

BÁRBARA CÔGO VENTURIM

**PRODUÇÃO DE KOMBUCHA A PARTIR DE DIFERENTES INÓCULOS
BRASILEIROS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: José Guilherme Prado Martin

Coorientadores: Wendel Batista da Silveira
Fábio Coelho Sampaio

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

V469p
2022
Venturim, Bárbara Côgo, 1996-
Produção de kombucha a partir de diferentes inóculos brasileiros /
Bárbara Côgo Venturim. - Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (65 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexo.

Inclui apêndices.

Orientador: José Guilherme Prado Martin.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Microbiologia, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.283>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Bebidas fermentadas. 2. Celulose bacteriana. I. Martin, José
Guilherme Prado, 1983-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-graduação em
Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 663.13

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523

BÁRBARA CÔGO VENTURIM

**PRODUÇÃO DE KOMBUCHA A PARTIR DE DIFERENTES INÓCULOS
BRASILEIROS**


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de fevereiro de 2022.

Assentimento:



Bárbara Côgo Venturim
Autora



José Guilherme Prado Martin
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre iluminar e guiar os meus passos, fazendo com que as coisas sempre aconteçam no tempo e momento certo.

Aos meus pais Marta Regina e Joel, e ao meu irmão Alextivane, os responsáveis pela minha formação como pessoa. Por todo apoio, incentivo e amor envolvido. Ao meu namorado Dhiego e família, que apesar da distância sempre estiveram ao meu lado durante este período, acolhendo nos momentos difíceis e incentivando nas oportunidades e desafios.

Às companheiras da República Tipo Fiona e agregados, Ana Peres, Bruna, Josiane, Luane, Hugo, Vitor, Dona Roseli e Carmen, por tornarem essa caminhada muito mais leve e divertida.

À Egrégora do Swásthya Yôga, em especial para Fernanda que sempre me colocava no eixo e auxiliava de forma indireta na busca pelas melhores escolhas na vida profissional e pessoal.

A todos os meus amigos de laboratório por todo companheirismo e por sempre ajudarem de alguma forma. Em especial para o Arthur, Neverton e André pelos experimentos, à Nívea por auxiliar nas análises de HPLC; à Isabelle e Marcella pelo cafezinho e as melhores risadas, choros e perrengues da vida do pós-graduando; e à Thamylles por sua importante colaboração no decorrer de todo o processo, desde as disciplinas até a finalização deste projeto.

Ao meu orientador Guilherme, pela orientação e todo conhecimento compartilhado, sua dedicação e cuidado fez toda a diferença e contribuiu muito para meu crescimento acadêmico. Aos meus coorientadores Wendel Batista da Silveira e Fábio Coelho Sampaio que foram imprescindíveis para a condução deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa (MG) e aos integrantes (professores e funcionários) do programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade de trabalhar neste projeto e fazer parte da história deste lugar lindíssimo. Aos voluntários da pesquisa, por doarem seus SCOBY e à empresa The Kombucha Hub pela doação do chá verde.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos. Por fim, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Obrigada a todos que contribuíram, tudo foi possível somente com o auxílio de cada um de vocês!

RESUMO

VENTURIM, Bárbara Côgo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2022. **Produção de kombucha a partir de diferentes inóculos brasileiros.** Orientador: José Guilherme Prado Martin. Coorientadores: Wendel Batista da Silveira e Fábio Coelho Sampaio.

Kombucha é uma bebida obtida pela fermentação de chá (*Camellia sinensis*) por um inóculo popularmente conhecido como SCOBY (*Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast*). No Brasil, a cultura de doações de SCOBY entre os produtores é amplamente difundida; somada às diferentes condições de fermentação, a diversidade de inóculos resulta em bebidas com características distintas. Neste trabalho, 30 amostras de SCOBY de diferentes regiões brasileiras foram utilizadas para produção de kombucha. No decorrer de 10 dias de fermentação, análises de pH e acidez total titulável (ATT) foram determinadas. As populações de leveduras, bactérias acéticas (BAA) e do ácido láctico (BAL) dos inóculos foram quantificadas ao término da fermentação. O teor de acidez volátil e as concentrações de ácido acético, ácido glicônico, ácido láctico e etanol foram determinadas, assim como as concentrações de sacarose, glicose e frutose residuais. Por fim, foram realizadas análises de rendimento, produtividade volumétrica e capacidade de retenção de água do material celulósico gerado após o período de fermentação. O pH das bebidas variou entre 2,38 e 4,82; a ATT entre 0,02 e 1,96% (p/v) e a acidez volátil entre 0,89 e 32,2 mEq/L. O ácido glicônico foi identificado como o principal ácido nas kombuchas, variando de 3,12 a 6,78% (p/v), seguido do ácido acético (0,18 a 0,53% p/v) e ácido láctico (0,01 a 0,08% p/v). Todas as kombuchas apresentaram baixo teor alcoólico, com exceção de K15 (0,83% v/v). Os açúcares residuais da kombucha variaram de 0,28 a 5,16% (p/v) para sacarose; 0,53 a 1,73% (p/v) para glicose e 0,22 e 1,44% (p/v) para frutose. As contagens dos grupos microbianos majoritários variaram de 6,68 a 10,03 Log UFC/g para BAA; de 6,48 a 9,35 Log UFC/g para BAL; e de 6,03 a 9,48 Log UFC/g para leveduras. Apesar da síntese de celulose bacteriana (CB) durante a fermentação da kombucha, a produtividade volumétrica foi relativamente baixa nas condições de fermentação avaliadas (0,001 a 0,012 g/L.h); em contrapartida, a capacidade de retenção de água foi alta (máxima de 98,54%). Tendo em vista a crescente produção industrial de kombucha e celulose bacteriana, os resultados obtidos neste trabalho podem contribuir para um maior entendimento acerca dos impactos dos parâmetros fermentativos na qualidade da bebida, bem como no rendimento da produção do material celulósico.

Palavras-chave: Bebida fermentada. SCOBY. Celulose bacteriana.

ABSTRACT

VENTURIM, Bárbara Côgo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2022. **Production of kombucha from different Brazilian inocula.** Advisor: José Guilherme Prado Martin. Co-advisors: Wendel Batista da Silveira and Fábio Coelho Sampaio.

Kombucha is a beverage obtained by fermenting tea (*Camellia sinensis*) by an inoculum popularly known as SCOBY (Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast). In Brazil, the culture of SCOBY donations among producers is widespread; besides different fermentation conditions, the SCOBY diversity results in beverages with distinct characteristics. In this work, 30 SCOBY samples from different Brazilian regions were used for kombucha production. During 10 days of fermentation, analyzes of pH and total titratable acidity (TTA) were determined. The populations of yeast, acetic bacteria (BAA) and lactic acid (LAB) in SCOBY samples were quantified at the end of fermentation. The volatile acidity content and the concentrations of acetic acid, gluconic acid, lactic acid and ethanol were determined, as well as the residual concentrations of sucrose, glucose and fructose. Finally, analyzes of yield, volumetric productivity and water retention capacity of the cellulosic material generated after the fermentation were performed. The pH of the beverages ranged from 2.38 to 4.82; the ATT from 0.02 to 1.96% (w/v) and the volatile acidity from 0.89 to 32.2 mEq/L. Gluconic acid was identified as the main acid in kombucha, ranging from 3.12 to 6.78% (w/v), followed by acetic acid (0.18 to 0.53% w/v) and lactic acid (0.01 to 0.08% w/v). All kombucha evaluated showed low alcohol content, except the K15 (0.83% v/v). Residual kombucha sugars ranged from 0.28 to 5.16% (w/v) for sucrose; from 0.53 to 1.73% (w/v) for glucose and from 0.22 and 1.44% (w/v) for fructose. The major microbial populations ranged from 6.68 to 10.03 Log CFU/g for BAA; from 6.48 to 9.35 Log CFU/g for BAL; and from 6.03 to 9.48 Log CFU/g for yeast. Despite the bacterial cellulose synthesis during the kombucha fermentation, its volumetric productivity was relatively low in the evaluated fermentation conditions (0.001 to 0.012 g/L.h); on the other hand, its water retention capacity was high (maximum of 98.54%). In view of the growing industrial production of kombucha and bacterial cellulose, the results obtained in this work may contribute to a better understanding of the impacts of fermentation parameters on the quality of the beverage, as well as on the production yield of the cellulosic material.

Keywords: Fermented beverage. SCOBY. Bacterial cellulose.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1

- Figura 1** – Sistema de produção artesanal em batelada de kombucha e microrganismos aderidos à celulose microbiana.....16
- Figura 2** - Fluxograma de produção da kombucha original.....17
- Figura 3** – Esquema ilustrativo das principais variáveis do processo produtivo da kombunha e seus impactos no produto final.....18
- Figura 4** – Esquema de produção de celulose bacteriana (CB). (a) Produção de CB pelo complexo de secreção característico de *K. xylinus*.....21
- Figura 5** – Esquema representativo dos efeitos da microbiota entre leveduras e bactérias durante a fermentação da kombucha.....22

Capítulo 2

- Figura 1** – Distribuição dos inóculos de kombucha obtidos a partir de doações provenientes de diferentes regiões do Brasil.....31
- Figura 2** – Replicação e padronização dos inóculos de kombucha.....32
- Figura 3** – pH das kombuchas durante 10 dias de fermentação.....39
- Figura 4** – (A) ATT das bebidas ao longo de 10 dias de fermentação.....41
- Figura 5** - Correlação entre os parâmetros pH e a ATT em relação a todos os inóculos analisados.....42
- Figura 6** – Placas (em duplicata) com crescimento de colônias de leveduras (esquerda), BAL (ao centro) e BAA (à direita) em meio de cultivo a partir da técnica de drop plate.....43
- Figura 7** – Quantificação dos microrganismos nos inóculos de kombucha.....45
- Figura 8** - Quantificação dos ácidos orgânicos e etanol sintetizados na kombucha fermentada por diferentes SCOBY durante 10 dias.....49
- Figura 9** – Concentração dos açúcares residuais na kombucha fermentada durante 10 dias.....52
- Figura 10** – Aspecto visual dos SCOBY de kombucha. (A) SCOBY formado após 10 dias de fermentação.....53
- Figura 11** – Material celulósico de SCOBY após o processo de liofilização.....54

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 – Parâmetros analíticos para kombucha produzida no Brasil.....15

Tabela 2 – Principais microorganismos identificados no SCOBY e no chá de arranque de kombuchas produzidas em diferentes países.....23

Capítulo 2

Tabela 1 - Formulação padrão e condições experimentais para avaliação da performance fermentativa dos inóculos de kombucha.....33

Tabela 2 - Rendimento de celulose, produtividade volumétrica e capacidade de retenção de água dos SCOBY formados após 10 dias de fermentação.....54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATT - Acidez Total Titulável

BAA – Bactérias do ácido acético

BAL - Bactérias do ácido lático

CB - Celulose Bacteriana

HPLC - Cromatografia Líquida e Alta Eficiência

IN - Instrução Normativa

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

NAOH – Hidróxido de Sódio

PQI - Padrão de Identidade e Qualidade

SCOBY - *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*

UDPGlc - Uridina Difosfoglicose

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	11
OBJETIVOS	12
Objetivo geral	12
Objetivos específicos	12
CAPÍTULO 1. REVISÃO: IMPACTO DAS CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO NA QUALIDADE DA KOMBUCHA	13
1. HISTÓRICO DA PRODUÇÃO DE KOMBUCHA E MERCADO ATUAL	13
2. PARÂMETROS LEGAIS DA PRODUÇÃO DE KOMBUCHA NO BRASIL.....	15
3. PRODUÇÃO DE KOMBUCHA	16
4. FATORES QUE INTERFEREM NO PROCESSO FERMENTATIVO	17
5. MICROBIOTA FERMENTADORA.....	20
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
REFERÊNCIAS	24
CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE FERMENTATIVA DE DIFERENTES INÓCULOS BRASILEIROS DE KOMBUCHA.....	29
1. INTRODUÇÃO.....	29
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
2.1. Obtenção dos SCOBY	31
2.2. Replicação e padronização dos SCOBY	32
2.3. Produção da kombucha.....	32
2.4. Avaliação da performance fermentativa dos SCOBY	33
2.4.1. Determinação do pH.....	33
2.4.2. Determinação da ATT	34
2.5. Quantificação dos grupos microbianos majoritários dos SCOBY	34
2.6. Caracterização de ácidos orgânicos e etanol da kombucha.....	34
2.7. Caracterização dos açúcares residuais da kombucha	35
2.8. Determinação da acidez volátil.....	35
2.9. Caracterização da celulose.....	36
2.10. Análises estatísticas	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38

4. CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS	57
APÊNDICE	62
ANEXO.....	65

INTRODUÇÃO GERAL

O mercado de bebidas fermentadas com propriedades funcionais encontra-se em expansão, em decorrência de uma crescente demanda, nos últimos anos, por um estilo de vida mais saudável. Nesse contexto, destaca-se a kombucha, que é obtida a partir da fermentação de infusões de folhas da espécie vegetal *Camellia sinensis*. O consumo crescente tem sido associado, em parte, aos potenciais benefícios atribuídos à sua ingestão, como modulação da microbiota intestinal, fonte de antioxidantes e vitaminas, detoxificação do organismo e fortalecimento do sistema imunológico (COSTA et al., 2021).

