*

*Taula 5. Resultats dels Compostos fenòlics*

## RESUM

El consum de begudes fermentades com la kombutxa està augmentant notòriament des dels últims anys i s'estan proposant matèries primeres diferents a les tradicionals de te com una alternativa d'aprofitament de subproductes amb interessants propietats funcionals. L'objectiu d'aquest estudi va ser obtenir kombutxa amb alta activitat antioxidant utilitzant la brisa del raïm (pells, llavors i tiges) en lloc de les fulles de te; al mateix temps, es van elaborar també kombutxa de te verd i de te negre per poder comparar resultats. Encara que es van trobar els mateixos microorganismes en els tres kombutxes, es van poder observar diferències en l'abundància d'aquests. Els microorganismes més nombrosos van ser els bacteris àcid acètiques (BAA) *Komagataeibacter intermedius* i el llevats *Brettanomyces Bruxellensis*, tot i que *Oenococcus Oenii* es va detectar també com les bacteries àcid làctiques (BAL) més abundants. Es va determinar la composició química dels tres kombutxes (verd, negre i raïm): densitat, pH, acidesa, compostos fenòlics i activitat antioxidant durant la fermentació. Els resultats de pH van mostrar un rang segur de 2,5 a 2,9. El contingut de sucres reductors inicials de raïm que eren més elevats que els del te, van ser molt similars en les tres begudes finals, a més, la kombutxa de raïm va resultar amb menor quantitat de sucrosa. El contingut d'àcids fenòlics en la beguda de raïm va ser molt baix en comparació a les begudes de te, el que s'esperava degut a que les varietats blanques del fruit no són tan riques en aquests compostos com la varietats vermelles. La capacitat antioxidant de la kombutxa de te verd i negre va resultar pràcticament la mateixa abans i després de fermentar, en canvi, la del kombutxa de raïm, va experimentar un augment d'inhibició dels radicals lliures de 60% a 92%. Els resultats van mostrar que la brisa de raïm podria utilitzar-se per obtenir begudes de kombutxa alternatives amb alt poder funcional de gran utilitat en el camp de la Nutrició i la salut com a nutricèutic, així com un valor afegit degut a l'aprofitament d'un subproducte tant comú i nombrós en les nostres terres.

**Paraules clau:** Kombutxa, brisa, capacitat antioxidant, fermentació, beneficis per la salut.

## ABSTRACT

The consumption of fermented beverages such as kombucha has increased significantly in recent years and raw materials different from traditional tea are being proposed as an alternative to the use of by-products with interesting functional properties. The aim of this study was to obtain kombucha with high antioxidant activity using the grape (skins, seeds, and stems) instead of tea leaves; At the same time, green tea and black tea kombucha were also made in order to compare results. Although the same microorganisms were found in all three kombuchas, differences in their abundance could be observed. The most numerous microorganisms were the acetic acid bacteria (AAB) *Komagataeibacter intermedius* and the removed *Brettanomyces Bruxellensis*, although *Oenococcus Oenii* was also detected as the most abundant lactic acid bacteria (LAB). The chemical composition of the three kombuchas (green, black and grape) was determined: density, pH, acidity, phenolic compounds and antioxidant activity during fermentation. pH results showed a safe range of 2.5 to 2.9. The initial reducing sugar content of grapes, which were higher than those of tea, were similar moles in the final three beverages, and grape kombucha had a lower amount of sucrose. The phenolic acid content in the grape beverage was very low compared to the tea drinks, which was expected because the white varieties of the fruit are not as rich in these compounds as the red varieties. The antioxidant capacity of green and black tea kombucha was practically the same before and after fermentation, while that of grape kombucha experienced an increase in free radical inhibition from 60% to 92%. The results showed that the grape breeze could be used to obtain alternative kombucha drinks with high functional power of great utility in the field of Nutrition and health as a nutraceutical, as well as an added value due to the use of a common and numerous by-product in our lands.

**Key words:** Kombucha, grape, antioxidant capacity, fermentation, Health Benefits.

## ABREVIACIONS

Scoby	Symbiotic Consortium of Bacteria and Yeasts
BAL (LAB)	Bactèria àcid làctica (Lactic Acid Bacteria)
BAA (AAB)	Bacteris àcid acètiques (Acetic Acid Bacteria)
AT (TA)	Acidesa total (Total Acidity)
MRS	Man, Rogosa i Sharpe
GYC	Yeast-glucose-cloranfenicol
YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose
WLN	Wallerstein Laboratory Nutrient
PCR	Polymerase chain reaction
Ufc	Unitats formadores de colònies
ITS	Internal transcribed spacer
dNTPs	Desoxirribonucleòsids trifosfat
PAN	Primary Amino Nitrogen
IC50	Half maximal inhibitory concentration

# 1. Introducció

## 1.1. La Kombutxa

El consum de begudes fermentades sempre ha format part en moltes cultures des de fa milers d'anys. La kombutxa en concret, ha experimentat un gran interès en la última dècada. Aquesta beguda està vinculada al Nord-est de la Xina des de fa més de 2200 anys. Aquest producte és una beguda funcional baixa o sense alcohol, lleugerament àcida i carbonatada.

Es prepara de manera tradicional amb fulles de te verd i negre a les que se'ls afegeix sucre i Scoby (cultiu simbiòtic de bacteris i llevats), són microorganismes probiòtics format per una barreja de bacteris i llevats: bacteris àcid làctic (BAL) com *Lactobacillus spp.* i *Oenococcus spp.*, bacteries àcid acètics (BAA) com *Komagataeibacter spp.*, *Acetobacter spp.* i *Gluconobacter spp.*, i un ampli ventall de llevats: *Saccharomyces spp.* i *Brettanomyces spp.* (Gaggia et al., 2019).

La kombutxa ha estat reconeguda pels seus beneficis per a la salut degut al seu contingut ric en diversos metabòlits beneficiosos per la salut, que no solament s'alliberen de la matèria primera sinó que també es generen durant la fermentació, parlem de polifenols, àcids orgànics, vitamines i minerals, enzims, proteïnes i una alta concentració d'antioxidants. Per obtenir un perfil nutricional, compostos bioactius i característiques organolèptiques més interessants, es considera un temps de fermentació de 7 a 10 dies (Morales et al., 2023) sent *Brettanomyces Bruxellensis* el principal i més important llevat que participa en la fermentació (Villarreal-Soto et al. 2020). Un major temps de fermentació ajuda a augmentar les quantitats de compostos bioactius que son tan beneficiosos per la salut, com els polifenols; vitamina B i C; i minerals essencials com Ferro, Manganès, Zinc i Coure (Bortolomedi et al., 2022). De fet, els compostos de fenol i flavonoides disminueixen al començament de la fermentació i van augmentant durant aquesta [ 16 ]. No obstant això, amb major dies de fermentació, també augmenta la producció d'àcids orgànics per part de SCOBY. Per tant, és necessari garantir la seguretat del consumidor. La literatura també destaca l'alt potencial antioxidant de la Kombutxa (Chakravorty et al., 2016 ). Aquesta propietat antioxidant depèn de tres factors importants: el tipus i composició de la infusió, el SCOBY i el procés de fermentació. Per exemple, el te verd present en aquesta beguda fermentada, destaca per les seves importants propietats antioxidants, però el procés de fermentació pot induir a un augment en el potencial antioxidant (Chakravorty et al., 2016), de fet, el temps de fermentació influeix en l'augment i el contingut d'aquests compostos polifenols.

Tot i això, en els darrers anys, s'ha proposat diferents substrats com cereals, herbes, algues i fruites variades i poder elaborar kombutxes divergents al tradicionals de fulles de te (Teixeira et al., 2023). Fins a la data s'han provat una gran varietat de fruites, entre ells el raïm (Ayed et al., 2017); aquests substituïts del te aporten composicions químiques i característiques sensorials diferents, s'ha demostrat un alt poder antioxidant en la majoria dels assajos (Martins et al., 2016); tot això, suposa noves propietats funcionals per investigar dins del camp de la Nutrició i la salut. Per aprofundir en aquest argument, alguns assajos han estudiat minuciosament els antioxidants dietètics que s'han sotmès a procediments amb matèries vegetals per obtenir-ne informació a propòsit de les seves composicions (Morales et al., 2023), però tot i així, existeixen controvèrsies en els resultats i falta més recerca per unificar-los en una direcció.

## 1.2. Els residus sòlids del raïm

El raïm (*vitis spp.*) és una de les fruites consumides més valorades mundialment. Existeix una gran industrialització entorn a ell; es produeixen 50 milions de tones en tot el món, només una quarta part del total és pel consum directe, les altres  $\frac{3}{4}$  parts s'utilitzen per la producció de vi, el que suposen moltes tones de residus sòlids, és el diuen la brisa, formada per les pells, les llavors i les tiges, que s'estima un 20% de la producció total del fruit.

La pell i la llavor es consideren una bona font de compostos fenòlics, antocians i flavonoides, així com de fibra dietètica, compostos lipòfils i vitamines i minerals (Chen i Macedo, 2016) (Fig. 1). Actualment, existeix un augment d'interès sobre la diversitat de compostos polifenòls degut als seus beneficis en la salut, de la mateixa manera, succeeix amb l'aprofitament i utilització de subproductes, tant en el camp de la Nutrició com en la indústria alimentària, ambdós estretament relacionats i que ha impulsat a la investigació de noves tecnologies d'ús sostenible i ambiental. Addicionalment, cal remarcar, que el sector vitivinícola representa el 16% del PIB associat a la indústria agroalimentària a tot l'Estat, segons dades del 2020. La producció de vi catalana representa un 8,38% de la producció de vi nacional encara que Catalunya està a la capçalera de l'exportació de vi a nivell estatal. De fet, la indústria vitivinícola a Catalunya, amb un volum de negoci anual proper als 1.200 M€ a l'any, representa el tercer sector agroalimentari al país.

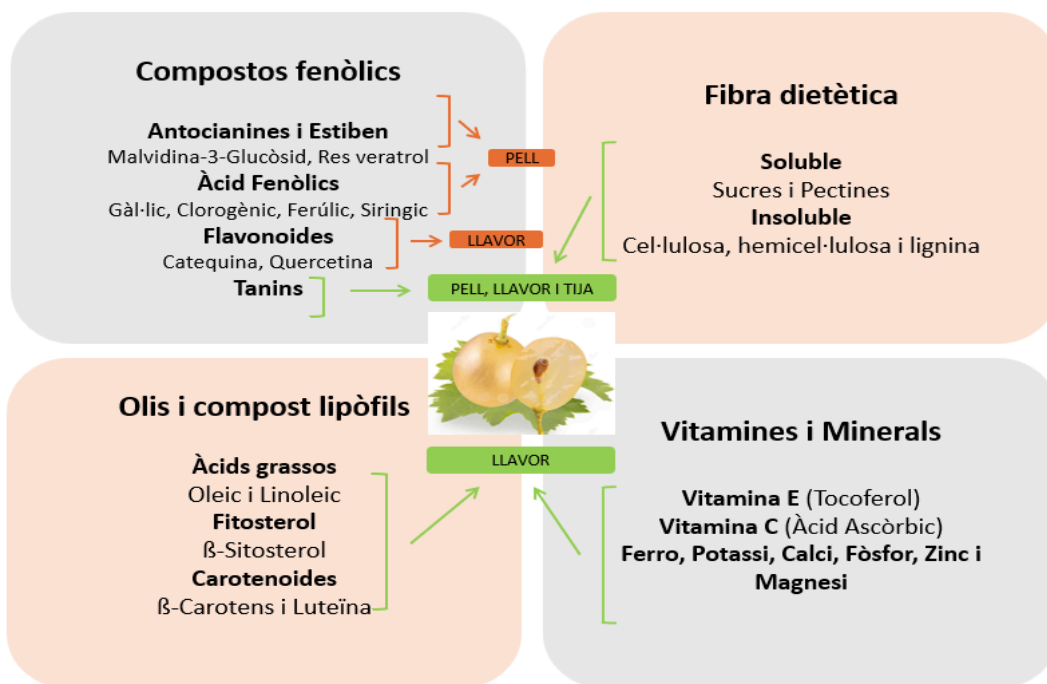


Fig. 1. Propietats nutricionals del raïm

### 1.3. Antioxidants i beneficis per la salut

El raïm i per tant, els residus del fruit, professen múltiples beneficis per la salut com hem mencionat, són els efectes antioxidants, antiinflamatoris, antidiabètics, moduladors de la microbiota intestinal, ant obesitat, cardí protectors i fins i tot ant cancerígens (Fig. 2)

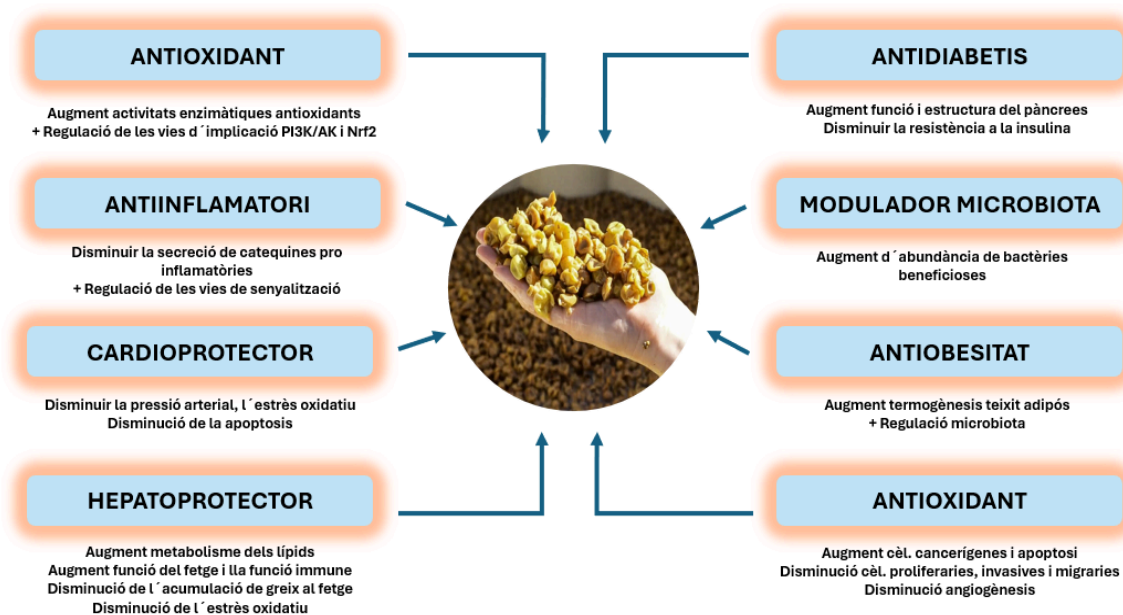


Fig. 2. Beneficis del raïm per a la salut.

L'alimentació és un dels pilars fonamentals de la salut. Introduir noves línies de producció sostenible és molt important per a oferir dietes saludables i sostenibles i nous productes per a tots amb la finalitat de millorar les seves vides i el planeta (FAO). Un altre aspecte significatiu, és l'adopció d'una dieta més saludable basada en productes més beneficiosos, fonamental per a reduir la mortalitat i la morbiditat i millorar la qualitat de vida. D'altra banda, una dieta poc saludable és responsable de deficiències o excessos de micronutrients i contribueix a crear i augmentar la incidència de malalties, com l'obesitat, les malalties cardiovasculars, la diabetis, el càncer i altres patologies.

La brisa de raïm és un clar exemple de producció sostenible, l'aprofitament d'aquest subproducte pot oferir grans beneficis que poden incorporar-se en una dieta sana.

En realitat, exhibeix concentracions més altes de compostos bioactius i activitat antioxidant ( $137,0 \pm 3,2$  mg equivalent d'àcid gàl·lic/100 g), flavonoides totals ( $128,5 \pm 23,0$  mg equivalent/100 g) i antocianines totals ( $92,5 \pm 4,0$  mg d'equivalent de cianidina) /100 grams) (de Andrade RB et al., 2021); un estudi realitzat per Ben Youssef et al. On experimentava amb extracte de pells i de llavors de raïm, va determinar que aquestes protegien les neurones, afavoreixen l'estrès oxidatiu i la inflamació, milloraven la funció motora i prevenien certs processos d'envelliment com l'adipositat visceral, el deteriorament del pàncrees i el desenvolupament de tumors.

#### 1.4. Aplicacions de la brisa en la indústria alimentaria

Existeix un gran compromís en la tecnologia dels aliments, basada en reduir, reutilitzar, reciclar i recuperar i un interès per a desenvolupar ingredients funcionals i bioactius per a la promoció de la salut. Tanmateix, s'està veient la recerca en aquests aliments funcionals que té com a objectiu explorar components actius naturals que proporcionin beneficis per a la salut més enllà de la nutrició essencial, dirigit a prevenir malalties i promoure el benestar i la qualitat de vida de les persones. Alguns exemples d'aliments funcionals inclouen probiòtics, prebiòtics, suplementes dietètics, vitamines i antioxidants (Liaros S., 2021).

Com s'ha esmentat anteriorment, el raïm és un fruit que es produeix amb una forta industrialització, només una quarta part està destinada al consum directe, la resta va dirigida a la indústria vinícola, el que genera al voltant de un 20% de residu sòlid. L'aprofitament d'aquests residus per part de la indústria alimentària podria solucionar molts problemes de sostenibilitat i ambientals, a més de beneficiar-se de manera nutricional del gran poder funcional, tant de la riquesa antioxidant com de la fibra dietètica. Recentment, aquest subproducte del raïm ha guanyat l'interès científic que han centrat el focus en l'ús de la brisa

de raïm com matèria primera per produir aliments enriquits: làctics, vegetals, carnis, pastes, cereals, etc., també per produir olis rics en àcids grassos insaturats i vitamines liposolubles a partir de les seves llavors, i per produir additius dietètics per millorar la qualitat, color i vida útil de molts productes, així com desenvolupar productes amb millor valor nutricional i millors beneficis per a la salut amb considerables perspectives de popularització i aplicació que han despertat gran curiositat en els investigadors i en les empreses, pel que es necessiten més estudis addicionals per determinar la seva eficàcia. Aquest subproductes també són utilitzats per l'indústria farmacèutica, tèxtil, cosmètica i per la indústria energètica.

Es va elaborar una kombutxa per poder aprofitar aquests residus al complet, així que es van utilitzar les pells, les llavors i les tiges fresques recaptades immediatament després del premsat del raïm. Es van el. laborar també dues kombutxes més utilitzant la matèria prima tradicional, un amb fulles de te verd i l'altre amb fulles de te negre. Es van avaluar els resultats de les tres begudes per determinar si el substrat de brisa de raïm aporta millors propietats nutricionals després de la fermentació i així comparar-lo amb les kombutxes tradicionals.

## 1.5. Beneficis de la kombutxa per a la salut

Aquesta beguda fermentada era utilitzada tradicionalment fa milers d'anys com a remei per diferents problemes de salut degut als compostos bioactius que es formen amb la fermentació. El contingut d'aquests compostos en la beguda fermentada final depèn de molts factors com són el substrat utilitzat, el cultiu simbiòtic que s'afegeix com iniciador i les condicions de fermentació com són el temps i la temperatura principalment. Per aquesta raó, de la mateixa manera que succeeix en la brisa de raïm, la kombutxa també produeix efectes antimicrobians, antioxidants, antidiabètics, modeladors de la microbiota intestinal i hepatoprotectors, així com segons desenvolupaments recents relacionats amb els components bioactius d'aquesta beguda fermentada, un fort impacte sobre l'esclerosi múltiple, la nefro-toxicitat i la ulceració gàstrica, a més de considerar-se una font potencial de probiòtics i materials ecològics. Tot plegat, obre camí de futures investigacions i més recerques en el nostre camp de la nutrició i la salut, i com no, en recerques en diverses indústries.

Avui dia s'està posant especial èmfasi a incloure probiòtics o prebiòtics en la dieta (Liaros S., 2021). Els probiòtics es defineixen com un grup de microorganismes com *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Zygosaccharomyces* i altres, que quan es consumeixen en quantitats adequades, brinden alguns beneficis per a la salut de l'organisme hoste, com estimular el sistema immunològic i equilibrar la microbiota intestinal (Pino et al., 2020) També s'han descrit en la

literatura com una manera de prevenir o fins i tot tractar algunes malalties, com el càncer, malalties cardiovasculars, diabetis i reaccions al·lèrgiques (Shafi et al., 2019).

Els probiòtics s'han integrat en productes o complements alimentosos, destacant la incorporació en lactis fermentats (Liaros S., 2021). No obstant això, la Kombutxa s'ha incorporat més recentment com producte no lacti que ha guanyat popularitat. Aquest producte està sent desenvolupat i comercialitzat en diferents països. Encara així, es necessita més recerca per a garantir la qualitat del procés de producció i la seguretat, perquè no existeixen directrius reglamentàries disponibles a Europa (Kim et al., 2020)

## 2. Hipòtesis i objectius

La hipòtesi d'aquest treball de fi de grau va ser si es podia elaborar una beguda fermentada semblant a la kombutxa a partir de la brisa de raïm que resultés amb similar capacitat antioxidant al de la kombutxa tradicional elaborada amb fulles de te.

Per tant, l'objectiu principal era utilitzar els residus del raïm, les pells, les llavors i les tiges fresques recaptades directament del celler per elaborar una beguda fermentada amb sabor agradable i un alt poder funcional i antioxidant.

Per aconseguir l'objectiu general es van plantejar els següents objectius específics:

- 1) Sospesar la possibilitat de que aquest producte funcioni com a una beguda funcional, probiòtic o nutricional en el camp de la nutrició i la salut.
- 2) Temptejar si una bona utilització d'un subproducte com la brisa de raïm resulta una millora en la producció sostenible dins de la indústria alimentària de la nostra regió.
- 3) Elaborar de kombutxa des de brisa de raïm inoculada amb kombutxa comercial de te verd no pasteuritzada per obtenir un inòcul.
- 4) Reproduir de l'elaboració de kombutxa a partir de brisa de raïm, te verd i te negre amb la inoculació del líquid i del Scoby obtinguts al objectiu específic 1.
- 5) Aïllar i identificar la microbiota de les tres kombutxes.
- 6) Determinar els principals paràmetres fisicoquímics dels tres tipus de kombutxa i comparar la seva capacitat funcional i antioxidant.
- 7) Avaluar sensorialment dels kombutxa elaborades mitjançant un tast programat amb tastadors experimentats.

## 3. Material i mètodes

### 3.1. Mostres i matèries primeres de fermentació

Es van realitzar dos experiments d'elaboració de kombutxa. En el primer, es va utilitzar te negre Ceilan (*Camellia Sinensis*), te verd Sancha (*Oryza Sativa*) adquirits a la botiga local "Tea house" de Tarragona (Espanya) i una kombutxa no pasteuritzada de marca comercial "Mun" (Mun Ferments, Mataró, Espanya) que va servir com a cultiu iniciador. Es va comprar 1 kg de raïm de la varietat Rossetti en la fruiteria del mercat local per a provar si es podia obtenir una beguda similar a la kombutxa a partir de la brisa del raïm (restes del premsat: pells, llavors i tiges). Així doncs, es va premsar el raïm i a continuació es va filtrar amb una tela de cotó, el suc es va rebutjar, per contra, les pells, les llavors i la tija es van reservar per a la preparació de la beguda fermentada.

En el segon experiment, es van utilitzar els mateixos tipus de te, però la brisa de raïm va ser de la varietat Alexandria procedent del celler experimental de la Universitat Rovira i Virgili (Mas dels Frares, Constantí, Tarragona), que va ser recollida i transportada al laboratori just després del seu premsatge en les mateixes instal·lacions.