A produção da kombucha envolve a combinação de três tipos de fermentações do chá adoçado: acética (predominante), alcoólica e láctica (VILLARREAL-SOTO et al., 2018). A microbiota acética (BAA) é responsável, em grande parte, pela formação dos ácidos orgânicos ao longo do processo fermentativo, incluindo-se os ácidos acético e o glicônico (MOURA, 2019). Leveduras desempenham papel fundamental na fermentação alcoólica, produção de compostos aromáticos frutados e ésteres voláteis que conferem à bebida um aroma semelhante à sidra (MAYSER et al. 1995). Já as bactérias lácticas (BAL) contribuem para a síntese de compostos antimicrobianos (OZOGUL e HAMED, 2018) e de ácido láctico, que é percebido ao paladar como “levemente azedo” e “acre”, influenciando positivamente no sabor e aroma da kombucha (HARRISON e CURTIN, 2021).

A microbiota envolvida na fermentação da kombucha encontra-se estruturada em um biofilme celulósico popularmente conhecido como SCOBY (sigla para a expressão em inglês *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*), que é utilizado como inóculo no início da fermentação (JAYABALAN et al., 2014). Diferentes espécies de bactérias e leveduras já foram identificadas em inóculos de kombucha, como *Candida californica*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Metschnikowia pulcherrima* e *Acetobacter* spp. (SANTOS, 2016).

Além disso, a composição microbiana na bebida pode variar a depender da origem do inóculo, bem como do ambiente de processamento; tal variação, em conjunto com outras variáveis – como tipo de chá utilizado como substrato, concentração de sacarose e binômio tempo e temperatura – podem impactar diretamente na qualidade do produto final (WATAWANA et al., 2015; SANTOS, 2016). Por isso, controlar as condições do processo e compreender a influência da microbiota nas características físico-químicas da bebida é imprescindível para sua qualidade. Neste trabalho, foi realizada a caracterização de diferentes SCOBY de kombucha utilizados no Brasil e avaliados alguns parâmetros fermentativos no decorrer da produção da bebida.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Caracterizar amostras de SCOBY brasileiros de kombucha e avaliar sua influência no processo fermentativo e qualidade físico-química da bebida.

Objetivos específicos

- I. Coletar amostras de SCOBY de diferentes regiões do Brasil para construção de uma coleção de inóculos para produção de kombucha;
- II. Quantificar as populações de microrganismos majoritários dos SCOBY (leveduras, bactérias do ácido acético e bactérias do ácido lático);
- III. Avaliar e acompanhar a performance fermentativa de diferentes inóculos por meio da realização de análises físico-químicas;
- IV. Determinar o teor de ácidos voláteis e as concentrações dos principais ácidos orgânicos presentes nas bebidas fermentadas por diferentes inóculos de kombucha;
- V. Determinar o teor alcoólico das kombuchas ao final do processo fermentativo;
- VI. Determinar as concentrações dos açúcares residuais das kombuchas ao final do processo fermentativo;
- VII. Avaliar os rendimentos, produtividade volumétrica e capacidade de retenção de água do material celulósico dos SCOBY ao término da fermentação.

CAPÍTULO 1. REVISÃO: IMPACTO DAS CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO NA QUALIDADE DA KOMBUCHA

Resumo

Kombucha é uma bebida produzida a partir da fermentação de chá da espécie *Camellia sinensis* por uma cultura popularmente denominada SCOBY (*Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast*), resultando em uma bebida ácida, ligeiramente doce e carbonatada. Nos últimos anos, o aumento da demanda por alimentos mais saudáveis e a busca por produtos inovadores estimulou investimentos da indústria alimentícia na produção e comercialização da bebida. A kombucha apresenta elevadas concentrações de ácidos orgânicos e polifenóis, compostos que têm sido associados a potenciais benefícios à saúde. Tendo em vista a crescente produção industrial de kombucha no país, elucidar os processos metabólicos que ocorrem durante a fermentação poderá contribuir para um maior controle das variáveis fermentativas, resultando em melhoria da qualidade do produto. A presente revisão tem por objetivo abordar os aspectos históricos, econômicos e de produção da kombucha, destacando as variáveis do processo que impactam direta ou indiretamente nas características desta bebida fermentada.

1. HISTÓRICO DA PRODUÇÃO DE KOMBUCHA E MERCADO ATUAL

O chá (*Camellia sinensis*) corresponde à segunda bebida mais consumida do mundo, atrás apenas da água. As folhas, cultivadas em países de regiões tropicais e subtropicais, dão origem a sete grandes variedades da bebida, que apresentam aromas e sabores característicos, como o chá branco, amarelo, verde, *oolong*, preto, Jasmim e o escuro fermentado. Tais variedades resultam de diferentes níveis de oxidação, tempo de colheita e fermentação empregada nas folhas (CHANG, 2015). Os chás verde e preto merecem destaque no mercado mundial da bebida, contribuindo com um montante de US\$ 47,20 bilhões em 2020 (RESEARCH AND MARKETS, 2021). Neste mesmo ano, a quantidade total de chás produzidos ultrapassou 4,5 milhões de toneladas, cujos principais países produtores e exportadores correspondem à China, Índia, Quênia, Sri Lanka, Peru e Indonésia (FARRER'S TEA & COFFEE MERCHANTS, 2021). Apesar do Brasil não ter um grande mercado para o produto, sua produção concentra-se principalmente no Vale do Ribeira, no Estado de São Paulo, sendo quase toda sua produção exportada (NÓBREGA, 2020).

Além de sua importância histórica e econômica, o chá é a principal matéria-prima da kombucha. A produção envolve a fermentação desse substrato por uma cultura popularmente denominada SCOBY (*Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast*) (WATAWANA et al., 2015).

Após a fermentação, obtém-se a bebida, de carácter ácido, ligeiramente doce e carbonatada. Apesar do consumo estar relacionado a alguns países, como China, Rússia e Alemanha (BRUSCHI, SOUSA e MODESTO, 2018), este tem se expandido para praticamente todo o mundo.

Historicamente, sua produção tem sido relatada desde 220 a.C., na Manchúria; porém, como as rotas comerciais se estendiam além do Extremo Oriente, a kombucha foi levada para Rússia e Europa Oriental, sendo que durante a Segunda Guerra Mundial seu consumo se estendeu também para o Norte da África (GREENWALT, STEINKRAUS e LEDFORD, 2000). Neste mesmo período, a bebida já era conhecida na Itália, França e Espanha, porém com o racionamento de mantimentos durante a guerra – principalmente de chá e açúcar – a produção foi drasticamente afetada (JAYABALAN et al., 2014). Nos últimos anos, a crescente preocupação dos consumidores com questões relacionadas à saúde, bem como a maior demanda por alimentos com propriedades funcionais, tem estimulado a produção industrial de alimentos fermentados (MINTEL, 2017). Surgem, assim, novas oportunidades de negócios baseadas na comercialização de alimentos com propriedades funcionais.

A kombucha apresenta em sua constituição elevadas concentrações de ácidos orgânicos e polifenóis, compostos potencialmente responsáveis por benefícios à saúde, a saber: atividade anticancerígena, antidiabética, anticolesterolêmica, desintoxicante, melhora da imunidade e tratamento de úlceras gástricas (FILIPPIS, TROISE e ERCOLINI, 2018). Apesar da suposta relação do consumo de kombucha com propriedades funcionais, estudos em seres humanos são necessários para a confirmação de suas propriedades, uma vez que a maior parte dos estudos desenvolvida até o momento utilizou ensaios *in vivo* ou modelo animal (KAPP e SUMNER, 2019).

O mercado da kombucha alcançou valores superiores a US\$ 1,8 bilhão em 2020 e suas projeções para o ano de 2025 são de US\$ 5 bilhões (SELBYVILLE, 2020). No Brasil, a produção é realizada principalmente de forma artesanal. Todavia, a produção industrial está em franca expansão, com unidades produtoras nos estados do Rio de Janeiro, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e São Paulo (TISSOT, 2019). Diversas variedades de culturas podem ser encontradas no mercado para produção de kombucha; a empresa americana White Labs comercializa um inóculo caracterizado por média produção de ácido acético e baixa produção de álcool (WHITE LABS, 2020); já a Wellness Drinks comercializa o inóculo de origem alemã com outras características (WELLNESS DRINK, 2020). Porém, no Brasil, os inóculos geralmente são doados entre produtores adeptos da bebida, resultando, assim, em um produto

final com características distintas, tendo em vista a diversidade microbiana associada aos inóculos não padronizados e suas diferentes formas e locais de produção.

2. PARÂMETROS LEGAIS DA PRODUÇÃO DE KOMBUCHA NO BRASIL

Em setembro de 2019, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) divulgou a Instrução Normativa nº 41, na qual estabeleceu o Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) da kombucha em todo o território nacional (BRASIL, 2019). De acordo com esta IN, a kombucha é definida como “uma bebida fermentada obtida através da respiração aeróbia e fermentação anaeróbia do mosto obtido pela infusão ou extrato de *Camellia sinensis* e açúcares por cultura simbiótica de bactérias e leveduras microbiologicamente ativas (SCOBY)”. No momento da comercialização a bebida deve atender aos parâmetros físico-químicos estabelecidos, conforme Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros analíticos para kombucha produzida no Brasil.

Parâmetros	Mínimo	Máximo
pH	2,5	4,2
Graduação alcoólica (% v/v) kombucha sem álcool	-	0,5
Graduação alcoólica (% v/v) kombucha com álcool	0,6	8,0
Acidez volátil (mEq/L)	30	130
Pressão (atm a 20°C) na kombucha adicionada de CO ₂	1,1	3,9

Fonte: Brasil (2019).

São definidos como ingredientes obrigatórios: água potável, infusão ou extrato aquoso de *C. sinensis*, açúcares e SCOBY, com qualidade adequada para fermentação alcoólica e acética, desde que sua inocuidade seja garantida. Além disso, fica permitido o uso de ingredientes opcionais, como infusões de espécies vegetais em água, ou seus extratos; frutas, vegetais, especiarias, mel, melado e outros açúcares de origem vegetal, desde que a denominação de venda do produto no momento da comercialização indique todos os ingredientes obrigatórios e opcionais adicionados, como por exemplo: “KOMBUCHA DE (nome da(s) espécie(s) vegetal(is), se houver, associada a *Camellia sinensis*) COM (nome do(s) ingrediente(s) opcional(is) COM AROMA DE (nome do aditivo aromatizante natural)

GASEIFICADA (se adicionada de gás carbônico), COM ÁLCOOL (se contiver álcool acima de 0,5% v/v)”, seguindo obrigatoriamente esta ordem.

A IN também proíbe o uso de alegações funcionais e de saúde não autorizadas pela legislação específica da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), como “bebida viva”, “bebida probiótica”, “elixir da vida”, dentre outras denominações que possam atribuir características de qualidade superlativas e propriedades funcionais não comprovadas em seres humanos. Além disso, fica proibida a utilização de embalagens que remetam a produtos farmacêuticos ou com propriedades terapêuticas, como conta-gotas ou ampolas.

3. PRODUÇÃO DE KOMBUCHA

A produção de kombucha ocorre, majoritariamente, em escala artesanal, a partir do cultivo em batelada à temperatura de 20 a 30 °C em recipientes de vidro cobertos com um tecido poroso de maneira a permitir a aeração do sistema sem que haja contaminação por insetos e sujidades físicas (Figura 1); no entanto, também pode ser realizada em escala industrial ou laboratorial, utilizando-se fermentadores e biorreatores, respectivamente (PALUDO, 2017). A produção artesanal de kombucha se disseminou ao redor do mundo, sobretudo pela doação de SCOBY entre amigos e familiares, com a possibilidade de aquisição comercial de inóculos relativamente padronizados.

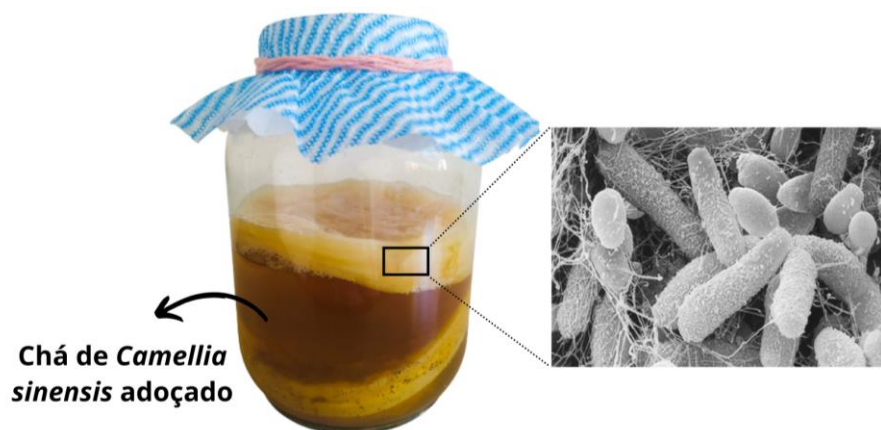


Figura 1 - Sistema de produção artesanal em batelada de kombucha e microrganismos aderidos à celulose microbiana. Fonte: Adaptado de GREENWALT, STEINKRAUS e LEDFORD (2000).