### 3.2. Preparació i fermentació de les kombutxes.

La tècnica proposada per a aquests experiments es va basar en la de Abou-Taleb et al. (2017). Breument, pel primer experiment, es van preparar 3 tipus de kombutxes de 1L; es va remullar deu grams del substrat te verd en 0,85 litres d'aigua bullint esterilitzada sense hipoclorit i es va deixar emulsionar en un pot de vidre esterilitzat (longitud: 20 cm i ràdio: 7 cm) i es va fer el mateix amb el te negre; en cadascun dels dos pots, es va dissoldre 60 g de sacarosa comercial (Sucrera, Madrid, Espanya), i finalment, una vegada refredat, es va afegir 150cc de la Kombutxa sense pasteuritzar "Mun" verda i negra. La infusió es va deixar durant 15 minuts i es va filtrar amb tela de cotó. Per a la beguda a partir de brisa de raïm, es va utilitzar 200g del substrat del raïm Rosetti i es va dissoldre només amb 10 g de sacarosa comercial, considerant que la brisa ja contenen monosacàrids residuals; es va agitar i de nou, es va deixar emulsionar durant 15 minuts; una vegada va arribar a la temperatura ambient, es va filtrar amb tela de cotó. Es van segellar els 3 pots de rèpliques amb doble capa de tela i gomes elàstiques. La fermentació es va realitzar estàticament a temperatura ambient ( $28 \pm 2$  °C) i en un lloc sec sense humitat durant 21 dies. Al final del període de fermentació, el fong Kombutxa havia format una capa gruixuda flotant de cel·lulosa d'1 cm aproximadament en la part superior les tres kombutxes, s'anomena Biofilm o Scoby, pel·lícula formada per microorganismes que es va separar del cultiu líquid

utilitzant unes pinces estèrils. Es va mesurar el pH i l'acidesa total tant dels biofilm com dels líquids i es va reservar a -4 °C perquè servissin d'inòcul en el segon experiment.

Per al segon experiment, es van preparar duplicats de 2L dels tres tipus de begudes seguint el mateix procediment que la ronda anterior, utilitzant els mateixos te verd i negre, però amb la brisa de raïm de la varietat Alexandria recollida en la bodega experimental de Facultat d'Enologia Rovira i Virgili. Es van barrejar 15g del substrat te (te verd o et negre) i 700g de substrat raïm en 1,5 litre d'aigua bullent en cadascun dels pots de vidre que eren d'un volum superior als del primer experiment (long: 30 cm i radi:12 cm); s'hi va dissoldre 90g de sacarosa comercial en els dos tipus de te i 30g en el de brisa de raïm, es va agitar i es va deixar emulsionar 15 minuts, finalment, es va filtrar a través de tela de cotó estèril. Tot seguit, es va afegir l'inòcul de la kombutxa del primer experiment, 150 ml de cultiu líquid i un tros petit de biofilm per a cadascuna de les tres begudes noves. Per tant, es van prepara dos pots de te verd (verd 1 i verd 2), dos pots de te negre (negre 1 i negre 2) i dos pots de pell de raïm ( raïm 1 i raïm 2) (Fig. 3 i 4).

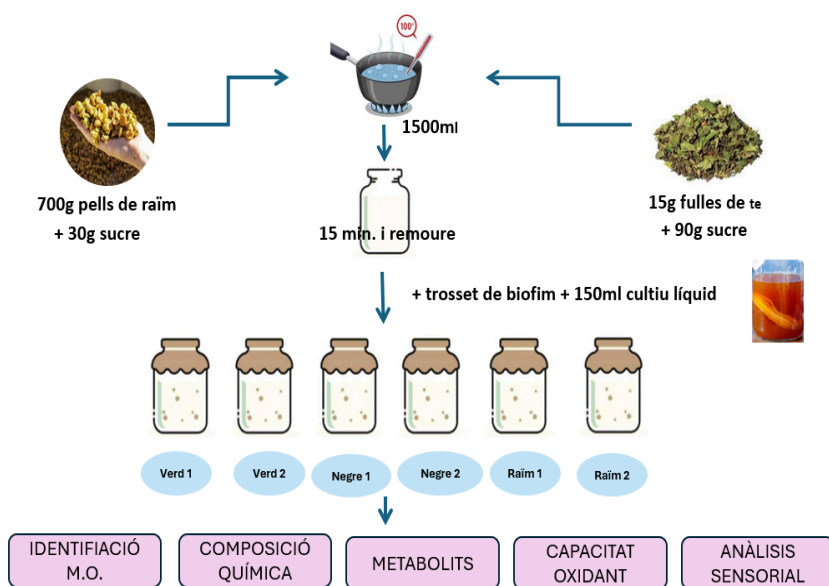


Figura 3. Procés de producció de les kombutxes (verd, negre i raïm) per duplicat, experiment dos.



Figura 4. Producció de les kombutxes (verd, negre i raïm) de l'experiment dos.



Figura 5. Inici de la fermentació de les kombutxes (verd1,2,3; negre1,2,3;raïm1 i 2) i Scoby

Es va fer una tercera rèplica de te verd i te negre del primer experiment, es a dir, dos pots més petits sense afegir Scoby però amb iniciador comercial per fer comparacions durant el procés (verd 3 i Negre 3) i es van segellar els pots amb doble capa de tela i gomes elàstiques. (Fig. 5)

Figura 5. Inici de la fermentació de les kombutxes (verd1,2,3; negre1,2,3;raïm1 i 2) i Scoby

Al setè dia de fermentació, es van retirar les pel·lícules de cel·lulosa i es van combinar duplicats de cada beguda evitant els pous del fons. Les solucions fermentades de Kombutxa es van centrifugar (3000 g x 10 min) i es van reservar 50ml de mostra de totes les begudes en el congelador a -20 °C, es va fer el mateix el dia zero; la resta de líquids es van guardar a -4 °C per al posterior anàlisi sensorial .

Els paràmetres químics pH, la densitat i l'acidesa de totes les begudes, es van mesurar a diari i les mesures microscòpiques es van realitzar tant el dia zero com el set de fermentació.

### 3.3 . Enumeració i aïllament de BAL, BAA i llevats.

Es van observar les colònies i morfologies de bacteris i llevats en el microscòpic (Fig. 6) i es va fer un recompte a través de la Càmera Neubauer (Fig. 7) per poder decidir les dilucions i sembra que es feien en els medis de cultiu adients.

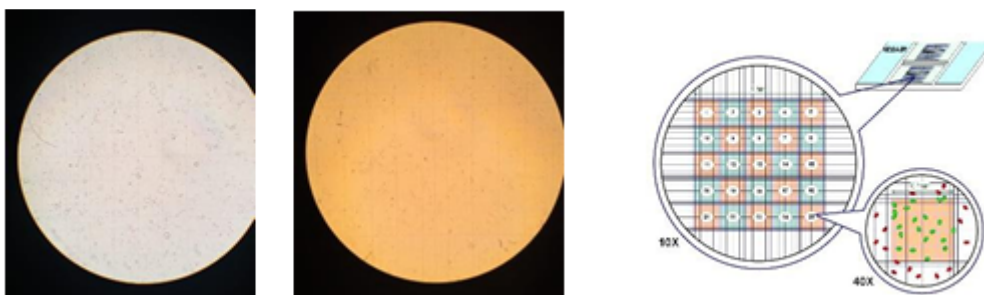


Figura 6. Població microbiològica de la kombutxa líquida en microscopi òptic a 40 augments

Figura 7. Comptatge Càmera Neubauer: la quadrícula de recompte està formada per 9 quadrats grans, cadascun d'ells amb una superfície d'1 mm<sup>2</sup>. El quadrat gran central d'objectiu 10X està dividit en 25 quadrats mitjans d'objectiu 40X, cadascun d'ells amb 16 quadrats petits. Es van comptar 5 quadrats, 4 diagonals i 1 del cantó i es van multiplicar per 5x10<sup>5</sup> per tenir les cèl/mL..

Es van preparar els medis microbiològics per al creixement de bacteris i llevats; per les bacteris àcid acètiques (BAA), l'Agar GYC (yeast-glucose-cloranfenicol), amb 25 g/L de glucosa, 5 g/L de

Yeast Extract, 5g/L de  $\text{CaO}_3$ , 15g/L d'Agar i després de l'autoclau, abans de la sembra, es van afegir 50 mg de Nistatina per a inhibir el creixement d'altres bacteris agitant-lo per a què es reparteix sobre tota la superfície del medi sòlid. Pel creixement de bacteris àcid làctiques (BAL), es va preparar el mig Agar MRS (Man, Rogosa i Sharpe), amb 25 g/L de MRS, 2,5 g/L de glucosa, 6 g/L de DL-Màlic Àcid, 0,25 g/L de cisteïna, 20g/L d'Agar i després de l'autoclau, abans de la sembra, es va afegir 50 mg de Nistatina, posteriorment, s'afegien 40 ml d'Àcida Sòdica 0,1% per a inhibir el creixement de tots els bacteris excepte les BAL. Per últim, per als llevats, l'Agar YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose), amb 10g/L de glucosa, 5 g/L de Yeast Extract, 10 g/L de Peptona bacteriològica, 18 g/L d'Agar i després de l'autoclau, abans de la sembra, 50 mg de Chloramfenicol dissolt en 10 ml de etanol per a inhibir el creixement de BAL. També es va preparar el mig WLN (Wallerstein Laboratory Nutrient) utilitzat tant per a detectar bacteris, llevats i floridures. Posteriorment, es van realitzar dilucions seriadades de totes les mostres en tots els medis sòlids, MRS i GYC per a bacteris, i medis YPD i WLN per a llevats. (Figura 8)

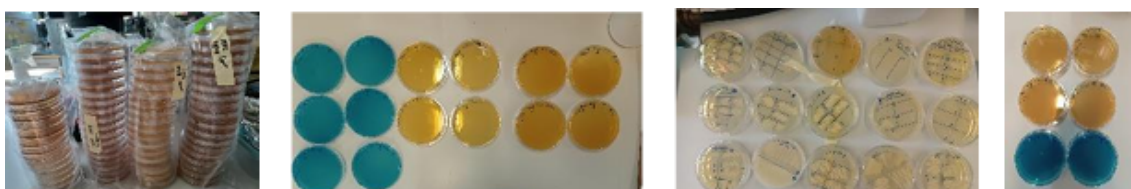


Figura 8. Medis per a la sembra de microorganismes.

Es van sembrar dilucions en sèrie adequades de mostres de Kombutxa segons els bacteris i llevats observats en la cambra Neubauer, que van resultar  $10^6$  cel/ml llevats i incomptables bacteris; es van fer les següents dilucions de les mostres:  $10^{-2}$  i  $10^{-3}$  de kombutxa verd, negra i raïm, cinc plaques de cadascuna i de cadascun dels tres medis, GYC, MRS, YPD; dilucions de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  i  $10^{-5}$  de l'iniciador comercial, i finalment, dilucions de  $10^{-3}$  i  $10^{-4}$  de l'iniciador raïm. Les plaques de MRS es van cultivar a  $25^\circ\text{C}$  durant 5 dies i les plaques de GYC i YPD a  $28^\circ\text{C}$  durant 8 dies. Posteriorment, es van tornar a fer dilucions menors perquè resultaven massa diluïdes per a poder obtenir ufc (unitats formadores de colònies). Es va sembrar 100  $\mu\text{L}$  de mostra directa i diluïda a  $10^{-1}$  en el mitjà MRS, i  $10^{-1}$  i  $10^{-2}$  en el mitjà GYC,  $10^{-3}$  i  $10^{-4}$  en el mitjà YPD i WLN. Es va fer una ressema als 14 dies d'experiment, aquesta vegada es va canviar les dissolucions de MRS a  $10^0$  i  $10^{-1}$  de te verd i te negre. Tanmateix, el dia 14 de fermentació, es van fer les següents dilucions de les terceres rèpliques, dilució  $10^{-4}$  de verd 3 i negre 3 en YPD, dilució  $10^{-3}$  de verd 3 i negre 3 en WLN i dilució  $10^{-4}$  de verd 3 i negre 3 en WLN. Totes les sembres es van guardar en la incubadora  $25^\circ\text{C}$  excepte els mitjans MRS que es van emmagatzemar en la incubadora de diòxid de carboni.

### 3.4. Identificació molecular dels microorganismes

Primerament, es van escollir els aïllats dels diferents medis que tenien colònies de diferents morfologies. Es va extreure l'ADN dels aïllats disposant-los en 100 µl d'aigua estèril, d'aquesta manera, per mig de xoc tèrmic de fred-calor (-20°C a 95°C), es trenquen les cèl·lules. Posteriorment, es va centrifugar, el sobrenadant va servir com ADN per les reaccions de les PCR.