Independentemente do modelo produtivo, o modo de preparo e os cuidados durante a manipulação são basicamente os mesmos. As proporções dos ingredientes utilizados no preparo

da bebida variam, sendo geralmente utilizados de 8 a 12 g/L de folhas secas de *Camellia sinensis*, 50 a 150 g/L de sacarose, 100 mL/L de chá (10% v/v) previamente fermentado em uma batelada anterior – fração conhecida popularmente como “chá de arranque”, responsável pela redução imediata do pH do meio, diminuindo os riscos de contaminação por microrganismos indesejáveis – além de 100 g/L de SCOBY (VĪNA et al., 2013). O fluxograma com as etapas gerais da produção de kombucha é apresentado na Figura 2. Durante o processo fermentativo, a microbiota do SCOBY e chá de arranque são responsáveis pela fermentação alcoólica, láctica e, predominantemente, acética (VILLARREAL-SOTO et al., 2018).

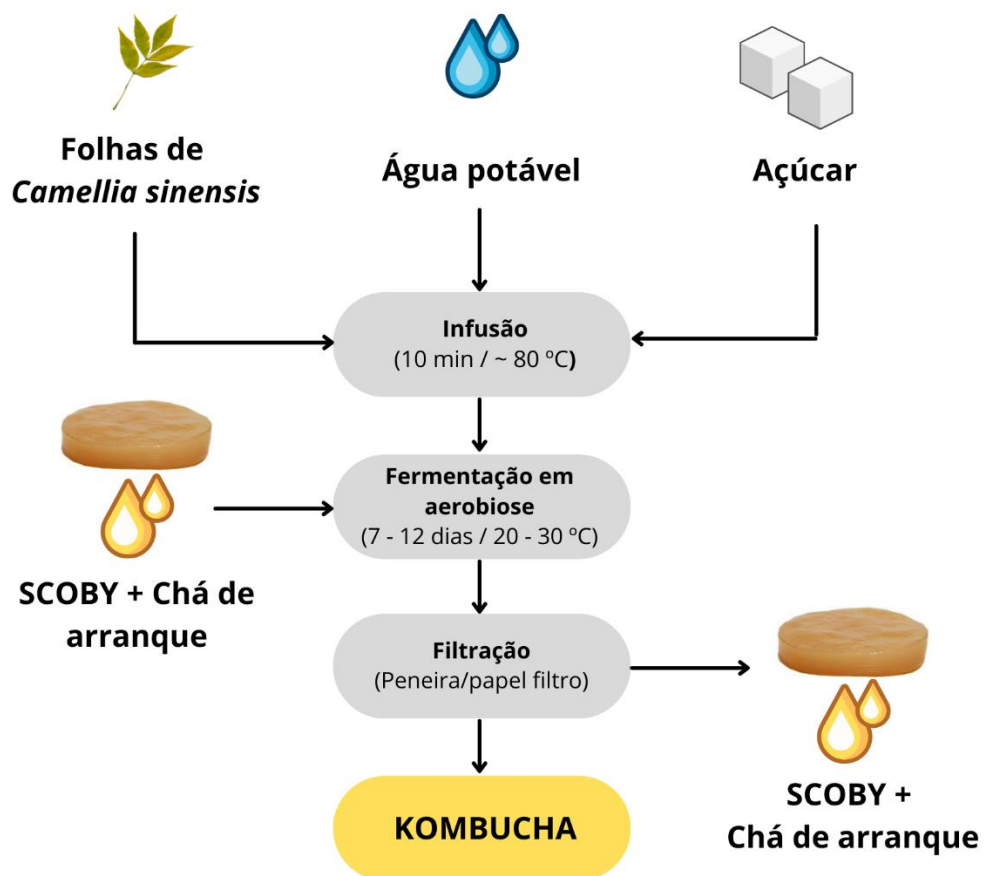


Figura 2 - Fluxograma de produção da kombucha original. Fonte: autoria própria.

4. FATORES QUE INTERFEREM NO PROCESSO FERMENTATIVO

A produção da kombucha pode sofrer influência de diferentes fatores ao longo da fermentação, como concentração de açúcar e tipo de chá utilizado (WATAWANA et al., 2015), binômio tempo e temperatura empregado durante o processo (CHEN e LIU, 2000; JAYABALAN et al., 2008), dimensões das cubas de fermentação (o uso de fermentadores com

maior abertura tende a resultar em maior disponibilidade de oxigênio e conseqüentemente na redução do tempo de fermentação aeróbica) (GOH et al., 2012), dentre outros. Tais variáveis impactam diretamente na composição e concentração de metabólitos na bebida, conforme destacado na Figura 3.

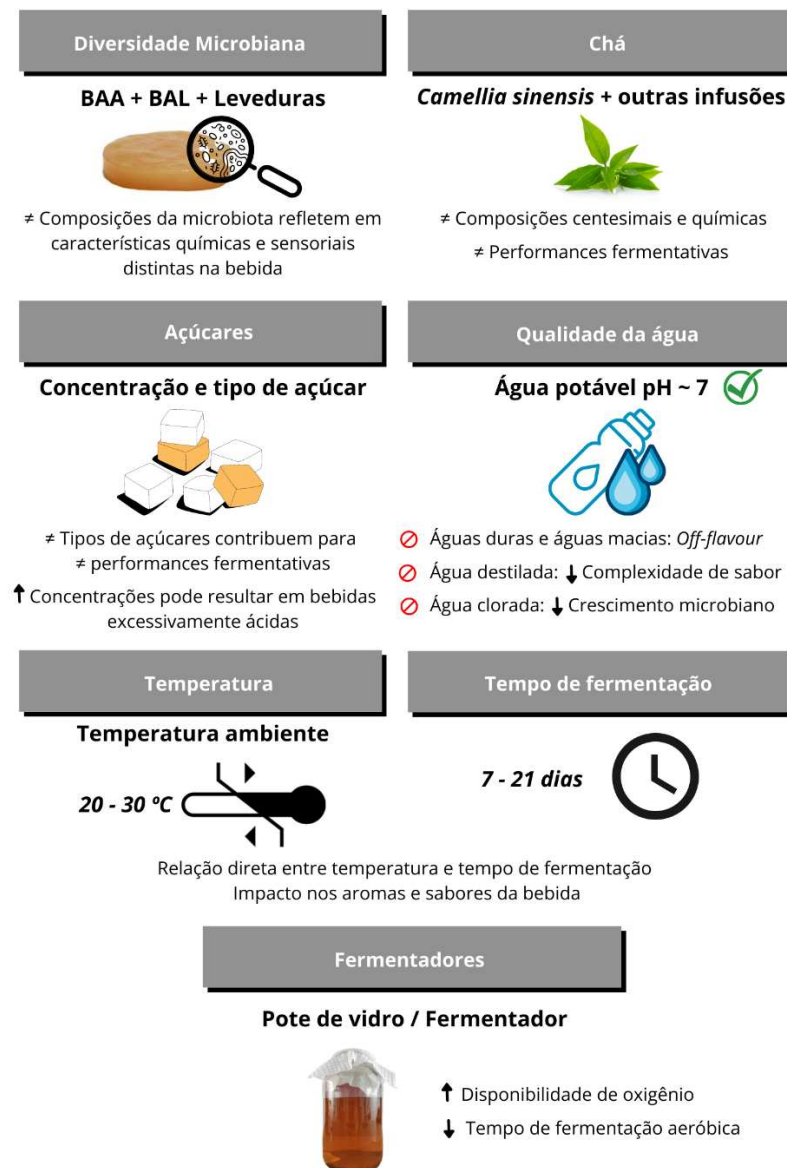


Figura 3 - Esquema ilustrativo das principais variáveis do processo produtivo da kombucha e seus impactos no produto final. Fonte: Autoria própria.

Em relação ao chá, suas composições centesimal e química podem variar, dependendo de fatores como origem e condições de cultivo, estágio de colheita e tipo de processamento pós-colheita (BELITZ, GROSCH e SCHIEBERLE, 2009). Assim, ainda que provenientes de uma mesma espécie, os diferentes tipos de chá existentes podem apresentar concentrações de

minerais, vitaminas, polifenóis e flavonoides com diferenças significativas. Hou et al. (2006) observaram que o chá verde apresentou maior conteúdo de antioxidantes e de compostos com atividade biológica de interesse quando comparado ao chá preto e *oolong*. Além disso, as formulações da bebida fermentada à base de chá verde resultaram em maiores produções de ácidos orgânicos em uma performance fermentativa mais eficiente em comparação ao chá preto (WATAWANA et al., 2015).

Apesar dos chás serem tradicionalmente utilizados para o preparo da kombucha, o uso de outras infusões de ervas tem sido avaliado, como por exemplo erva-cidreira (VELIĆANSKI et al., 2007), erva-mate (PALUDO, 2017), flor de café (KANNIAH, 2020) e hibisco (SANTOS et al., 2018). No entanto, o uso de outros substratos que não *C. sinensis* só é permitido como espécie vegetal adjuvante da fermentação (BRASIL, 2019). Ainda se tratando de matérias-primas, a sacarose é a principal fonte de carbono e energia para a microbiota. Estudos demonstram que a utilização de açúcar branco resultou em maior redução nos valores de pH em comparação ao mascavo e ao mel devido à maior disponibilidade de sacarose (NASCIMENTO e LIMA, 2019). No entanto, quantidades excessivas de carboidrato podem resultar em bebidas excessivamente ácidas (PALUDO, 2017), prejudicando suas características sensoriais.

Outro aspecto relevante a ser considerado é o tipo de água utilizado; uma vez que esta corresponde a mais de 90% do produto, o controle de sua qualidade é imprescindível para uma bebida que atenda aos padrões de identidade e qualidade (VENTURINI, 2011). Desta forma, não é recomendado o emprego de água com concentrações elevadas e/ou baixas de carbonato de cálcio e magnésio (denominadas de água dura e macia, respectivamente), uma vez que a falta de equilíbrio destes sais pode influenciar no sabor e aroma, resultando em *off-flavour*, conferindo gosto salgado e formação de agregados indesejáveis que podem impactar diretamente na homogeneidade da bebida (SANTOS, 2016).

Não se recomenda também o uso de água com ausência de compostos minerais (como água destilada), visto que estes conferem complexidade de sabor ao produto, bem como água tratada à base de compostos clorados, pois os mesmos impactam negativamente no crescimento microbiano desejável (MCGEE, 2004). Recomenda-se, portanto, o uso de água mineral com pH próximo da neutralidade e de boa procedência (SCHROEDER, 2019), ou, ainda, água de rede local, desde que filtrada em sistemas com diferentes estágios de carvão ativado para remoção do cloro, amplamente empregados em cervejarias (GUIMARÃES, 2020).

Por fim, diferentes combinações de tempo e temperatura de fermentação são praticadas, geralmente variando de 7 a 21 dias (FILIPPIS et al., 2018) e com faixas de

temperatura entre 20 e 30 °C (CHU e CHEN, 2006). No Brasil, como a produção ocorre principalmente no âmbito artesanal à temperatura ambiente, variações consideráveis são observadas a depender da região do país; ainda que não haja padronização quanto ao binômio ideal, o término da fermentação pode ser determinado a partir da medida do pH (desde que atenda à IN vigente), bem como das características sensoriais desejadas, como por exemplo, a acidez perceptível à boca (NUMMER, 2013).

5. MICROBIOTA FERMENTADORA

Os inóculos utilizados para produção de kombucha apresentam em sua constituição microfibrilas de celulose que no geral são sintetizadas por bactérias acéticas (BAA), principalmente *Komagataeibacter xylinus*, anteriormente denominada *Acetobacter xylinum* (JAYABALAN et al., 2014). BAA compreendem bactérias gram-negativas aeróbicas, que podem utilizar açúcares ou etanol como substrato para produção de ácido acético (JAYABALAN et al., 2008). Dentre as principais espécies relacionadas à fermentação da kombucha, destacam-se: *Komagataeibacter xylinus*, *Gluconacetobacter xylinus*, *Acetobacter xylinoides*, *Bacterium gluconicum*, *Acetobacter aceti* e *Acetobacter pasteurianus* (BALENTINE, WISEMAN e BOUWENS, 1997; DUFRESNE e FARNWORTH, 2000).

No início da fermentação aeróbica da kombucha, bactérias produtoras de celulose se multiplicam na superfície do líquido, consumindo o oxigênio dissolvido, e, assim, produzindo celulose de forma mais acelerada. Com o passar do tempo, a espessura da membrana é aumentada pela deposição de novas camadas de celulose na superfície (Figura 4A), resultando em estruturas tridimensionais suspensas na interfase ar-líquido (RUKA, SIMON e DEAN, 2012). Desta forma, a celulose bacteriana (CB) permanece ligada às células bacterianas; esse processo inclui a síntese de uridina difosfoglicose (UDPGlc), precursor da celulose, sendo que em média cada célula de *K. xylinus* polimeriza até 200.000 resíduos de glicose por segundo em cadeiras de β -1,4-glicana por meio do complexo proteico de síntese de celulose (VILLARREAL-SOTO, 2018), conforme ilustrado na Figura 4B.