Es van utilitzar programes de PCR diferents pels llevats i pels bacteris. Per llevats, s'utilitza un cicle per la desnaturalització de 5 minuts a 95 °C, seguits de 35 cicles de 30 segons a 95 °C, de 1 minut d'alineament a 52 °C fins a arribar a l'etapa d'elongació de 60 segons a 72 °C; finalment, es manté la reacció a 72 °C durant 10 minuts per l'elongació final i es baixa la temperatura a 4 °C per a la conservació del producte de PCR. El programa per bacteris es diferencia en l'etapa d'alineament que es va duu a terme a 45 °C, junt a l'etapa d'elongació a 72 °C durant 2 minuts.

Seguidament, es va amplificar el gen ARNr 16s de longitud completa mitjançant reacció en cadena de la polimerasa en les nombroses PCR de diferents mostres. Per aquest procés, s'utilitzava un Màster Mix amb 39,5 µL d'aigua destil·lada necessària per a obtenir 50 µL en total de la mescla, 5 µL de Buffer, 1,25 µL de Clorur de Magnesi, 1 µL de dNTPs 10µM (Desoxirribonucleòsids trifosfat) , 1 µL de primer LAB A i LAB B 10µM per a bacteris i ITS per a llevats a 10 µM en estoc, 0,25 µL de BIOTAQ ADN Polimerasa en stock 2018 i 1 µL del ADN extret com s'ha descrit anteriorment. Els productes de PCR es van visualitzar mitjançant electroforesis de gels d'agarosa (1%) carregant a cada peuet 5 µL de producte i 2 µL de colorant de carrega (Fig. 9). A cada gel s'inclou un marcador de mida de producte que va des de 100 a 2000 bp., per exemple, si el marcador migra a 487 bp., probablement indica que pertany a *Brettanomyces bruxellensis*.

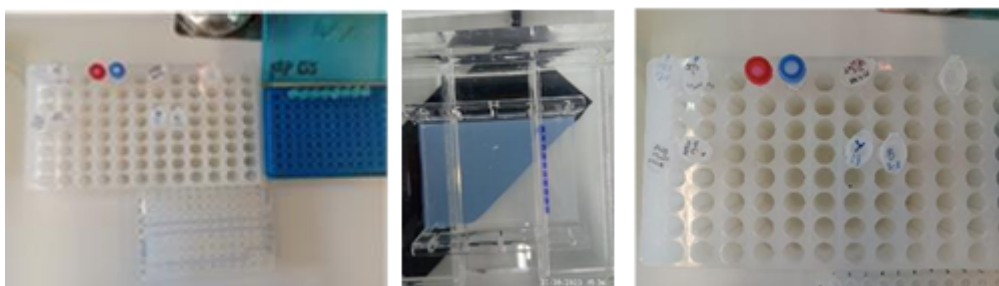


Figura 9. Preparació de les PCR

Finalment, se van seleccionar productes de PCR de les bacteris i llevats (Fig. 10) amplificat a diferents etapes de fermentació per enviar a seqüenciar a la empresa Macrogen (Madrid, Espanya). L'anàlisi de la seqüència es va dur a terme al web de NCBI fent servir l'aplicació

BLAST-N. D'aquesta manera, es va obtenir informació de les espècies que formaven part de les tres begudes i es van comparar amb les troballes de revisions anteriors (Harrison y Curtin, 2021).

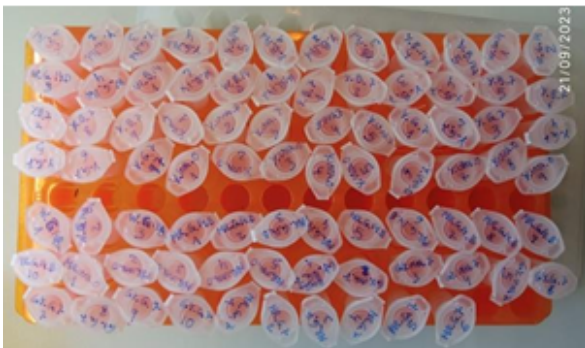


Figura 10. Mostres de cultius (la part superior són llevats i part inferior són bacteries)

## 3.5. Determinació química

### 3.5.1. Densitat de les kombutxes

La densitat de la concentració de sucres dissolts en les fermentacions es va determinar a diari utilitzant un densímetre electrònic (Densito 30PX Pble. Density Ficar; Mettler Toledo, Espanya)

### 3.5.2. pH i acidesa total.

Els valors de pH es van mesurar a diari utilitzant un mesurador de pH electrònic Crison micro pH 2002 (Hach Lange España, l'Hospitalet, Espanya). Es va determinar l'acidesa total (AT), segons Jacobson (2006) mitjançant valoració amb NaOH 0,1 N (Panreac Química SLU, Castellar del Vallès, Espanya). L'acidesa total (AT) calculada es va expressar com a percentatge (%) d'àcid acètic per gram de mostra de kombutxa te i com a percentatge d'àcid tartàric per gram de mostra de Kombutxa raïm segons l'equació:  $GA = V * M * N / P$  [(V NaOH = volum de NaOH (ml)),

### 3.5.3. Principals metabòlits de la kombutxa

Per la determinació de sucres reductors (glucosa i fructosa), àcid acètic, amoníac, àcid cítric, àcid L-màlic, àcid D- i L-làctic i PA (amino nitrogen primari) es va utilitzar l'ANALITZADOR Y15 (Biosystems, Barcelona, Espanya) i el kit comercial Enzytec™ Liquid Sucrose/D-Glucose (R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemanya) per a determinar la sacarosa. Finalment, es va fer servir metabisulfit de sodi (Fisher Scientific, Madrid, Espanya) per avaluar la concentració de antocians.

### 3.5.4. Determinació de la concentració fenòlica total.

El contingut total de fenols de les solucions fermentades de Kombutxa es va mesurar amb espectrofotòmetre segons el mètode de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999). Aproximadament 0,1 ml de la mostra de prova es van transferir a un matràs Erlenmeyer (100 ml) i el volum final es va ajustar amb aigua destil·lada fins a 46 ml. Posteriorment, es va afegir 1,5 ml de solució reactiva de Folin-Ciocalteu i es va incubar a temperatura ambient durant 3 min. Es van barrejar tres ml de carbonat de sodi (2% p / v ) i el volum final es va ajustar amb aigua destil·lada. Finalment es va mesurar l'absorbància a 760 nm després de 30 minuts. Els resultats es van expressar com µg per ml d'equivalents d'àcid gàl·lic (GAE) a partir de la corba de calibratge.

### 3.5.5. Determinació de l'activitat antioxidant

La capacitat d'eliminació de radicals lliures del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) de les solucions fermentades va ser mesura d'acord amb el mètode i algunes modificacions descrites per Marquès et al. (2012) (12\*12 tubs: 12 verd1 dia 0, 12 verd 2 dia0, 12 de verd 1 dia 7, 12 de verd 2 dia 7, igual per a negre i per a raïm). Es van barrejar 0,1 ml de les mostres diluïdes 1.50 amb 0,5 ml de solució metabòlica de DPPH (7,4 mg/100 ml). Cada barreja es va agitar vigorosament i es va deixar reposar en la foscor durant 60 minuts. Després es van centrifugar a 3000 rpm i es va mesurar l'absorbància a 520 amb el espectrofotòmetre.

La capacitat antioxidant es va expressar com la inhibició exhibida en la reacció de la mescla segons la següent equació:  $Inhibition (\%) = \frac{Abs_0 - Abs(sample)}{Abs_0} \times 100$ , on  $Abs_0$  és l'absorbància de la solució etanol DPPH utilitzant 100 µL d'aigua destil·lada com a mostra.

Els percentatges d'inhibició resultants es van ajustar a una corba sigmoide per a obtenir la seva equació, amb la següent forma:  $Y = \frac{a}{c + e^{-b \cdot x}}$ , on Y és el percentatge d'inhibició, i X és la concentració de kombutxa en ml/l de reacció, i on a, b i c són les constants del model sigmoide.

Després, es va interpolar la CI50, que significa la concentració de kombutxa (ml/L de reacció) necessària per a inhibir la meitat de la concentració total de DPPH en la barreja de reacció.

## 3.6. Anàlisi sensorial

Es va fer l'anàlisi sensorial de les tres begudes, kombutxa verda, negra i de brisa de raïm que romanien emmagatzemades a -4 °C. El dia anterior del tast, es van filtrar per a evitar la presència de restes sòlides de biofilm. Van intervenir 15 tastadors considerats experts en tast de vins, provinents de la Facultat d'Enologia de la Universitat Rovira i Virgili.

En primer lloc, es va lliurar 26 ml de cada una de les tres begudes en copes fosques (Fig. 11). Les kombutxes es van servir de manera anònima segons un quadrat llatí del disseny de Williams (Annex 2) per a evitar l'efecte de varietat i arrossegament. Es van realitzar proves triangulars per a avaluar les diferències produïdes entre les tres begudes. A més, es va demanar als tastadors que escrivissin les seves preferències.



*Figura 11. Tast de les tres kombutxes en copes fosques*

En segon lloc, es va demanar als experts que realitzessin una prova descriptiva de les tres kombutxes sobre les característiques visuals: intensitat de color i transparència; sobre les característiques de l'aroma: intensitat aromàtica, atribut floral, atribut cítric i acidesa volàtil, i finalment, sobre el sabor: acidesa, dolçor i amargor. Els tastadors havien de puntuar la intensitat de cada atribut en una escala estructurada de l'1 (no detecció) al 5 (la més alta) (Annex 3)

### 3.7. Anàlisi estadístic

Les dades es van mostrar com a mitjana  $\pm$  error estàndard (ES) i es van analitzar mitjançant Microsoft Excel 2016 (Microsoft) a través d'estadística descriptiva. Es va utilitzar una prova d'anàlisi de variància (ANOVA), IBM® SPSS® Statistics Server Versió 23.0 (2015) per a avaluar la significació estadística de la diferència suggerida per la de Duncan (1955) en  $p \leq 0,05$ . Totes les anàlisis es van realitzar per duplicat.

## 4. Resultats

Les begudes fermentades s'han consumit durant segles, i ara cada cop més, ja que veuen en elles un mètode de conservació i de millora del benestar i la salut. El consum de Kombutxa està augmentant a tot el món degut als múltiples beneficis per la salut que professen com hem mencionat anteriorment, efectes antioxidants, antiinflamatoris, antidiabètics, moduladors de la microbiota intestinal, ant obesitat, cardi protectors i fins i tot ant cancerígens dels substrats no només de te sinó també de tot tipus de fruites i cereals aportant un potencial benefici dels bacteris fermentadors.

Avui dia s'està posant especial èmfasi a incloure probiòtics o prebiòtics en la dieta, aquest grup de microorganismes com *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Zygosaccharomyces* i altres quan es consumeixen en quantitats adequades, brinden alguns beneficis per a la salut de l'organisme i a demés una bona manera de prevenir o fins i tot tractar algunes malalties, com el càncer, malalties cardiovasculars, diabetis i reaccions al·lèrgiques. Un altre aspecte significatiu, és l'adopció d'una dieta més saludable i equilibrada com es la dieta mediterrània i altres, basada en productes més beneficiosos, fonamental per a reduir la mortalitat i la morbiditat i millorar la qualitat de vida o els làctics fermentats són recomanats per seguir una dieta sana i equilibrada dins de la dieta mediterrània o qualsevol altra, no obstant això, la Kombuctxa s'ha incorporat més recentment com producte no lacteri que ha guanyat popularitat, però no tots les kombutxes han trobat BAL entre la seva comunitat microbiana (Tran et al., 2020). Tot i així, aquest producte està sent desenvolupat i comercialitzat en diferents països. Encara així, es necessita més recerca per a garantir la qualitat del procés de producció i la seguretat.

Fins on sabem, la kombutxa preparada a partir de brisa de raïm encara no s'ha estudiat. Es va seleccionar aquest substrat degut al seu alt contingut de polifenols tants a les pells com a les llavors, i per tant, l'acció beneficiosa que pot aportar a la salut i la hipòtesi d'un possible valor nutricional addicional més enllà del procés de fermentació.

Nogensmenys, a més de centrar-se en un nou substrat, aquest estudi examina la influència de la utilització dels diferents te sobre la població microbiana i la presència de molècules antioxidants.