CB apresenta estrutura com alto grau de polimerização, devido à organização de suas microfibrilas e nanofibrilas até 100 vezes mais finas em comparação à celulose de origem vegetal (OLIVEIRA et al., 2016). Essas características resultam em um material de alta resistência mecânica, elevada capacidade de retenção de água e alto índice de cristalinidade (80-90%) (GREGORY et al., 2021). Destaca-se também seu alto grau de pureza; tal característica decorre da ausência de hemicelulose, pectina e lignina em sua composição,

conferindo vantagens quanto à purificação e aplicação industrial (RAHMAN e NETRAVALI, 2016).

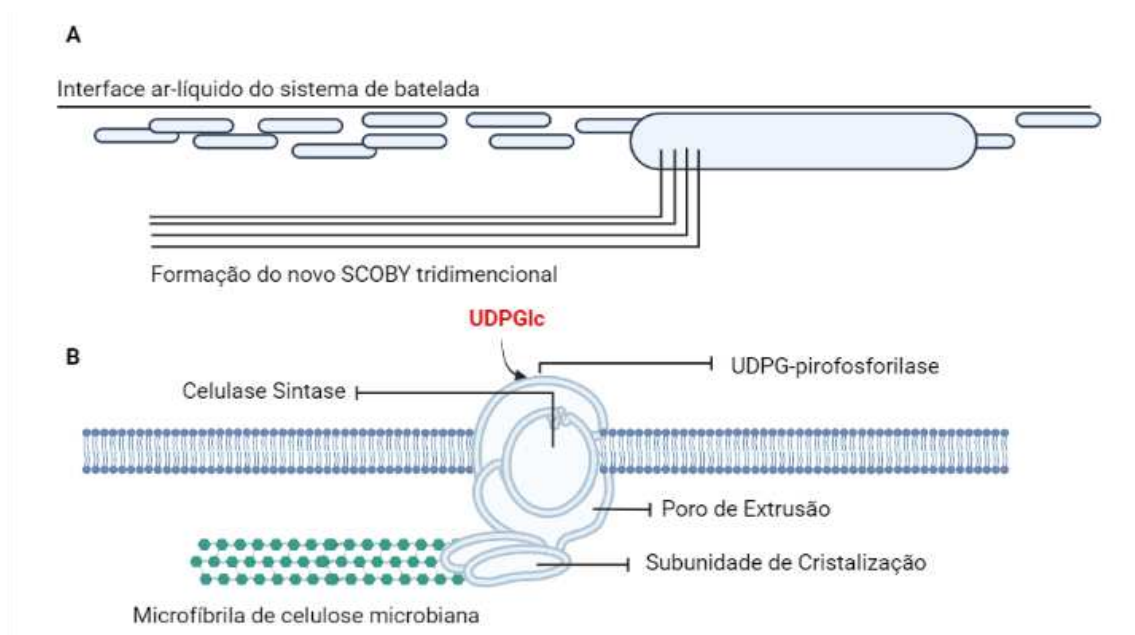


Figura 4 - Esquema de produção de celulose bacteriana (CB). (a) Produção de CB pelo complexo de secreção característico de *K. xylinus* (b). Fonte: autoria própria, com informações de RUKA, SIMON e DEAN (2012); VILLARREAL-SOTO (2018) e DONINI et al. (2010).

Leveduras, em estreita relação com BAA, também desempenham papel relevante. São responsáveis pela hidrólise enzimática extracelular da sacarose em glicose e frutose, produzindo CO₂ e traços de etanol (JAYABALAN et al., 2014). Além disso, sintetizam compostos aromáticos frutados e ésteres voláteis que conferem à bebida um aroma semelhante à sidra (MAYSER et al., 1995). Dentre as espécies mais recorrentes, destacam-se *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces ludwigii*, *Kloeckera apiculata*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces lambicus*, *Brettanomyces custersii* e *Candida stellate* (PALUDO, 2017).

Simultaneamente, BAA são responsáveis pela produção da película celulósica (SCHROEDER, 2019), transformação da glicose em ácido glicônico e da frutose em ácido acético, além de outros ácidos orgânicos, resultando em redução do pH e impactando diretamente no gosto ácido (NEFFE-SKOCINSKA et al., 2017). Diversos estudos têm indicado uma variedade de ácidos orgânicos presentes na bebida ao final da fermentação, incluindo os ácidos acético, cítrico, fólico, glicônico, glicurônico, láctico, málico, malônico, oxálico, pirúvico

e tartárico (MOURA, 2019). Além de utilizarem glicose e frutose como fonte de carbono e energia, BAA podem utilizar etanol como fonte de energia para seu crescimento; sendo assim, o carbono resultante da fermentação de açúcares será direcionado para a produção de mais ácido acético e celulose bacteriana (CHEN e LIU, 2000). As modificações do substrato durante a fermentação são decorrentes, portanto, deste consórcio microbiano que atua de maneira simbiótica (BRUINI et al., 2019), conforme esquematizado na Figura 5.

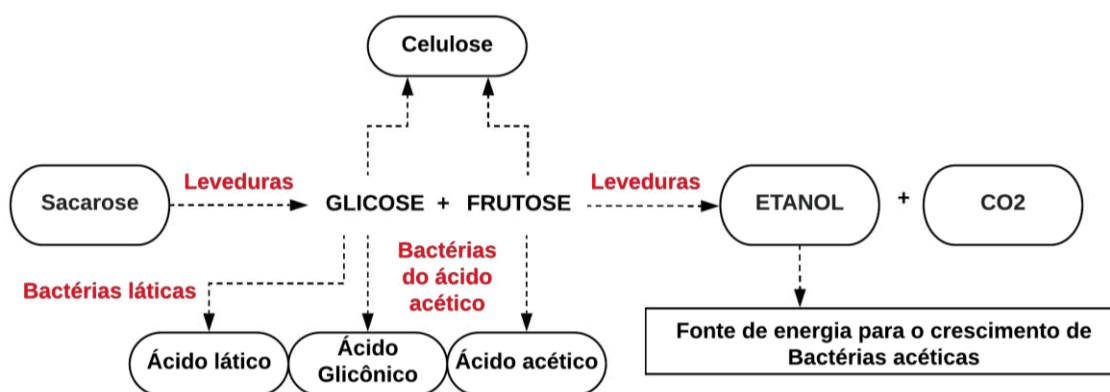


Figura 5 - Esquema representativo dos efeitos da microbiota entre leveduras e bactérias durante a fermentação da kombucha. Fonte: Adaptado de Villarreal-Soto (2018) e Markov et al. (2003).

Apesar do pouco destaque na fermentação da kombucha, bactérias do ácido-lático (BAL) podem desempenhar papel relevante do ponto de vista de qualidade e segurança do produto, à medida que estão relacionadas à produção de compostos antimicrobianos (como bacteriocinas, capazes de controlar o crescimento de microrganismos potencialmente patogênicos) (OZOGUL e HAMED, 2018), bem como ácido lático, que pode suavizar o aroma e o sabor da bebida, resultando em uma sensação referida como “levemente azeda” e “acre” (HARRISON e CURTIN, 2021).

A composição da microbiota fermentadora pode variar consideravelmente a depender da constituição inicial do SCOBY e do chá de arranque, bem como da contribuição da microbiota do ambiente de processamento (SANTOS, 2016), resultando em características químicas e sensoriais distintas na bebida. Na Tabela 2, são apresentados resultados acerca da diversidade microbiana envolvida na fermentação da kombucha produzida em diferentes países.

Tabela 2 - Principais microrganismos identificados no SCOBY e no chá de arranque de kombuchas produzidas em diferentes países.

Países	Bactérias predominantes	Leveduras predominantes	Referências
Arábia Saudita	<i>Acetobacter xylinum</i> <i>Acetobacter pasteurianus</i>	<i>Candida guilliermondii</i> <i>Candida kefyr</i> <i>Saccharomyces ludwigii</i>	Jayabalan <i>et al.</i> (2014)
Irlanda	<i>Gluconacetobacter</i> sp. <i>Lactobacillus</i> sp. <i>Thermus</i> sp. <i>Lactococcus</i> sp.	<i>Zygosaccharomyces</i> sp. <i>Dekkera</i> sp.	Marsh <i>et al.</i> (2014)
Itália	<i>Komagataeibacter intermedius</i> <i>Komagataeibacter rhaeticus</i>	<i>Zygosaccharomyces parabailli</i> <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Gaggia <i>et al.</i> (2018)
Ucrânia	<i>Lactobacilli</i> sp. <i>Halomonas</i> spp. <i>Herbaspirillum</i> spp.	<i>Candida stellata</i> <i>Pichia</i> sp.	Reva <i>et al.</i> (2015)
Austrália	<i>Acetobacter xylinum</i>	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> <i>Torulospora delbreuckii</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Teoh, Heard e Cox <i>et al.</i> (2004)
Brasil	<i>Acetobacter tropicalis</i> <i>Pseudoalteromonas</i> sp. <i>Halomonas</i> sp. <i>Vibrio</i> sp.	<i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Pichia oxidentalis</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> <i>Brettanomyces anomalus</i>	Zhang (2019)

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista a crescente produção industrial de kombucha, uma maior compreensão sobre os processos metabólicos ao longo da fermentação é fundamental para futuras otimizações, bem como para a melhoria da qualidade da bebida, impactando positivamente nos atributos sensoriais e no rendimento da produção. Diferentes parâmetros podem ser modulados durante o processo fermentativo, como tipo de SCOBY utilizado, manutenção adequada, binômio tempo e temperatura, concentração de açúcares no substrato fermentativo, procedência do chá utilizado na produção, bem como aspectos de dimensionamento dos recipientes fermentadores, dentre outros. Além disso, durante a fermentação são observadas transformações tanto no substrato fermentativo (chá) quanto na fração sólida composta de celulose bacteriana, material que vem ganhando destaque por ser uma alternativa à celulose vegetal, correspondendo, portanto, a um produto mais sustentável a ser explorado industrialmente cada vez mais nos próximos anos.

REFERÊNCIAS

- BALENTINE, D. A.; WISEMAN, S. A.; BOUWENS, L. C. M. The chemistry of tea flavonoids. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, n.37, v. 8, p. 693–704, 1997. doi: 10.1080/10408399709527797
- BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**, Berlin, Alemanha: Springer Medizin Verlag, 2009.
- BRASIL, Instrução Normativa n. 41 de 17 de setembro de 2019. Estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha em todo o território nacional. Brasília, 17 set. 2019. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-41>>. Acesso em Jan 2022.
- BRUINI, B. et al. Aspectos físico-químicos e microbiológicos no processo de fabricação da kombucha. **Revista Engenharia**, p. 48-67, 2019.
- BRUSCHI, J. S.; SOUSA, R. C. S. S.; MODESTO, K. R. “O Ressurgimento Do Chá De Kombucha”. **Revista De Iniciação Científica E Extensão**, p. 8-162, 2018.
- CHANG, K. **World tea production and trade: Current and future development**. 2015. Disponível em: <<https://www.fao.org/3/i4480e/i4480e.pdf>>. Acesso em Jan 2022.
- CHEN, C.; LIU, B. Y. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 834-839, 2000. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.01188.x
- CHU, S. D.; CHEN, C. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. **Food Chemistry**, v. 98, n. 3, p. 502-507, 2006. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.05.080
- COSTA, M. A. C. et al. Effect of kombucha intake on the gut microbiota and obesity-related comorbidities: A systematic review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2021. doi: <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1995321>
- DONINI, I. A. N. et al. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química**, v. 35, v. 4, pág. 165-178, 2010. doi: 10.1590/s0100-46702010000400021
- DUFRESNE, C.; FARNWORTH, E. Tea, kombucha, and health: a review. **Food Research International**, v. 33, p. 409-21, 2000. doi: 10.1016/s0963-9969(00)00067-3
- FARRER’S TEA & COFFEE MERCHANTS. **Top 10 Tea producing countries in the world 2021**. Disponível em: <<https://farrerscoffee.co.uk/top-10-tea-producing-countries-in-the-world-2020>>. Acesso em: 02 Mai 2021.
- FILIPPIS, F.; TROISE, P. V.; ERCOLINI, D. Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. **Food Microbiology**, v. 73, p. 11-16, 2018. doi: 10.1016/j.fm.2018.01.008

GAGGIÀ, F. et al. Kombucha Beverage from Green, Black and Rooibos Teas: A Comparative Study Looking at Microbiology, Chemistry and Antioxidant Activity. **Nutrients**, v. 11, n. 1, p. 1-22, 2018. doi:10.3390/nu11010001

GOH, W. N. et al. Fermentation of black tea broth (Kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose. **International Food Research Journal**, p. 109-117, 2012.