### 4.1. Recompte i morfologia de Bacteris i llevats

La fermentació en si es realitza mitjançant una simbiosi de bacteris i llevats incrustats dins de la pel·lícula cel·lulòsica. Generalment, aquest biofilm està dominat per bacteries acètiques (BAA) (Chakravorty et al., 2015) i bacteries làctiques (BAL) tant el líquid com en el Scoby comptant

fins al 30% de les cèl·lules microbianes (Matei et al, 2018). El recompte de BAA presents va ser molt més elevat en la kombutxa de te negre i menor en la kombutxa de raïm (Taula 1), el que pot deure's a diferències en les condicions durant la producció dels substrats inicials com va determinar (Fernández-Pérez et uns altres, 2010). La presència de recomptes elevats de BAA pot provocar un augment de les activitats post fermentatives, el que no és desitjable degut a que pot augmentar el contingut d'alcohol no desitjable per sobre del nivell regulat (AESAN, Reglament (UE) Núm. 1169/2011) on s'estipula que les begudes no alcohòliques no han d'excedir del 1,2% d'alcohol per volum. Per tant, per a produir Kombutxa amb un perfil acceptable, és important controlar la fermentació de Kombutxa durant el processament i l'emmagatzematge. Els nivells alts d'àcid acètic en la Kombutxa poden provocar un sabor picat i un augment de l'acidesa a concentracions indesitjables (Nummer, 2013 ). D'altra banda, en quan a les BAL, resulten una quantitat superior en la kombutxa de raïm (Taula 1), pot ser degut a que *Oenococcus oeni* i altres BAL han sigut freqüentment aïllats dels raïm i del vi provinent del Priorat (Catalunya, Espanya) amb la qual cosa, el propi raïm podria ser font d'aquests bacteris o també degut a que la llavor de raïm estimula el creixement de *Lactobacillus spp.* que inhibeix *Clostridium histolyticum* (Kun Ho Seo et al., 2020); però no tots les kombutxes han trobat BAL entre la seva comunitat microbiana (Tran et al., 2020).

Taula 1. Resum de bacteries en GYC y MRS y llevats en YPD y WLN de cada kombutxa

KOMBUCHA	YPD	MRS	GY-C	WLN	TOTAL
<b>K raïm</b>	4,7x10 <sup>6</sup>	5x10 <sup>4</sup>	5 x10 <sup>3</sup>	2x10 <sup>6</sup>	<b>6,7x10<sup>6</sup></b>
<b>K te verd</b>	2x10 <sup>6</sup>	6x10 <sup>3</sup>	2 x10 <sup>4</sup>	2x10 <sup>6</sup>	<b>4x10<sup>6</sup></b>
<b>K te negre</b>	1,5x10 <sup>7</sup>	5x10 <sup>3</sup>	1 x10 <sup>5</sup>	5x10 <sup>4</sup>	<b>1,5x10<sup>7</sup></b>

La morfologia de les colònies presents en les begudes va ser similar a les reportades anteriorment (Sievers, 2005 ). Les cèl·lules de llevat viables van ser presents en les tres begudes en els mitjans YPD i WLN de color blanc, grans i petites, verd clar i color crema i rodones. D'altra banda, les colònies bacterianes sembrades en plaques GYC i MRS van ser de color verd fosc. La suma total de BAA, BAL i llevats es mostra en la taula 2 expressant els resultats com UFC/ml.

Taula 2 . Morfologia i nombre de bactèries i llevats.

Medi	Mostra	Dia	dissolució	CFU/ml(total)	morfologia	Codi
YPD	raïm	7	-3	4,7x10 <sup>6</sup>		Y-U-7-3
YPD	verd	7	-3	2x10 <sup>6</sup>		Y-G-/-3
YPD	Negre	7	-3	1,5x10 <sup>7</sup>		Y-B-7-3
YPD	Iniciador raïm	7	-3	4,5x10 <sup>6</sup>	Blanc gr. i pet.	ST-U-7-3
MRS	Raïm	7	-1	>5x10 <sup>4</sup>	Translúcida	M-U-7-1
MRS	verd	7	-1	5-6x10 <sup>3</sup>		M-G-7-1
MRS	Negre	7	-1	5-6x10 <sup>3</sup>		M-B-7-1
GYC	Raïm	7	-2	30	30 grogues	G-U-7-2
GYC	Raïm	7	-2	20	20 crema	G-U-7-2
GYC	verd	7	-2	2x10 <sup>4</sup>	1 blanca gran	G-G-7-2
GYC	Negre	7	-2	1x10 <sup>5</sup>	Petites incomptables	G-B-7-2
WLN	Raïm	7	-3	1-2x10 <sup>6</sup>	100 crema	W-U-7-3
WLN	Raïm	7	-3	1x10 <sup>6</sup>	100 verd clar	W-U-7-3
WLN	Raïm	7	-3	5x10 <sup>5</sup>	50 verd fosc	W-U-7-3
WLN	verd	7	-4	2x10 <sup>6</sup>	20 blanc	W-G-7-4
WLN	verd	7	-4	4x10 <sup>5</sup>	4 verd fosc	W-G-7-4
WLN	Negre	7	-4	2x10 <sup>6</sup>	20 blanc	W-B-7-4
WLN	Negre	7	-4	1,5x10 <sup>6</sup>	15 verd clar	W-B-7-4
WLN	Negre	7	-4	5x10 <sup>5</sup>	6 verd fosc	W-B-7-4
YPD	Verd 3	14	-4	2x10 <sup>6</sup>		Y-G-14-4
YPD	Negre 3	14	-4	1,5x10 <sup>6</sup>		Y-B-14-4
WLN	Verd 3	14	-3	1,2x10 <sup>6</sup>	110 blanc	W-G-14-3
WLN	Verd 3	14	-3	1x10 <sup>5</sup>	190 crema	W-G-14-3
WLN	Verd 3	14	-3	1x10 <sup>5</sup>	190 crema	W-G-14-3
WLN	Negre 3	14	-3	5x10 <sup>4</sup>	5 verd clar	W-B-14-3
WLN	Negre 3	14	-3	1,9x10 <sup>6</sup>	5 verd clar	W-B-14-3
WLN	Verd 3	14	-4	1,5x10 <sup>7</sup>	6 verd clar/crema	W-G-14-4

WLN	Verd 3	14	-4	1,5x10 <sup>7</sup>	150 verd fosc	W-G-14-4
WLN	Negre 3	14	-1	18	blanc	W-B-14-1
TOTAL colònies				8 GYC, 15 MRS, 26 Bactèries y 52 llevats		

## 4.2. Identificació molecular

El dia 0, 7 i 14 de l'inici de l'experiment 2, es van escollir mostres de les colònies més representatives un cop ressebrades en els diferents medis per obtenir resultats més precisos; a continuació es va fer una extracció de l'ADN per amplificació aleatòria d'ADN (Di Gioia et al. (2014)) mitjançant reacció en cadena de la polimerasa (PCR) de nombroses mostres (Fig. 12); es van seleccionar els resultats més significatius per enviar a seqüenciar; d'aquesta manera, es va obtenir la informació de les espècies presents en les mostres seleccionades (Taula 3)



Figura 12. .Resultats d'exemple de PCR en gel d'agarosa mostrant al marcador de mida del producte de PCR (M) i la mida esperada per l'amplificació de bacteris (*Brettanomyces bruxellensis* en 1200bp) i de llevats (*Komagataeibacter intermedius* en 480 bp)

En el procés de fermentació de la kombutxa intervenen una gran varietat de microorganismes com *Saccharomyces spp.*, *Komagataeibacter spp.*, *Acetobacter spp.* i *Gluconobacter spp.*; cal dir que la regió també és un factor important en la varietat de estos (Harrison i Curtin (2021), sovint, *Komagataeibacter spp.* són les més nombroses (Barbosa et al. (2021), concretament, *Komagataeibacter intermedius* com es pot apreciar en el resultat de la seqüenciació de mostres de kombutxa de raïm i te verd del dia 7 i 14 (Taula 3). Tanmateix, va resultar la presència de *Oenococcus oeni* tant en la beguda de raïm només el dia 0 com de te verd el dia 7, és una bactèria de color crema normalment que es va veure translúcida. No obstant això, en les mostres es va detectar un fong com el *Brettanomyces bruxellensis* en nombroses mostres, es desenvolupa amb facilitat durant les etapes de la fermentació produint metabòlits desitjables.

Taula 3. Resultat de la seqüenciació de les colònies: Codi colònia (Nom medi\_Nom substrat\_Dia\_Dilució), ITS (...), Primer Seqüenciació i % ID (% inhibició)

Pou placa	Codi colònia	ITS/ITS2	Forma/color	Nombre Sequ.	Primer sequ.	BlastN result	% ID
A1	Y_V_14_1			11	NL1	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	99
A6	Y_N_14_1	PCR		12	NL1	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	99
B2	W_V_14_4	PCR	blanc	13	NL1	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> <i>NRRY-12961</i>	99
B3	W_N_14_1	PCR		14	NL1	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> <i>NRRY-12961</i>	98
B7	Y_N_7_1	PCR		15	NL1	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> <i>NRRY-12961</i>	99
C4	Y_R_7_1	PCR			NL1	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> <i>NRRY-12961</i>	99
C11	Y_V_7_3	PCR		16	NL1	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> <i>NRRY-12961</i>	99
D4	Y_R_0_1	PCR		17	NL1	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> <i>NRRY-12961</i>	99
F1	W_V_14_1		verd clar	1	LabA/LabB	<i>Komagataeibacter intermedius</i>	97
F4	M_V_14_1		petites	2	LabA/LabB	<i>Liquorilactobacillus nagehi</i>	97
F7	M_V_14_4		petites	3	LabA/LabB	<i>mala qualitat</i>	
G2	M_R_0_1		transparentes	4	LabA/LabB	<u><i>Oenococcus oeni</i></u>	99
G3	M_R_0_2			5	LabA/LabB	<u><i>Oenococcus oeni</i></u>	99
G7	G_BIOF_G_7_1		blanc	6	LabA/LabB	<i>Komagataeibacter intermedius</i>	97
G8	G_R_7_2		grogues	7	LabA/LabB	<i>Staphilococcus pasteurii</i>	
G10	G_R_7_4	PCR	blanc			<i>Komagataeibacter intermedius</i>	
G12	G_V_7_6	PCR	crema			<i>Komagataeibacter intermedius</i>	
H4	G_V_7_1		crema	8	LabA/LabB	<i>Komagataeibacter intermedius</i>	97
H5	M_V_7_1		blanca	9	LabA/LabB	<i>Liquorilactobacillus ghanensis</i> <i>strain L489</i>	96

## 4.3. Composició química de les begudes fermentades de Kombucha

### 4.3.1. La densitat i la fermentació

La disminució de la densitat dels tres kombutxes (Fig. 13) mostra el rendiment de fermentació durant 8 dies del procés en el cas de les rèpliques de te verd i negre 1 i 2, i fins a 14 dies en el cas de les rèpliques 3, alhora que anava disminuint el pH. En el cas de les dues begudes de te verd i negre, la disminució no va ser tan pronunciada com en el cas de la beguda de raïm.

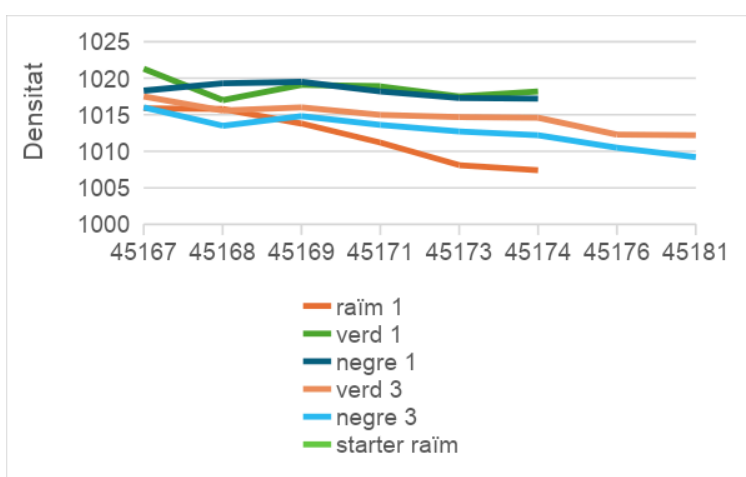


Figura 13. Patrons de la densitat durant la fermentació de Kombutxa en els diferents substrats de te verd, et negre i brisa de raïm.