GREENWALT, C. J.; STEINKRAUS, K. H.; LEDFORD, R. A. Review - Kombucha, the Fermented Tea: Microbiology, Composition, and Claimed Health Effects. **Journal of Food Protection**, p. 976-981, v. 63, n. 7, 2000. doi: 10.4315/0362-028x-63.7.976

GREGORY, D. A. et al. Bacterial cellulose: A smart biomaterial with diverse applications. **Materials Science and Engineering**, v. 145, p. 10 – 63, 2021. doi: 10.1016/j.mser.2021.100623

GUIMARÃES, C. M. **Manual Prático para Cervejeiros iniciantes**. Urupema: Instituto Federal de Santa Catarina campus Urupema, 2020. Disponível em:<https://repositorio.ifsc.edu.br/bitstream/handle/123456789/2338/Claudionei_Guimar%C3%A3es_TCC_TBA_2021.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em fev. 2022.

HARRISON, K.; CURTIN, C. Microbial Composition of SCOBY Starter Cultures Used by Commercial Kombucha Brewers in North America. **Microorganisms**, v. 9, p. 10 – 60, 2021. doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051060>

HOU, D. et al. Comparison of the Antioxidation Effects of Green Tea, Black Tea and Wulong Tea. **Journal Food Science**, p. 9 - 551, 2006. Disponível em: <https://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotal-SPKX200603017.htm>. Acesso em Jan 2022.

JAYABALAN, R. et al. A review on kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 1, p. 538-550, 2014. doi: 10.1111/1541-4337.12073

JAYABALAN, R. et al. Preservation of kombucha tea: effect of temperature on tea components and free radical scavenging properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 19, p. 9064 - 9071, 2008. doi: 10.1021/jf8020893

KAPP, J.M.; SUMNER, W. Kombucha: a systematic review of the empirical evidence of human health benefit. *Annals of Epidemiology*, v. 30, p. 66-70, 2019. doi: 10.1016/j.annepidem.2018.11.001

KANNIAH, J. **Una Tostaduría de Brasil Lanza la Kombucha de Flor de Café**. Disponível em:<<https://perfectdailygrind.com/es/2020/05/13/una-tostaduria-de-brasil-lanza-la-kombucha-de-flor-de-cafe/>>. Acesso em Mai, 2020.

MARKOV, S. L. et al. Kombucha - Funkcionalni napitak: Sastav, Karakteristike i proces biotransformacije. **Hemijska industrija**, p. 456 - 462, 2003. Disponível em: <<http://scindeks.ceon.rs/article.aspx?artid=0354-75310310456s>>. Acesso em Jan 2022.

MARSH, A. J. et al. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. **Food Microbiology**, v. 38, p. 171–178, 2014. doi: 10.1016/j.fm.2013.09.003

MAYSER, P. et al. The yeast spectrum of the “tea fungus Kombucha”. **Mycoses**, p. 289 - 295, 1995. doi: 10.1111/j.1439-0507.1995.tb00410.x

MCGEE, H. **On Food and Cooking: The Science and Lore of the Kitchen**. Nova York, NY: Scribner, 2004. ISBN: 1416556370.

MINTEL. **Alimentar de maneira saudável dentro e fora de casa**, 2017. Disponível em:<<https://store.mintel.com/alimentacao-saudavel-tendencias-brasil-dezembro-2016>>. Acesso em abr. 2021.

MOURA, A. B. **Monitoramento do processo fermentativo da kombucha de chá Mate**. Vitória de Santo Antão: Universidade Federal de Pernambuco, 2019. Disponível em:<<https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/33633/1/MOURA%2C%20%20Aurea%20Barbosa%20de.pdf>>. Acesso em mai. 2020.

NASCIMENTO, L. C.; LIMA, M. D. **Influência de fontes de açúcar sobre as propriedades físicas do kombucha**. XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica (Universidade Federal de Uberlândia). São Paulo: Blucher, 2019. Disponível em:<<https://www.proceedings.blucher.com.br/article-details/influncia-de-diferentes-fontes-de-acar-sobre-as-propriedades-fsicas-do-kombucha-31041>>. Acesso em jun. 2020.

NEFFE-SKOCINSKA, K. et al. Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. **Journal CyTA - Journal of Food**, v. 15, n. 4, p. 601 - 607, 2017. doi: 10.1080/19476337.2017.1321588

NÓBREGA, E. A. **A história da plantação de chá no Vale do Ribeira**. 2020. Disponível em:<<https://www.ovaledoribeira.com.br>>. Acesso em mai. 2021.

NUMMER, B. A. Kombucha brewing under the food and drug administration model food code: risk analysis and processing guidance. **Journal of Environmental Health**, p. 8-11, 2013.

OLIVEIRA, B. et al. A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 406 - 420, 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.059>

ÖZOGUL, F.; HAMED, I. The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amines formation: a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 58, p. 1660-1670, 2018. doi: 10.1080/10408398.2016.1277972

PALUDO, N. **Desenvolvimento e Caracterização de kombucha obtida a partir de chá verde e extrato de erva-mate: processo artesanal e escala laboratorial**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017. Disponível em:<<https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/174899>>. Acesso em mai. 2020.

RAHMAN, M. M.; NETRAVALI, A. N. Aligned bacterial cellulose arrays as “Green” nanofibers for composite materials. **ACS Macro Letters**, n. 5, v. 9, p. 1070-1074, 2016. doi: <https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.6b00621>

RESEARCH AND MARKETS. **Tea Market: Global Industry Trends, Share, Size, Growth, Opportunity and Forecast 2021-2026**. 2021. Disponível em: <<https://www.researchandmarkets.com/reports/5401340/tea-market-global-industry-trends-share-size>>. Acesso em jan. 2022.

RUKA, D. R.; SIMON, G. P.; DEAN, K. M. Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 2, p. 613 – 622, 2012. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.03.059

SANTOS, C. et al. Bacterial nanocellulose membranes combined with nisin: a strategy to prevent microbial growth. **Cellulose**, p. 6681-6689, 2018. doi: 10.1007/s10570-018-2010-1

SANTOS, M. J. **Kombucha: Caracterização da microbiota e desenvolvimento de novos produtos alimentares para uso em restauração**. Portugal: Universidade de Lisboa, 2016. Disponível em: <https://run.unl.pt/bitstream/10362/19346/1/Santos_2016.pdf> Acesso em mai. 2020.

SANTOS, Y. M. A. et al. Chemical Characterization of Kombucha based on hibiscus and black tea. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 8, n. 3, p. 32 - 37, 2018. Disponível em: <<https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/REBAGRO/article/view/6365>>. Acesso em jan. 2022.

SCHROEDER, J. **Kombucha fermentada a partir de resíduos de acerola**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2019. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/199730/TCC-%20J%C3%A9ssica%20Schroeder.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em mai. 2020.

SELBYVILLE, D. **Crescimento da previsão do mercado de Kombuchá em 16% CAGR até 2025: Global Market Insights**, 2020. Disponível em: <<https://www.prnewswire.com/news-releases/growth-of-kombucha-market-forecast-at-16-cagr-up-to-2025-global-market-insights-inc-300986945.html>>. Acesso em mai. 2021.

TEOH, A. L.; HEARD, G.; COX, J. Ecology of Kombucha Fermentation Yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, n. 2, p. 119 – 126, 2004. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12

TISSOT, J. M. **Plano de Negócio: Bubble's**. Nova Hartz: Universidade do Sul de Santa Catarina, 2019. Disponível em: <<https://repositorio.animaeducacao.com.br/handle/ANIMA/11623>>. Acesso em jul. 2020.

VELIĆANSKI, A. S. V. et al. Antimicrobial and activity of lemon balm kombucha. **Acta Periodica Technologica**, p. 1-190, 2007. doi: 10.2298/APT0738165V

VENTURINI, W. G. **Indústria de bebidas: inovação, gestão e produção**. São Paulo: Blucher, 2011.

VILLARREAL-SOTO, S. et al. Understanding kombucha tea fermentation: a review. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 3, p. 580-588, 2018. doi: 10.1111/1750-3841.14068

VĪNA, I. et al. Glucuronic acid containing fermented functional beverages produced by natural yeasts and bacteria associations. **International Journal of Recent Research and Applied Studies**, p. 17–25, 2013.

WATAWANA, M. I. et al. Health, wellness, and safety aspects of the consumption of kombucha. **Journal of Chemistry**, p. 1 - 11, 2015. doi: 10.1155/2015/591869

WELLNESS DRINK. **Make your own Kombucha**. 2020. Disponível em: <<https://wellness-drinks.de/en/kombucha-interesting-facts.html>>. Acesso em jun. 2020.

WHITE LABS. **WLP600 Kombucha SCOBY**. 2020. Disponível em: <<https://whitelabs.com/yeast-bank/wlp600-kombucha-scooby>>. Acesso em jun. 2020.

ZHANG, J. **A comprehensive study on Kombucha and its analogues**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2019. Disponível em: <<http://repositorio.ufla.br/bitstream>>. Acesso em abr. 2021.

CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE FERMENTATIVA DE DIFERENTES INÓCULOS BRASILEIROS DE KOMBUCHA

1. INTRODUÇÃO

Kombucha é uma bebida fermentada produzida à base de chá (*Camellia sinensis*) por meio de um inóculo popularmente conhecido como SCOBY (*Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast*) (WATAWANA et al., 2015). De caráter acético, apresenta acidez e gosto característicos; sua produção e consumo têm crescido nos últimos anos em todo o mundo, com valores superiores a US\$ 1,8 bilhão em 2020 e projeções para o ano de 2025 da ordem de US\$ 5 bilhões (SELBYVILLE, 2020). No país, a bebida deve atender ao Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) da kombucha produzida em todo o território nacional, de acordo com a Instrução Normativa nº 41 (BRASIL, 2019), que determinou os parâmetros físico-químicos para o produto final no momento da comercialização.

Diversas variedades de inóculos para produção de kombucha podem ser encontradas no mercado; no Brasil, geralmente são adquiridos por meio de doações entre produtores da bebida, resultando, assim, em um produto com características distintas, tendo em vista a diversidade microbiana dos inóculos não padronizados e suas diferentes formas e locais de preparo (SANTOS, 2016). A microbiota envolvida na fermentação da kombucha realiza simultaneamente as fermentações alcoólica, láctica e acética, esta última a predominante (VILLARREAL-SOTO et al., 2018; BRUINI et al., 2019).

Bactérias acéticas (BAA) são responsáveis pela produção significativa de ácidos orgânicos, especialmente acético, cítrico, fólico, glicônico, glicurônico, málico, malônico, oxálico, pirúvico e tartárico (MOURA, 2019); além disso, contribuem para a formação da película celulósica ao longo da fermentação aeróbica, dando origem a uma estrutura tridimensional característica (JAYABALAN et al., 2014). O sabor típico é influenciado pela formação de compostos aromáticos frutados, ésteres voláteis e traços de etanol produzidos especialmente pelas leveduras, resultando em um aroma semelhante ao da sidra (MAYSER et al., 1995). Já as bactérias lácticas (BAL) exercem papel no controle de microrganismos potencialmente patogênicos por meio da produção de ácido láctico e compostos antimicrobianos (OZOGUL e HAMED, 2018).

Tendo em vista a diversidade de inóculos para produção de kombucha, a caracterização de SCOBY adquiridos de diferentes partes do Brasil fornecerá informações relevantes acerca

de seus impactos na qualidade da bebida, bem como quanto ao atendimento à regulamentação vigente no país. Este trabalho teve por objetivo quantificar os grupos microbianos majoritários dos inóculos utilizados na produção de kombucha artesanal no país, bem como avaliar sua performance fermentativa, relacionando-a à qualidade físico-química da bebida e à produção de celulose bacteriana.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção dos SCOBY

Inicialmente, formulários *online* foram aplicados a potenciais colaboradores voluntários produtores de kombucha dispostos a encaminhar seus respectivos SCOBY. A partir das respostas obtidas, 30 diferentes doadores foram selecionados de diferentes regiões brasileiras (Figura 1), sendo 17 provenientes da região Sudeste, 7 da região Sul, 5 da região Centro Oeste e 1 da região Nordeste. Critérios como tempo e volume de produção, origem do inóculo, características sensoriais, dentre outros, foram utilizados na seleção dos doadores, que se autodeclararam voluntários (Apêndice A). Os SCOBY encaminhados ao Laboratório de Microbiologia de Produtos Fermentados (FERMICRO/UFV) foram codificados de K1 a K30, conforme a ordem de recebimento.

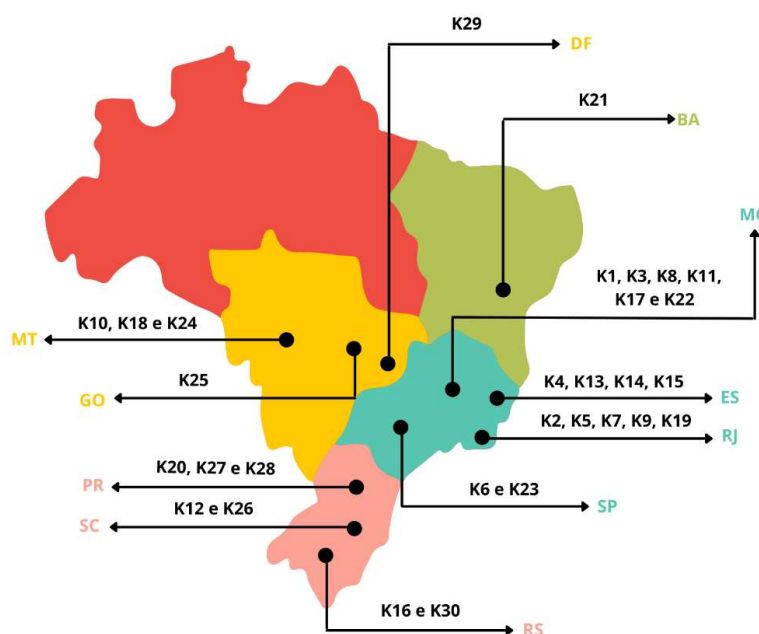


Figura 1 – Distribuição dos inóculos de kombucha obtidos a partir de doações provenientes de diferentes regiões do Brasil. Fonte: Autoria própria.

2.2. Replicação e padronização dos SCOBY

Os 30 fragmentos de SCOBY obtidos foram replicados para obtenção de matrizes robustas e em quantidades suficientes para as fermentações. Para tal, 10% (m/v) de SCOBY, 10% (v/v) de chá de arranque, 0,8% (m/v) de folhas secas de *C. sinensis* (GunPowder Green

tea 9375, China) e 8% de sacarose (m/v) foram utilizados. Um esquema geral da replicação e padronização dos inóculos está apresentado na Figura 2.

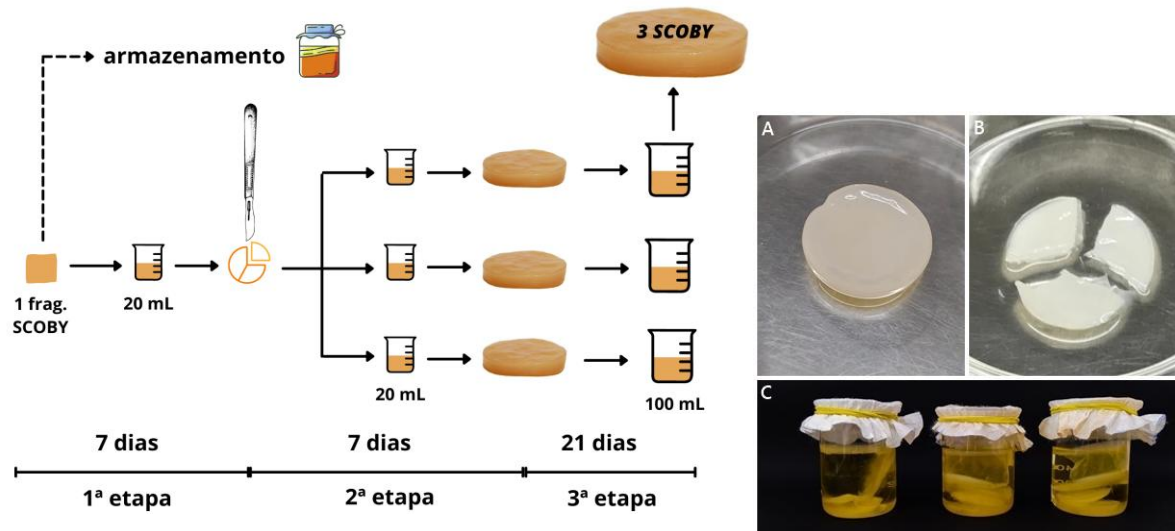


Figura 2 - Replicação e padronização dos inóculos de kombucha. Fonte: Autoria própria. À esquerda as etapas gerais da replicação dos SCOBY de kombucha. À direita, as imagens do início da segunda etapa da replicação, sendo (a) SCOBY formado durante a primeira fermentação em béqueres de 20 mL; (b) Estes mesmos SCOBY formados ao final da fermentação foram seccionados em três partes menores; e (c) início da 2ª etapa do processo de replicação. Fonte: própria do autor.

Cada fragmento de SCOBY passou por 3 etapas de replicação: a primeira, com o intuito de formar um SCOBY maior para que o mesmo fosse fragmentado em três partes iguais; a segunda, com o intuito de obtenção de quantidades suficientes para realizar as fermentações; e, por fim, a terceira, com o objetivo de aumentar a robustez dos SCOBY e obter um chá de arranque potencializado para alavancar a fermentação propriamente dita.

2.3. Produção da kombucha

Para análise da performance fermentativa, o substrato foi elaborado conforme a Tabela 1. O açúcar foi diluído em água potável, previamente esterilizada e aquecida a 80 °C; folhas secas de *C. sinensis* (GunPowder Green tea 9375, China) (ANEXO A) foram acrescentadas à solução e infundidas por 10 minutos. Após retirada das folhas por filtração e resfriamento, 200 mL do substrato foram distribuídos em béqueres de 250 mL e acrescidos de 1 SCOBY previamente padronizado e 20 mL de seu respectivo chá de arranque (10% v/v); a abertura do recipiente de fermentação foi recoberta com tecido voal esterilizado, contribuindo para o

estabelecimento de um ambiente aeróbio. Os béqueres foram incubados a 25 °C em incubadora BOD durante 10 dias. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada fragmento de SCOBY avaliado. As matrizes celulósicas excedentes geradas ao final das fermentações foram armazenadas juntamente com chá de arranque em potes de vidro à temperatura ambiente, garantindo-se um estoque dos inóculos.

Tabela 1 - Formulação padrão e condições experimentais para avaliação da performance fermentativa dos inóculos de kombucha.

Formulação padrão	SCOBY padronizado	1 unid.
	Folhas de chá verde (<i>Camellia sinensis</i>)	0,8%
	Chá de arranque	10%
	Sacarose	8%
Condições	Temperatura (BOD)	25 °C
	Tempo	10 dias

2.4. Avaliação da performance fermentativa dos SCOBY

No decorrer do processo fermentativo, foram determinados os valores de pH e acidez total titulável (ATT) para as bebidas produzidas a partir dos diferentes inóculos, bem como do chá não inoculado (controle), nos seguintes períodos: 0 (após adição do SCOBY e chá de arranque), 2, 4, 6, 8 e 10 dias de fermentação.

2.4.1. Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada instrumentalmente utilizando-se potenciômetro previamente calibrado (ION, modelo pHB 500) (ADOLFO LUTZ, 2008).

2.4.2. Determinação da ATT

Para determinação da ATT, 5 mL da amostra foram transferidos para Erlenmeyer de 100 mL contendo 25 mL de água destilada; três gotas de solução de fenolftaleína 1% (p/v) foram adicionadas e procedeu-se a titulação com solução padronizada de hidróxido de sódio

(NaOH) 0,1 mol/L até coloração levemente rosada. Os resultados foram expressos em g de ácido acético por 100 mL de amostra (ADOLFO LUTZ, 2008), calculados a partir da fórmula abaixo (Eq. 1).

$$\text{Acidez (\%)} = \frac{V \cdot M \cdot F \cdot PM}{P \cdot n \cdot 10} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde: V = Volume gasto de NaOH na titulação (mL); M = molaridade da solução de NaOH; F = Fator de correção da solução de NaOH; PM = Peso molecular do ácido correspondente (g/mol); P = Massa da amostra (mL); n = Número de hidrogênios ionizáveis. Fonte: (ADOLFO LUTZ, 2008).

2.5. Quantificação dos grupos microbianos majoritários dos SCOBY

As populações microbianas de leveduras, BAA e BAL dos SCOBY ao término do processo fermentativo foram quantificadas. Fragmentos de 1 g de cada SCOBY foram transferidos para tubos Falcon contendo 5 pérolas de vidro e 9 mL de solução salina 0,85% (p/v); a mistura foi agitada em vórtex durante 5 minutos. Aliquotas de 10 µL correspondentes às diluições decimais seriadas de 10^{-3} a 10^{-6} foram plaqueadas, em triplicata, utilizando-se a técnica de *drop plate* (HERIGSTAD, HAMILTON e HEERSINK, 2001) em Ágar Glicose Extrato de Levedura com Cloranfenicol (YGC) (para leveduras), Ágar Glicose e Extrato de Levedura (GY) (para BAA) e Ágar De Man, Rogosa-Sharpe (MRS) (para BAL). As placas para contagem de BAA foram incubadas em aerobiose a 35 °C; para contagem de BAL, a 35 °C em jarras de anaerobiose (BOGDAN et al., 2018). Já as placas para contagem de leveduras foram incubadas em aerobiose a 25 °C. Após 48 horas, as colônias foram contadas para os três grupos microbianos e seus resultados foram expressos em Log UFC/g de SCOBY. Os inóculos que apresentaram os parâmetros fermentativos e a quantificação dos grupos microbianos majoritários da kombucha mais distintos entre si foram selecionados para as análises descritas a seguir.

2.6. Caracterização de ácidos orgânicos e etanol da kombucha

As concentrações dos ácidos orgânicos (acético, glicônico e lático) e etanol das bebidas ao final do décimo dia de fermentação foram determinados por meio de Cromatografia Líquida e Alta Eficiência (HPLC) (Cromatógrafo LC-20A Prominence Shimadzu, Japão)

equipado com detector de índice refrativo RID-20A e coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, 9 µm, Munich, Germany), em triplicata. Alíquotas de 20 uL de cada amostra de kombucha fermentada foram filtradas em membranas de acetato de celulose com poros de 0,22 µm de diâmetro. Como fase móvel foi utilizada solução de 5 mM de ácido sulfúrico (Millipore, Germany) em água ultrapura. A corrida ocorreu de modo isocrático com fluxo de 0,7 mL/min e temperatura de 40 °C para os três ácidos orgânicos analisados e o etanol (Sigma-Aldrich). A concentração dos componentes químicos foi determinada utilizando-se curvas-padrão, e elaboradas com as seguintes concentrações em mM: 200, 75, 50, 35, 25, 10 e 5 para ácido glicônico; 400, 200, 150, 100, 70, 50, 20 e 10 para ácido acético; 40, 10, 7, 5, 2 e 1 para ácido láctico; e 400, 200, 150, 100, 70, 50, 20 e 10 para etanol.

2.7. Caracterização dos açúcares residuais da kombucha

As concentrações dos açúcares residuais (sacarose, glicose e frutose) das bebidas ao final do décimo dia de fermentação foram determinados por meio de Cromatografia Líquida e Alta Eficiência (HPLC) (Cromatógrafo LC-20A Prominence Shimadzu, Japão) equipado com detector de índice refrativo RID-20A e uma coluna Rezex RCM-Monosaccharide CA2+ (8%) (300 x 7,8 mm, Munich, Germany), em triplicata. Alíquotas de 20 uL de cada amostra de kombucha fermentada foram filtradas em membranas de acetato de celulose com poros de 0,22 µm de diâmetro. Como fase móvel, foi utilizada água ultrapura. A corrida ocorreu de modo isocrático com fluxo de 0,5 mL/min e temperatura de 80 °C para os três açúcares analisados. A concentração dos componentes químicos foi determinada utilizando-se curvas-padrão, e elaboradas com as seguintes concentrações: 8, 6, 4, 2, 0,8 e 0,4% (p/v) para a sacarose (Neon); 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 mM para glicose (Sigma-Aldrich); e 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 mM para frutose (Sigma-Aldrich).

2.8. Determinação da acidez volátil

O teor de ácidos voláteis foi efetuado através do arraste a vapor d'água e retificação dos vapores presentes na amostra. Para isso, foram utilizados 10 mL de kombucha coletados nos tempos 0, 5 e 10 dias de fermentação, juntamente com 250 mL de água ultrapura adicionada ao gerador de vapor do aparelho de destilação e conectado ao condensador (TECNAL - TE-0871). Após o processo de ebulição da água, a torneira de vapor foi aberta, a fim de eliminar o ar do aparelho e, eventualmente, o gás carbônico presente na água. A partir do arraste dos ácidos

voláteis durante o contato do vapor de água com a amostra, foram obtidos 100 mL do destilado. Por fim, 20 mL deste destilado foram titulados, em triplicata, com Hidróxido de Sódio 0,1 mol/L padronizado (NaOH), em presença de fenolftaleína 1% (p/v) (ADOLFO LUTZ, 2008), e calculados a partir da fórmula abaixo (Eq. 2), cujos resultados foram expressos em mEq/L.

$$AV \left(\frac{mEq}{L} \right) = \left(\frac{1000}{a} \right) \cdot v \cdot (M \cdot f) \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde: a = Aliquota de amostra; v = Volume gasto de NaOH na titulação (mL); M = Molaridade da solução de NaOH; f = Fator de correção da solução de NaOH; Fonte: (ADOLFO LUTZ, 2008).

2.9. Caracterização da celulose

Ao final do período de fermentação, os SCOBY foram recolhidos e purificados para remover as impurezas e microrganismos aderidos. Para purificação, os mesmos foram lavados com água destilada e imersos em solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L durante 24 horas em estufa a 50 °C. Posteriormente, os SCOBY foram lavados e adicionados de uma nova solução de hidróxido de sódio de mesma concentração, com trocas periódicas a cada 24 horas, até que as membranas apresentassem coloração branca em todas as suas camadas (SOUSA et al., 2021). As membranas já purificadas foram pesadas e mantidas *overnight* a -80 °C em ultrafreezer. Em sequência, foram liofilizadas (Liobras, modelo L101) por 24 a 72 horas, a depender da espessura da membrana (SCHROEDER, 2019).