### 4.3.2. pH i Acidesa Total

El pH és molt important en el procés de fermentació de kombutxa ja que respon a l'activitat metabòlica dels bacteris acidífics acètics i els llevats per la presència de sacarosa, en el qual una variació dels ions d'hidrogen (pH) pot afectar el creixement d'aquests microorganismes; els bacteris majoritàriament creixen a pH entre 3,5 i 8,5 (Javabalan et al., 2014) i els llevats entre 4,5 i 6 (Neffe-Skocińska et al., 2017). Les dades presentades en la Fig. 14 van mostrar que el pH de les diferents mostres va disminuir en augmentar el temps de fermentació, augmentant l'acidesa total (com a concentració acètica) al mateix temps i aconseguint el pic després de 8 dies (Fig. 15). Es va observar que els valors de pH dels dos kombutxes de te van sofrir una forta disminució a les 24h de fermentació, en canvi, la disminució de la kombutxa de raïm va ser una disminució gradual. Encara que els valors de partida van ser molt diferents, 3,5 en raïm i 5,5 de mitjana en els dos te, els resultats finals van ser molt similars i concorden amb els

valors de pH de Kombutxa de te descrits per Wang et al., 2022 i de suc de raïm descrits per Ayed et al., 2017 estudiats amb anterioritat.

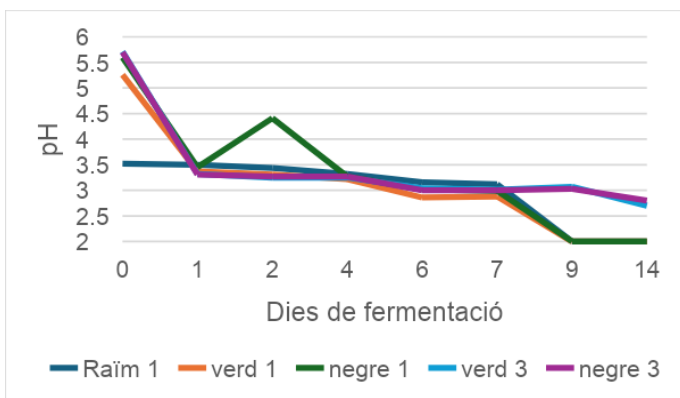


Figura 14. pH de les Kombutxes durant els 14 dies de fermentació.

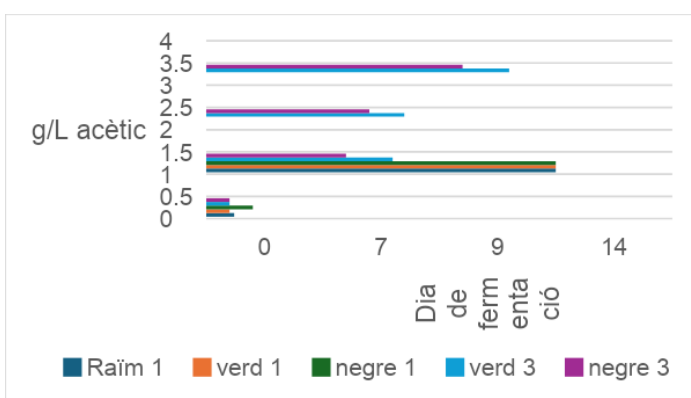


Figura 15. Acidesa total de les Kombutxes durant la fermentació.

### 4.3.3. Principals metabòlits

Estudis anteriors han vist que els resultats químics estan relacionats amb els paràmetres com la temperatura, dies de fermentació, biofilm, etc. (Tran et al., 2020; Villareal-Soto et al., 2019; Bartolomedi et al., 2022) . Per a permetre la fermentació, es van afegir 60g/L de sacarosa comercial en les kombutxes de te i 10g/L en la kombutxa de raïm; el motiu de fer servir menys concentració de sacarosa a la beguda de raïm és que la brisa de raïm blanc conté sucres residuals, segons la bibliografia aproximadament en el rang de 20-23 g/L en el dia 1, de 14-18 g/L el dia 7, i de 7-9 g/L el dia 14 (Robles et al., 2016). Durant la fermentació es va produir una disminució de la concentració de sacarosa en les tres solucions (Taula 4). El contingut típicament baix de sacarosa (0,93 g/L-7,54 g/L) de les begudes és desitjable per als consumidors conscients de la seva dieta i benestar (Neffe-Skocińska et al., 2017). Tanmateix, al final de la fermentació la beguda de brisa de raïm va tenir una menor concentració de sucres reductors contràriament a les begudes de te coincidint amb altres estudis han observat que durant la fermentació augmenta la concentració de monosacàrids (Jayabalan et al, 2007).

Es va quantificar l'àcid cítric que va ser menor en la beguda de raïm a causa d'un major metabolisme dels BAL, i en valors més baixos després de la fermentació. De la mateixa manera, l'àcid làctic també implicat en el metabolisme de les BAL, va ser baix en totes les mostres. Per últim, l'àcid acètic, principal compost de la kombutxa (Teoh et al., 2004), no detectat en les kombutxes sense fermentar, va arribar a 3g/L amb la fermentació (Taula 4).

*Taula 4. Resultats dels principals metabòlits existents en les kombutxes fermentades i no fermentades de te verd, te negre i Brisa de raïm, respectivament. NF: no fermentat; K: kombutxa*

	Verd-NF	Negre-NF	Brisa-NF	Verd-K	Negre-K	Brisa-K
Sucrosa (g/L)	22.69 ± 1.80b	22.40 ± 0.23b	10.88 ± 6.67a	17.20 ± 1.46ab	17.14 ± 0.46ab	5.78 ± 0.02a
Sucres reductors (g/L)	0.35 ± 0.07a	0.70 ± 0.14a	51.15 ± 2.62c	31.20 ± 2.26b	20.10 ± 8.06b	26.35 ± 0.21b
Àcid Cítric (mg/L)	79 ± 11b	96 ± 8b	24 ± 12a	77 ± 5b	76 ± 15b	7 ± 1a
Àcid L-Màlic (g/L)	< LOQ	< LOQ	0.28 ± 0.01b	< LOQ	< LOQ	0.07 ± 0.01a
Àcid L-làctic (g/L)	0.10 ± 0.01ab	0.07 ± 0.01a	< LOQ	0.12 ± 0.04ab	0.11 ± 0.05ab	0.19 ± 0.01b
Àcid D-làctic (g/L)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.09 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.15 ± 0.04
Àcid Acètic (g/L)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	2.30 ± 0.71	3.20 ± 0.28	3.10 ± 0.14
Acidesa Total (g/L)	0.22 ± 0.03a	0.22 ± 0.03a	0.32 ± 0.11a	3.40 ± 0.01c	2.90 ± 0.14b	3.90 ± 0.14d
PAN** (mg N/L)	19.0 ± 2.8ab	24.5 ± 5.0b	11.5 ± 0.7a	nd	nd	nd
Amoníac (mg N/L)	21.0 ± 5.7abc	26.5 ± 3.5c	20.5 ± 5.0bc	16.0 ± 9.9a	16.5 ± 0.7abc	13.0 ± 2.8ab
Àcids Fenòlics (mg GAE/L)	639 ± 17b	919 ± 110c	120 ± 1a	644 ± 47b	877 ± 85bc	104 ± 27a
Antocians (mg/L)	6.1 ± 2.5b	3.9 ± 0.6a	2.6 ± 0.1a	-----	3.5 ± 1.2a	3.1 ± 0.6a
Màxima Capacitat antioxidant (% Inhibició)	91 ± 1b	94 ± 2bc	61 ± 1a	96 ± 1c	96 ± 1c	92 ± 1bc
IC50 (mL kombutxa/L)	1.86a	1.83a	124.02c	2.33a	1.92a	51.32b

#### 4.3.4. Determinació de la concentració fenòlica total

Els compostos fenòlics van resultar molt diferents entre les tres begudes, però no es van observar canvis en les begudes no fermentades ni entre les kombutxes fermentades del mateix substrat. Els valors menors van ser de la beguda de raïm, la qual cosa era previsible ja que la varietat de raïm blanc no és tan rica en polifenols com la varietat de raïm negre ni com les fulles de te (chen et al., 2022; Taha M. Rababah et al., 2004). De la mateixa manera, els valors de antocians també van ser baixos, la qual cosa s'evidenciava observant el color de les begudes ( Barakat et al., 2024; Ayed et al., 2017; Dartora et al., 2023)(Fig. 16)

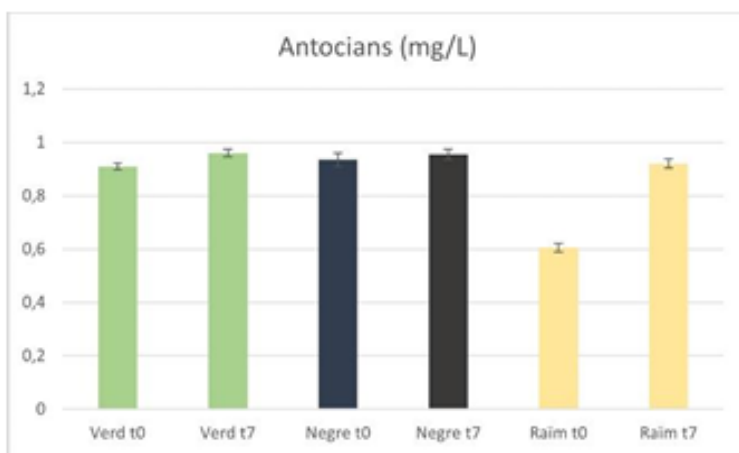


Figura 16. Increment d'antocians durant la fermentació

#### 4.3.5. Activitat antioxidant

L'activitat antioxidant de la kombutxa atreu gran interès en els últims anys. Es va voler esbrinar el potencial antioxidant d'una kombutxa a partir de la brisa del raïm, vam determinar-lo a través del mètode DPPH. Les dades presentades en la Fig. 17 mostren que l'activitat antioxidant de la Kombutxa de brisa de raïm va augmentar amb el temps de fermentació confirmant les troballes trobades per Amarasinghe et al. (2018), per contra, els valors de la beguda de te negre no van augmentar. El valor més alt va ser al setè dia de fermentació el que va suposar una millora del poder antioxidant de la kombutxa de brisa de raïm comparada amb la dels del dos te.

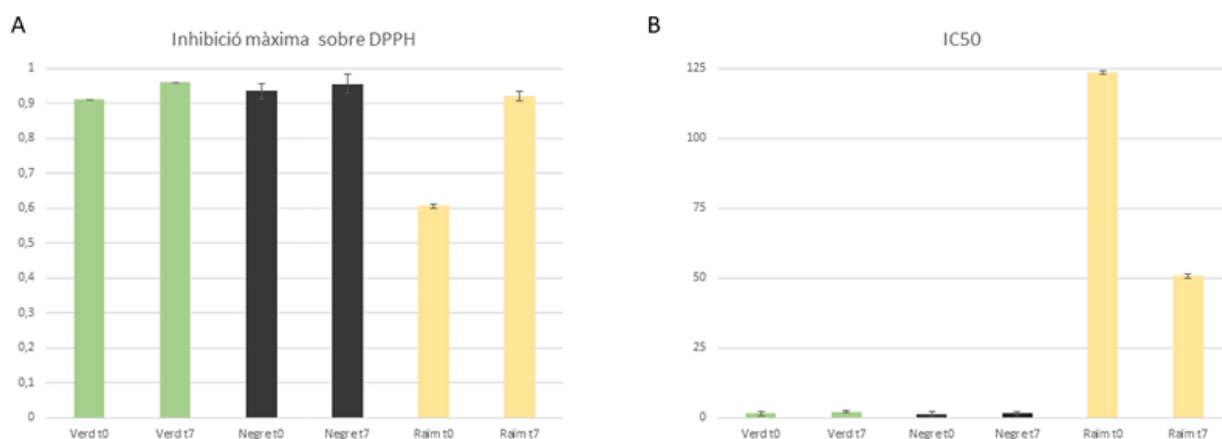


Figura 17. Capacitat antioxidant de les tres Kombutxa (verd, negre i raïm)

Respecte als compostos fenòlics totals (Taula 5), el temps de fermentació no va augmentar la capacitat antioxidant d'aquests. Així i tot, es va poder confirmar que la fermentació de kombutxa de brisa de raïm havia augmentat significativament el contingut d'antioxidants.

Taula 5. Resultats dels Compostos fenòlics

Mostres	Abs	GAE mg/L	IFC
Verd 1	0,387	753,4	7,74
Verd 2	0,382	743,4	7,64
Negre 1	0,365	709,4	7,3
Negre 2	0,375	729,4	7,5
Raïm 1	0,092	163,4	1,84
Raïm 2	0,095	169,4	1,9

## 4.5. Anàlisi sensorial

Es va realitzar una anàlisi sensorial per a avaluar les característiques i qualitat de les tres begudes segons la seva acceptació i puntuació. En primer lloc, es va demanar als participants que realitzessin una prova triangular de les tres begudes en tres sèries. Es van utilitzar copes fosques que no permeten veure ni el color ni la transparència i cal dir com a curiositat, que els tastadors, van poder distingir les tres kombutxa només amb l'olfacte.

Posteriorment, es va demanar als participants que escrivissin la seva preferència, el que va resultar molt positiu per la kombutxa de raïm sent la predilecta assolint un 92% dels tastadors i un 100% van preferir la Kombutxa de te verd que la de te negre.

## 4.6. Anàlisi estadística

Les 12 assignacions correctes de te verd-negre i les 13 de raïm dels 15 totals demostren que les begudes eren significativament diferents amb un valor de  $p < 0,005$ . A més, la significació

estadística va disminuir en diferenciar els kombutxa de te verd amb te negre amb un valor  $<0,5$ , la qual cosa representa 9 assignacions correctes de 15. Tots els atributs estudiats van mostrar diferències significatives entre les mostres excepte la intensitat aromàtica i l'àcid cítric que va ser més similar (Fig. 18)

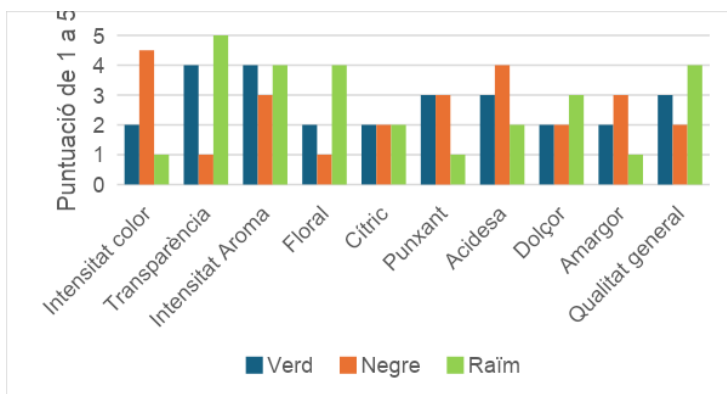


Figura 18. Atributs organolèptics de les tres kombutxes analitzats en anàlisi sensorial descriptiva.

## 5. Conclusions

1. Es va poder elaborar una beguda fermentada a partir de brisa de raïm de la varietat Moscatell d'Alexandria. En el primer experiment, es va fer servir com inòcul el líquid de kombutxa comercial no pasteuritzada.
2. En un segon experiment, es van utilitzar com substrats, brisa de raïm, te verd i te negre; com inòcul, el líquid i biofilm de raïm obtingut en la primera prova. La beguda fermentada a partir de brisa de raïm tenia un aroma agradable i recordava a la kombutxa de te.
3. Es van identificar com microorganismes més abundants en les tres kombutxes, la BAA *komagataeibacter intermedius* i el llevat *Brettanomyces bruxellensis*. També es va poder aïllar i identificar la BAL *Oenococcus oeni*. Tots aquest microorganismes han sigut prèviament descrits i analitzats en altres estudis. A més, no hi van haver diferències en la composició microbiana en les tres kombutxes, encara que el recompte va diferir lleugerament.
4. Les kombutxes comparades eren significativament diferents en composició química. Específicament als paràmetres de sacarosa, sucres reductors, àcid cítric, acidesa total, compostos fenòlics i capacitat antioxidant. El paràmetre més destacable de les kombutxes és l'acidesa i la capacitat antioxidant. Trobem que la major acidesa es dona per la kombutxa de brisa de raïm però els nivells assolits de àcid acètic, son semblants

per totes tres kombutxes. Tot i partir d'un valor molt inferior de capacitat antioxidant al substrat no fermentat de brisa de raïm respecte al de fulles de te, va ser la beguda amb més increment de capacitat antioxidant després de la fermentació quan la capacitat antioxidant assolí el valor màxim en les tres kombutxes després de la fermentació.

5. Per tant, la kombutxa a partir de brisa de raïm compleix requisits de seguretat de pH, conte valors d'àcid acètic i alcohol semblant a una kombutxa de fulles de té i aporta més poder antioxidant que el substrat sense fermentar.
6. La kombutxa millor valorada en l'anàlisi sensorial va ser la de brisa de raïm, valorada com la menys àcida i amb més aroma floral tot i tenir la mateixa quantitat d'àcid acètic i més acidesa que les kombutxes de te, el que constata el resultat agradable després de la fermentació i l'acceptació dels consumidors de kombucha.
7. En definitiva, la kombutxa és un producte cada vegada més consumit catalogat com nutricional. Aquest producte natural ha estat desenvolupat per a millorar o promoure la salut nutricional, física i mental. A més, cal destacar que va tenir el resultat d'una beguda funcional agradable al paladar que indueix a l'acceptació dels consumidors pel seu delicat gust amarg que entra tant bé en boca.

## 6. Agraïments

En primer lloc, m'agradaria mostrar meua més sincera gratitud a la meua tutora, la Dra. Carmen Portillo Guisado per la seva generositat, per tot el que m'ha ensenyat, per tot el temps que m'ha dedicat, per involucrar-me en el seu cercle de treball i compartir tot el que ho envolta, per confiar tant en mi com a mentora i fer-me partícip de la seva feina i com no, fer-me partícip d'aquest projecte que vam iniciar l'any passat i que hem pogut realitzar després de molta dedicació. Vull afegir, donar les gràcies al seu departament de Biotecnologia i Enologia de la URV.

En segon lloc, voldria agrair l'atenció i la excel·lent docència d'alguns professors com La Marta Romeu, la Carme Martí, el Francesc Sureda, la Roser Martí, l'Anna Gils i l'Alberto Miguel Stchigel.

Per últim, mostrar el meu orgull de pertànyer a la URV.

# 7. Annexos

## Annex 1. FITXA AVALUACIÓ TUTORA

**TREBALL DE FI DE GRAU. FMCS**  
**FITXA D'AVVALUACIÓ DEL TUTOR**



L'avaluació del treball pràctic tindrà en compte la nota referida pel tutor respecte a la memòria impresa i el seguiment del treball. El resultat de l'avaluació del tutor ha de ser favorable per tal que l'alumne pugui presentar i defensar el treball i representa el 25 % de la nota total del treball escrit (salvo excepcionalitat per la pandèmia).

**ENSENYAMENT:** Nutrició Humana i Dietètica

**NOM DE L'ALUMNE:** Estefania Romeu Pagès

**TÍTOL DEL TREBALL:** Avaluació de la producció de una beguda semblant a kombutxa a partir de brisa de raïm

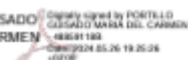
<b>SEGUIMENT I AVALUACIÓ DEL TREBALL PER PART DEL TUTOR DEL TREBALL PRÀCTIC (0-10)</b>	
Ha mostrat capacitats d'anàlisi, síntesi i raonament al llarg del treball	10
El seu grau d'implicació durant el desenvolupament del treball ha estat elevat	10
El procés d'elaboració del treball ha estat continuat	10
Ha mostrat habilitat de cerca i gestió de la informació	10
Ha mostrat capacitat d'organització i planificació	10
Ha seguit la normativa pròpia del Centre en quan a la presentació escrita del treball	10
El treball és ordenat i redactat amb cura, expressant-se correctament amb la llengua escollida	10
Els resultats del treball són originals	10
El treball presentat supera les expectatives del tutor	10
<p><u>Comentaris del tutor</u></p> <p>El TFG d'Estefania és original e interessant i sense dubta d'interès tan per la nutrició humana com pel sector primari. La seva consecució ha comportat molta feina de laboratori amb tècniques molt variades i de complexitat i anàlisi de dades. L'estudiant s'ha implicat al 100% tot el temps i ha mostrat gran disposició. La darrera versió del TFG tenia tots els apartats a excepció de la declaració antiplagi, dades el centre i corregir la bibliografia i alguns errors de un parell de figures. Sense dubta, l'esforç que ha tingut que desenvolupar l'estudiant per familiaritzar-se amb un àmbit d'experimentació que moltes vegades estava allunyat a la seva formació, és digna d'admiració i mereix, des del meu punt de vista, la màxima puntuació.</p>	
<b>MITJANA DE LA NOTA DEL TUTOR (0-10)</b>	

**AVALUACIÓ:** FAVORABLE

NO FAVORABLE

**NOM I SIGNATURA DEL TUTOR\*:** Maria del Carmen Portillo Guisado

PORTILLO GUISADO  
MARIA DEL CARMEN  
- 488591188



Tarragona, a 26 de de 2024

**Annex 2. FITXES DESCRIPTIVA DE LA CATA**

Nombre \_\_\_\_\_

**Puesto nº 1**

Evalúe las siguientes tres kombuchas en base a las siguientes características en una escala creciente del 1 al 5:

	830	126	765
Intensidad colorante			
Transparencia			
Intensidad aromática			
Aroma floral			
Aroma cítrico			
Sensación punzante			
Acidez			
Dulzor			
Amargor			
Valoración global			

Nombre \_\_\_\_\_

**Puesto nº 2**

Evalúe las siguientes tres kombuchas en base a las siguientes características en una escala creciente del 1 al 5:

	765	830	126
Intensidad colorante			
Transparencia			
Intensidad aromática			
Aroma floral			
Aroma cítrico			
Sensación punzante			
Acidez			
Dulzor			
Amargor			
Valoración global			

**Puesto nº 3**

Evalúe las siguientes tres kombuchas en base a las siguientes características en una escala creciente del 1 al 5:

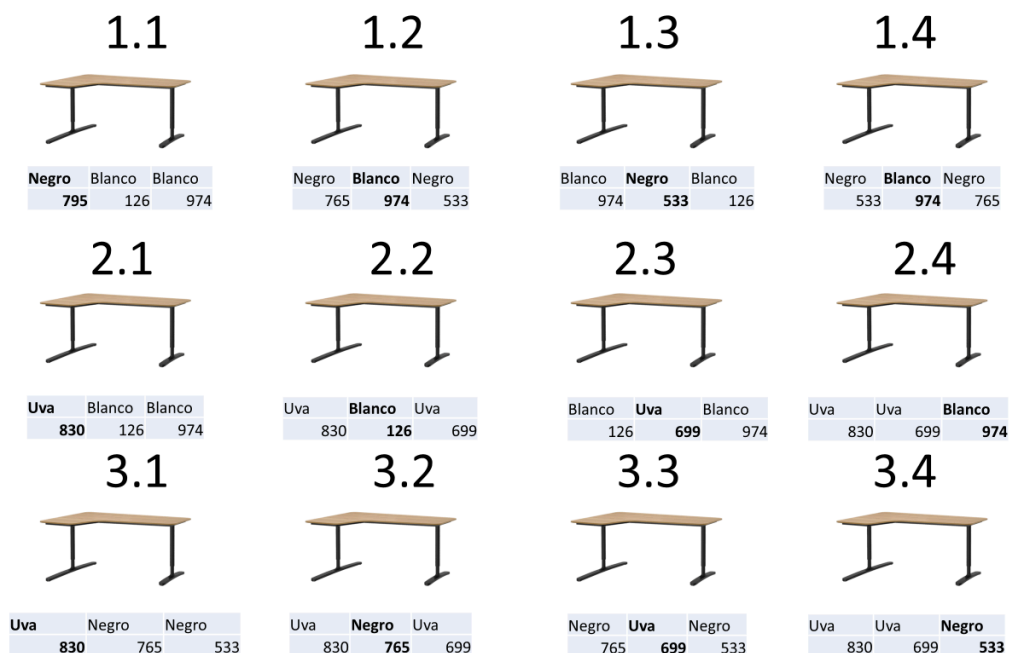
	126	765	830
Intensidad colorante			
Transparencia			
Intensidad aromática			
Aroma floral			
Aroma cítrico			
Sensación punzante			
Acidez			
Dulzor			
Amargor			
Valoración global			