Após esse período, as películas foram novamente pesadas. Com base nos dados obtidos, foram determinados os rendimentos de produção de celulose em base úmida e seca (ANTÔNIO et al., 2012), a produtividade volumétrica (CRUZ, 2019) e a capacidade de retenção de água (AMORIM, 2020), conforme as equações a seguir, com pequenas modificações para obtenção dos resultados em suas respectivas unidades.

$$Rbu = \frac{Pp}{2} \quad (\text{Eq. 3}) - \text{Rendimento de celulose em base úmida (g/100 mL)}$$

$$Rbs = \frac{Pl}{2} \quad (\text{Eq. 4}) - \text{Rendimento de celulose em base seca (g/100 mL)}$$

$$Pv = \left(\frac{\text{Média dos Pl} \cdot 1000}{200} \right) / t \quad (\text{Eq. 5}) - \text{Produtividade volumétrica (g/L.h)}$$

$$CRA = \left(\frac{\text{Média dos Pp} - \text{Média dos Pl}}{\text{Média dos Pp}} \right) \cdot 100 \quad (\text{Eq. 6}) - \text{Capacidade de retenção de água (\%)}$$

Onde: Rbu = Rendimento em base úmida (g/100 mL); Rbs = Rendimento em base seca (g/100 mL); Pp = Peso dos biofilmes purificados (g); Pl = Peso dos biofilmes liofilizados (g); Pv = Produtividade volumétrica (g/L.h); Média dos Pp = Média dos pesos dos biofilmes purificados (g); Média dos Pl = Média dos pesos dos biofilmes liofilizados (g); t = tempo de fermentação (h).

2.10. Análises estatísticas

Todos os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o *software* R com interface no *RStudio* para os dados obtidos. A análise estatística *Kruskal-Wallis* (não-paramétrica) foi utilizada para verificar diferenças significativas entre os tratamentos, e o teste *Mann-Whitney* para a conferência em pares de modo a identificar quais tratamentos foram diferentes a 5% de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 455 potenciais doadores que responderam os formulários, 30 foram selecionados para participarem do estudo. Os inóculos recebidos apresentavam coloração e espessura distintas; as características do biofilme podem variar a depender da diversidade microbiana, do tempo de fermentação e das proporções dos ingredientes utilizados como substrato fermentativo no preparo da kombucha (LEE et al., 2015). Como os inóculos foram obtidos de diferentes regiões e considerando-se que cada produtor tem suas próprias formulações e métodos de preparo, as diferenças observadas eram previstas.

O pH do chá não fermentado (controle) estava próximo à neutralidade ($6,43 \pm 0,35$), condizente, portanto, com os resultados obtidos por Lunkes e Hashizume (2014), que avaliaram o pH de diferentes infusões de ervas, incluindo chá verde (valores entre 5,04 e 7,89). O pH tende a ser reduzido no decorrer do processo fermentativo, uma vez que a microbiota consome os carboidratos do substrato e produz ácidos; conseqüentemente, observa-se também o aumento dos valores de ATT. Na amostra controle, como o chá de arranque e o SCOBY ainda não haviam sido adicionados, o teor de ATT foi baixo ($0,01 \% \pm 0,00$) (p/v). Para as kombuchas fermentadas com diferentes inóculos avaliados, as variações de pH observadas no decorrer de 10 dias de fermentação estão apresentadas na Figura 3.

Os valores de pH das bebidas avaliadas variaram entre 4,82 e 2,38, resultados semelhantes aos observados por Taufner (2020) (4,36 a 2,85). Previsivelmente, os inóculos que apresentaram os maiores valores de pH iniciais também resultaram nas maiores variações deste parâmetro ao longo do tempo (K8, K15, K18, K12, K14, K16, K19 e K7). Kallel et al. (2012) analisaram o pH de kombuchas e observaram fenômeno semelhante, com maior redução nos primeiros dias; os autores destacam que a partir do 5º dia de fermentação, o pH se manteve constante praticamente até o término da fermentação (15 dias).

Em relação ao pH final após 10 dias de fermentação, as bebidas produzidas pelos inóculos K8, K12, K14, K15, K16 e K18 apresentaram os maiores valores, com destaque para K8 (4,82 - 3,37). Já as kombuchas K11, K20, K25 e K30 apresentaram os menores valores de pH final (2,38). Estes apresentaram pH inferior ao mínimo estabelecido pela IN brasileira; portanto, considerando-se este parâmetro, estas bebidas poderiam ter sido fermentadas durante apenas 4 dias para atender aos critérios da IN. Santos et al. (2019) observaram que 4 dias de fermentação seriam suficientes para obtenção de kombucha com melhor qualidade sensorial nas condições avaliadas no estudo (2% de chá verde, 15% de açúcar demerara, 1 SCOBY de 7 cm de diâmetro e 20% de chá de arranque, sendo o substrato fermentado a 28 °C por 4 dias).

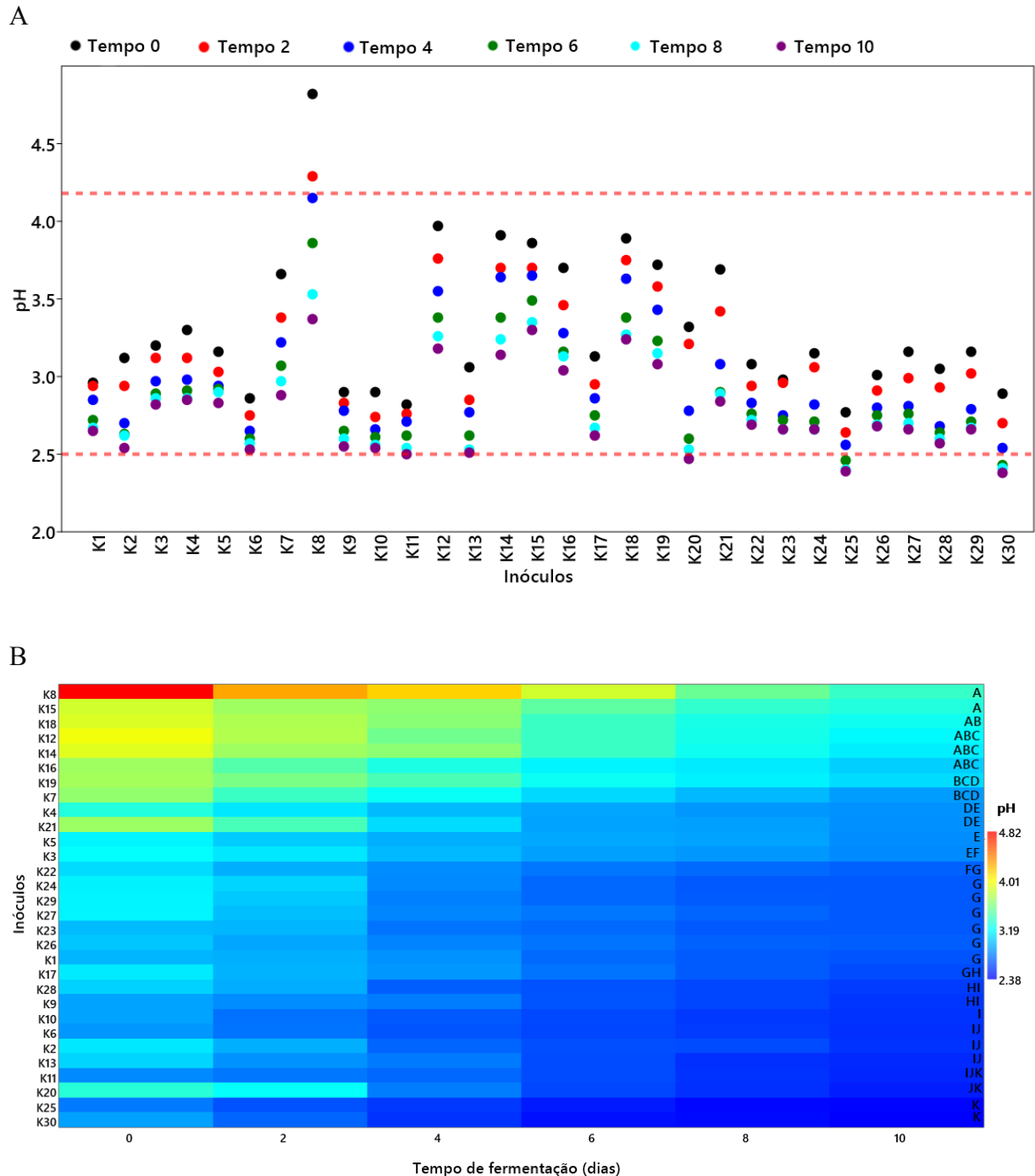


Figura 3 – (A) pH das kombuchas durante 10 dias de fermentação. Linhas tracejadas em vermelho representam os limites superior e inferior estabelecidos pela IN 46 (MAPA). (B) Ordenação decrescente dos valores de pH das kombuchas durante 10 dias de fermentação – maiores valores em cores quentes (vermelho) e menores valores em cores frias (azul). Bebidas seguidas da mesma letra (à direita) não diferem entre si no último dia de fermentação quanto aos valores de pH (nível de significância de 5% pelo teste *Kruskal-Wallis* e *Mann-Whitney*). Fonte: própria do autor.

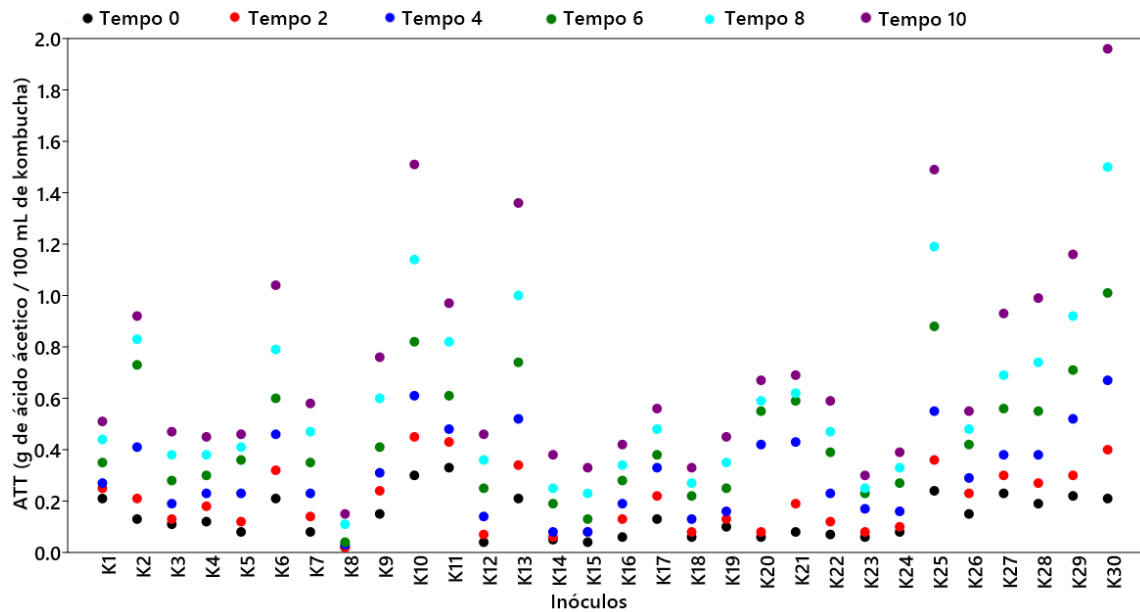
Uma vez que a medição do pH corresponde a uma das formas mais comuns de se determinar o término da fermentação da kombucha, bebidas com valores de pH muito reduzidos

podem se apresentar muito ácidas, impactando de maneira negativa na aceitação do consumidor (NUMMER, 2013). Alguns estudos reforçam, ainda, que bebidas com valores de pH não inferiores a 3 podem evitar problemas dentários e gastrointestinais decorrentes da ingestão de bebidas ácidas (IVANISOVÁ et al., 2020).

Todas as bebidas apresentaram valores de pH reduzidos para a faixa estabelecida pela IN 41 (4,2-2,5) apenas com a adição do chá de arranque, exceto para o inóculo K8 (Figura 3A). Assim, o chá de arranque pode influenciar significativamente na redução do tempo de fermentação da kombucha. Deve-se considerar, contudo, que características sensoriais desejáveis provêm da fermentação ao longo do tempo; de qualquer forma, o uso de chá de arranque mostrou-se importante na redução inicial do pH da bebida, podendo exercer um papel relevante na redução dos riscos de contaminação por microrganismos indesejáveis no início do processo. Apesar da origem diversificada, alguns inóculos apresentaram similaridade quanto ao efeito na redução do pH no decorrer do processo fermentativo (Figura 3B), como os inóculos K11, K20, K25 e K30.