**Puesto nº 4**

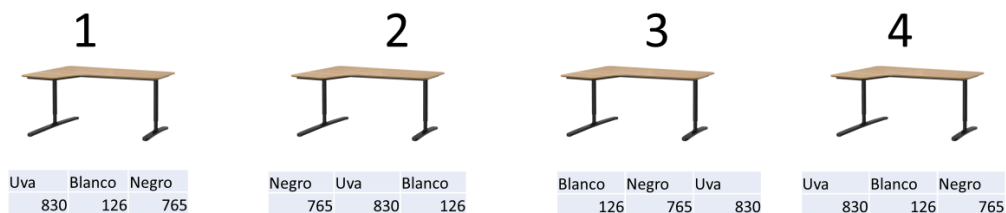
Evalúe las siguientes tres kombuchas en base a las siguientes características en una escala creciente del 1 al 5:

	830	126	765
Intensidad colorante			
Transparencia			
Intensidad aromática			
Aroma floral			
Aroma cítrico			
Sensación punzante			
Acidez			
Dulzor			
Amargor			
Valoración global			

**Annex 3.** Quadrat llatí del disseny de Williams



TRIANGULAR



DESCRIPTIVA

<b>Codificación copas:</b>		
• Negro	765	533
• Blanco	126	974
• Uva	830	699

## 8. Bibliografia

1. Liaros S. Circular food futures: What will they look like? *Circ Econ Sustain* [Internet]. 2021;1(4):1193–206. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s43615-021-00082-5>
2. Torres-Maravilla E, Boucard A-S, Mohseni AH, Taghinezhad-S S, Cortes-Perez NG, Bermúdez-Humarán LG. Role of gut Microbiota and probiotics in colorectal cancer: Onset and progression. *Microorganisms* [Internet]. 2021 [citado el 26 de mayo de 2024];9(5):1021. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9051021>
3. Coelho RMD, Almeida AL de, Amaral RQG do, Mota RN da, Sousa PHM de. Kombucha: Review. *Int J Gastron Food Sci* [Internet]. 2020;22(100272):100272. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100272>
4. Esatbeyoglu T, Sarikaya Aydin S, Gültekin Subasi B, Erskine E, Gök R, Ibrahim SA, et al. Additional advances related to the health benefits associated with kombucha consumption. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2023;1–18. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2022.2163373>
5. de Andrade RB, Machado BAS, Barreto G de A, Nascimento RQ, Corrêa LC, Leal IL, et al. Syrah grape skin residues has potential as source of antioxidant and anti-microbial bioactive compounds. *Biology (Basel)* [Internet]. 2021 [citado el 23 de mayo de 2024];10(12):1262. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2079-7737/10/12/1262>
6. Coronado H M, Vega y León S, Gutiérrez T R, Vázquez F M, Radilla C V. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Rev Chil Nutr* [Internet]. 2015 [citado el 26 de mayo de 2024];42(2):206–12. Disponible en: [https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-75182015000200014](https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182015000200014)
7. Selvaraj S, Gurumurthy K. An overview of probiotic health booster-kombucha tea. *Chin Herb Med* [Internet]. 2023 [citado el 23 de mayo de 2024];15(1):27–32. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chmed.2022.06.010>
8. Phung LT, Kitwetcharoen H, Chamnipa N, Boonchot N, Thanonkeo S, Tippayawat P, et al. Changes in the chemical compositions and biological properties of kombucha beverages made from black teas and pineapple peels and cores. *Sci Rep* [Internet]. 2023;13(1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-023-34954-7>
9. Bortolomedi BM, Paglarini CS, Brod FCA. Bioactive compounds in kombucha: A review of substrate effect and fermentation conditions. *Food Chem* [Internet].

- 2022;385(132719):132719. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132719>
10. Chakravorty S, Bhattacharya S, Chatzinotas A, Chakraborty W, Bhattacharya D, Gachhui R. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2016 [citado el 24 de mayo de 2024];220:63–72. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26796581/>
  11. İçen H, Corbo MR, Sinigaglia M, Korkmaz BIO, Bevilacqua A. Microbiology and antimicrobial effects of kombucha, a short overview. *Food Biosci* [Internet]. 2023;56(103270):103270. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103270>
  12. Diez-Ozaeta I, Astiazaran OJ. Recent advances in Kombucha tea: Microbial consortium, chemical parameters, health implications and biocellulose production. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2022;377(109783):109783. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109783>
  13. Ayed L, Ben Abid S, Hamdi M. Development of a beverage from red grape juice fermented with the Kombucha consortium. *Ann Microbiol* [Internet]. 2017;67(1):111–21. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s13213-016-1242-2>
  14. Morales D, Gutiérrez-Pensado R, Bravo FI, Muguerra B. Novel kombucha beverages with antioxidant activity based on fruits as alternative substrates. *Lebenson Wiss Technol* [Internet]. 2023;189(115482):115482. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115482>
  15. Amjadi S, Armanpour V, Ghorbani M, Tabibiazar M, Soofi M, Roufegarinejad L. Determination of phenolic composition, antioxidant activity, and cytotoxicity characteristics of kombucha beverage containing *Echium amoenum*. *J Food Meas Charact* [Internet]. 2023;17(3):3162–72. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s11694-023-01856-1>
  16. Wu S-X, Xiong R-G, Cheng J, Xu X-Y, Tang G-Y, Huang S-Y, et al. Preparation, antioxidant activities and bioactive components of kombucha beverages from golden-flower tea (*Camellia petelotii*) and honeysuckle-flower tea (*Lonicera japonica*). *Foods* [Internet]. 2023 [citado el 24 de mayo de 2024];12(16):3010. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37628009/>
  17. Teixeira Oliveira J, Machado da Costa F, Gonçalves da Silva T, Dotto Simões G, dos Santos Pereira E, Quevedo da Costa P, et al. Green tea and kombucha characterization: Phenolic composition, antioxidant capacity and enzymatic inhibition potential. *Food*

- Chem [Internet]. 2023;408(135206):135206. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135206>
18. Gaggia F, Baffoni L, Galiano M, Nielsen D, Jakobsen R, Castro-Mejía J, et al. Kombucha beverage from green, black and rooibos teas: A comparative study looking at microbiology, chemistry and antioxidant activity. *Nutrients* [Internet]. 2018 [citado el 23 de mayo de 2024];11(1):1. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30577416/>
19. Khazi MI, Liaqat F, Liu X, Yan Y, Zhu D. Fermentation, functional analysis, and biological activities of turmeric kombucha. *J Sci Food Agric* [Internet]. 2024;104(2):759–68. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.12962>
20. Wang B, Rutherford-Markwick K, Zhang X-X, Mutukumira AN. Isolation and characterisation of dominant acetic acid bacteria and yeast isolated from Kombucha samples at point of sale in New Zealand. *Curr Res Food Sci* [Internet]. 2022;5:835–44. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.crfs.2022.04.013>
21. Velićanski AS, Faculty of Technology, University of Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, RS-21000 Novi Sad, Serbia, Cvetković DD, Tumbas Šaponjac VT, Vulić JJ, Faculty of Technology, University of Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, RS-21000 Novi Sad, Serbia, et al. Antioxidant and antibacterial activity of the beverage obtained by fermentation of sweetened lemon balm (*Melissa officinalis* L.) tea with symbiotic consortium of bacteria and yeasts. *Food Technol Biotechnol* [Internet]. 2014 [citado el 23 de mayo de 2024];52(4):420–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.17113/ftb.52.04.14.3611>
22. Kim H, Hur S, Lim J, Jin K, Yang T-H, Keehm I-S, et al. Enhancement of the phenolic compounds and antioxidant activities of Kombucha prepared using specific bacterial and yeast. *Food Biosci* [Internet]. 2023;56(103431):103431. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103431>
23. Tran T, Grandvalet C, Verdier F, Martin A, Alexandre H, Tourdot-Maréchal R. Microbiological and technological parameters impacting the chemical composition and sensory quality of kombucha. *Compr Rev Food Sci Food Saf* [Internet]. 2020;19(4):2050–70. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12574>
24. Wang X, Wang D, Wang H, Jiao S, Wu J, Hou Y, et al. Chemical profile and antioxidant capacity of kombucha tea by the pure cultured kombucha. *Lebenson Wiss Technol* [Internet]. 2022;168(113931):113931. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113931>

25. Campanella D, Rizzello CG, Fasciano C, Gambacorta G, Pinto D, Marzani B, et al. Exploitation of grape marc as functional substrate for lactic acid bacteria and bifidobacteria growth and enhanced antioxidant activity. *Food Microbiol* [Internet]. 2017;65:25–35. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.019>
26. Villarreal-Soto SA, Beaufort S, Bouajila J, Souchard J-P, Renard T, Rollan S, et al. Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. *Process Biochem* [Internet]. 2019;83:44–54. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2019.05.004>
27. Martins IM, Roberto BS, Blumberg JB, Chen C-YO, Macedo GA. Enzymatic biotransformation of polyphenolics increases antioxidant activity of red and white grape pomace. *Food Res Int* [Internet]. 2016;89:533–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.09.009>
28. Jayabalan R, Marimuthu S, Swaminathan K. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chem* [Internet]. 2007;102(1):392–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.032>
29. Teoh AL, Heard G, Cox J. Yeast ecology of Kombucha fermentation. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2004 [citado el 24 de mayo de 2024];95(2):119–26. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15282124/>
30. Wu S-X, Xiong R-G, Cheng J, Xu X-Y, Tang G-Y, Huang S-Y, et al. Preparation, antioxidant activities and bioactive components of kombucha beverages from golden-flower tea (*Camellia petelotii*) and honeysuckle-flower tea (*Lonicera japonica*). *Foods* [Internet]. 2023 [citado el 24 de mayo de 2024];12(16):3010. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37628009/>
31. Robles C., Muñoz R., Flores O., Heidy j.. Estudio del consumo de azúcares reductores durante la fermentación alcohólica del mosto de uva italia para la obtención de vino blanco. *Datos industriales*. 2016;19(2):104-110.[fecha de Consulta 26 de Mayo de 2024]. ISSN: 1560-9146. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81649428013>
32. Chakravorty S, Bhattacharya S, Chatzinotas A, Chakraborty W, Bhattacharya D, Gachhui R. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2016 [citado el 24 de mayo de 2024];220:63–72. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26796581/>
33. Cardoso RR, Neto RO, dos Santos D'Almeida CT, do Nascimento TP, Pressete CG, Azevedo L, et al. Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile,

- which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food Res Int* [Internet]. 2020 [citado el 24 de mayo de 2024];128(108782):108782. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31955755/>
34. Zou C, Li R-Y, Chen J-X, Wang F, Gao Y, Fu Y-Q, et al. Zijuan tea- based kombucha: Physicochemical, sensorial, and antioxidant profile. *Food Chem* [Internet]. 2021 [citado el 24 de mayo de 2024];363(130322):130322. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34147900/>
35. Dartora B, Crepalde LT, Hickert LR, Fabricio MF, Ayub MAZ, Veras FF, et al. Kombuchas from black tea, green tea, and yerba-mate decocts: Perceived sensory map, emotions, and physicochemical parameters. *Int J Gastron Food Sci* [Internet]. 2023;33(100789):100789. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijgfs.2023.100789>
36. Chen C, Liu BY. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2000 [citado el 24 de mayo de 2024];89(5):834–9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11119158/>
37. Barakat N, Bouajila J, Beaufort S, Rizk Z, Taillandier P, El Rayess Y. Development of a new kombucha from grape pomace: The impact of fermentation conditions on composition and biological activities. *Beverages* [Internet]. 2024 [citado el 24 de mayo de 2024];10(2):29. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2306-5710/10/2/29>
38. López-Astorga M, Molina-Domínguez CC, Ovando-Martínez M, Leon-Bejarano M. Orujo de Uva: Más que un Residuo, una Fuente de Compuestos Bioactivos. *Epistemus* [Internet]. 2023 [citado el 24 de mayo de 2024];16(33):115–22. Disponible en: <https://epistemus.unison.mx/index.php/epistemus/article/view/283>