Na Figura 4 estão apresentados os valores de ATT das kombuchas, que variaram entre 0,02 e 1,96% (p/v) após 10 dias de fermentação. A kombucha K30 apresentou o maior valor de ATT e variação ao longo do processo (0,21 a 1,96% p/v), não diferindo estatisticamente, no entanto, das kombuchas K10, K13 e K25. Em contrapartida, as kombuchas K8, K15, K18 e K23 apresentaram os menores valores de ATT. Estudo de Santos et al. (2019) demonstrou que após 6 dias de fermentação, a ATT das kombuchas avaliadas alcançou 1,89% e 2,07% (p/v) para os chás preto e verde, respectivamente, valores próximos aos observados neste estudo.

A



B

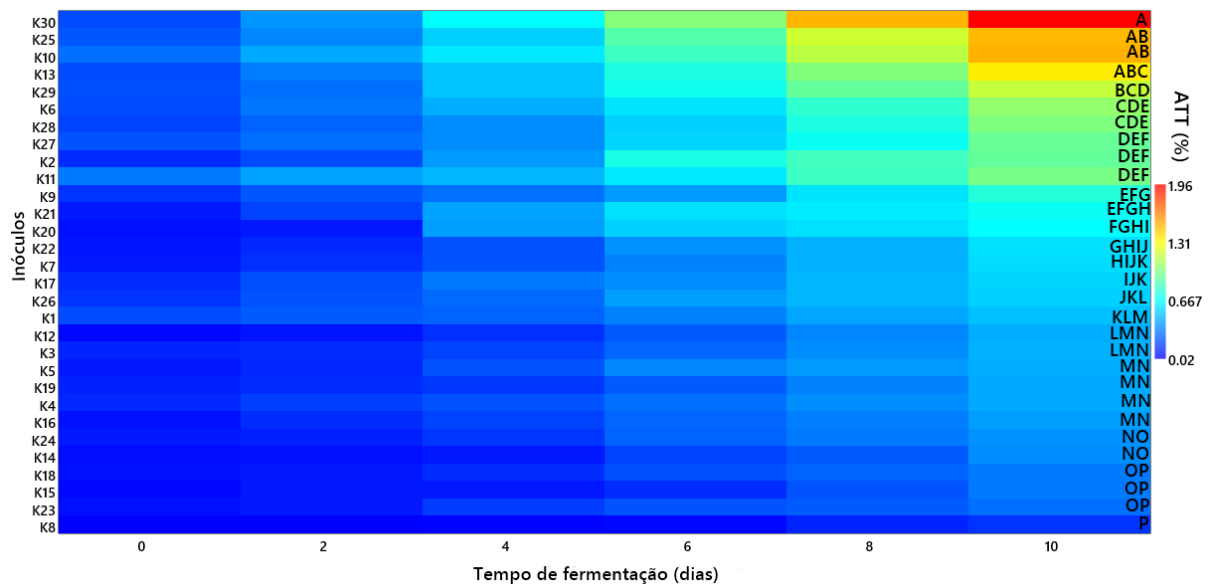


Figura 4 – (A) ATT das bebidas ao longo de 10 dias de fermentação. (B) Ordenação decrescente dos valores de ATT das kombuchas durante 10 dias de fermentação – maiores valores em cores quentes (vermelho) e menores valores em cores frias (azul). Bebidas seguidas da mesma letra (à direita) não diferem entre si no último dia de fermentação quanto aos valores de ATT (nível de significância de 5% pelo teste *Kruskal-Wallis* e *Mann-Whitney*). Fonte: própria do autor.

De maneira geral, os parâmetros de pH e ATT apresentaram correlação inversamente forte ($> 0,70$), ou seja, enquanto o pH reduziu ao longo do tempo, a ATT aumentou (Figura 5).

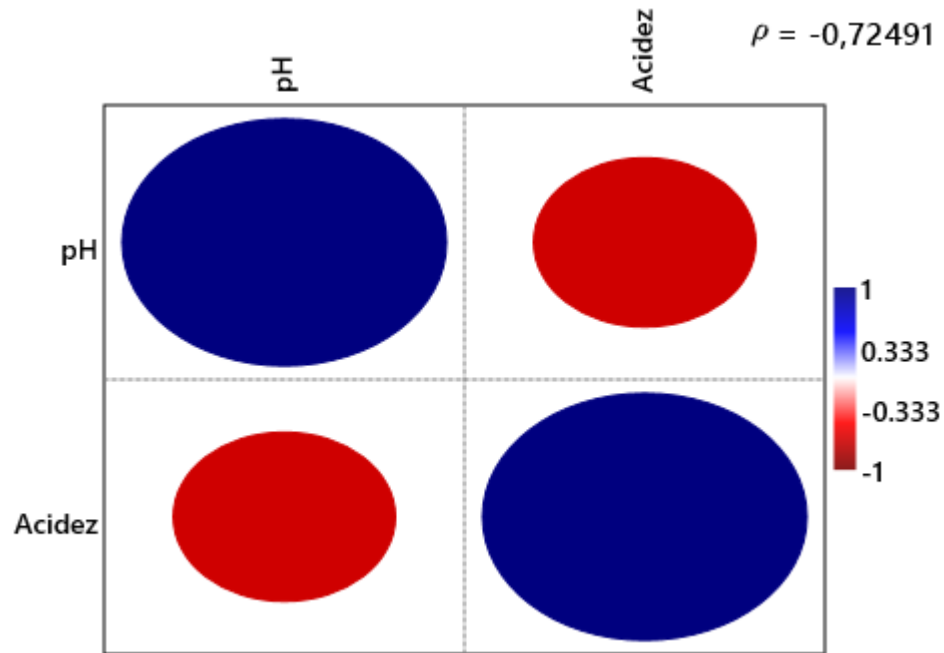


Figura 5 - Correlação entre os parâmetros pH e a ATT em relação a todos os inóculos analisados. Fonte: própria do autor.

A composição da microbiota é fundamental para a qualidade da kombucha; sendo assim, a quantificação dos grupos microbianos majoritários é um parâmetro importante a ser avaliado (JAFARI et al., 2021). Colônias de leveduras, BAL e BAA crescidas em ágar após execução da técnica de *drop plate* podem ser observadas na Figura 6.



Figura 6 – Placas (em duplicata) com crescimento de colônias de leveduras (esquerda), BAL (ao centro) e BAA (à direita) em meio de cultivo a partir da técnica de *drop plate*. Fonte: própria do autor.

BAA são classificadas como gram-negativas que produzem ácido acético a partir de açúcares ou etanol como fonte de carbono e energia (JAYABALAN et al., 2008). Dentre os inóculos avaliados, K12, K15, K23 e K24 foram os que apresentaram as maiores populações de BAA (de 9,29 a 10,03 Log UFC/g). Dentre as menores, destaque para os inóculos K6, K9, K11, K13, K20 e K25 (de 6,68 a 8,04 Log UFC/g) (Figura 7A e Material Suplementar - Apêndice B). Tran et al. (2020) demonstraram aumento na população de BAA na fração líquida da kombucha de 4 para 7 Log UFC/mL durante 7 dias de fermentação; Neffe-Skocinska et al. (2017) observaram valores de 7,1 Log UFC de BAA/mL da bebida durante o mesmo tempo de fermentação. Estudos de quantificação microbiana das matrizes celulósicas são escassos, mas estudos têm indicado maiores populações nas frações sólidas (SCOBY) em comparação com as frações líquidas (Coton et al., 2017), bem como a predominância de BAA nas matrizes celulósicas, especialmente *K. xylinus* (JAYABALAN et al., 2014).

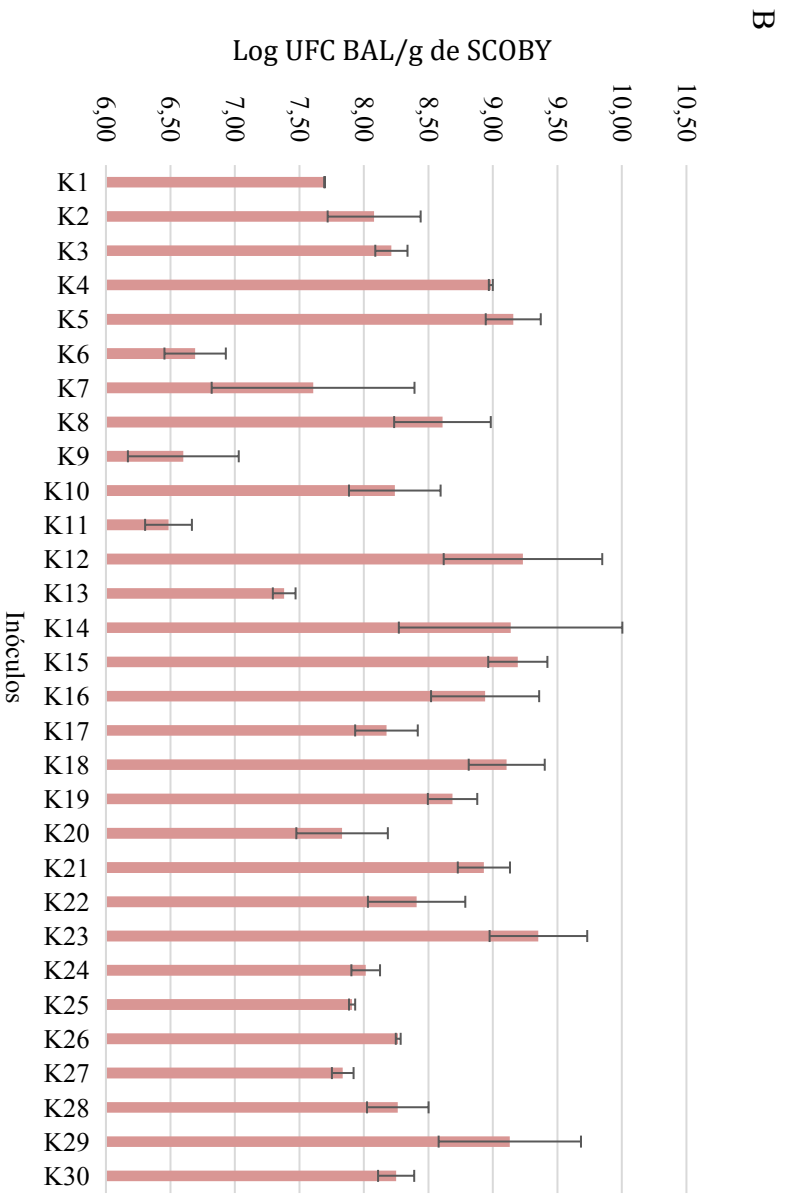
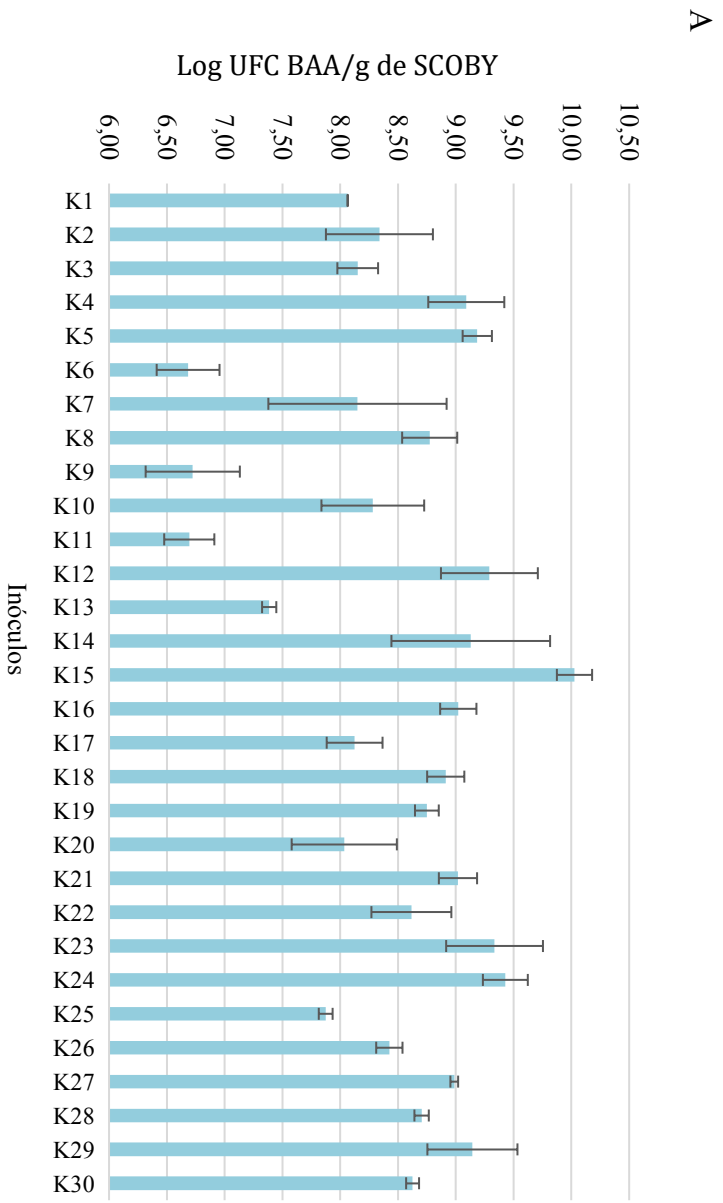
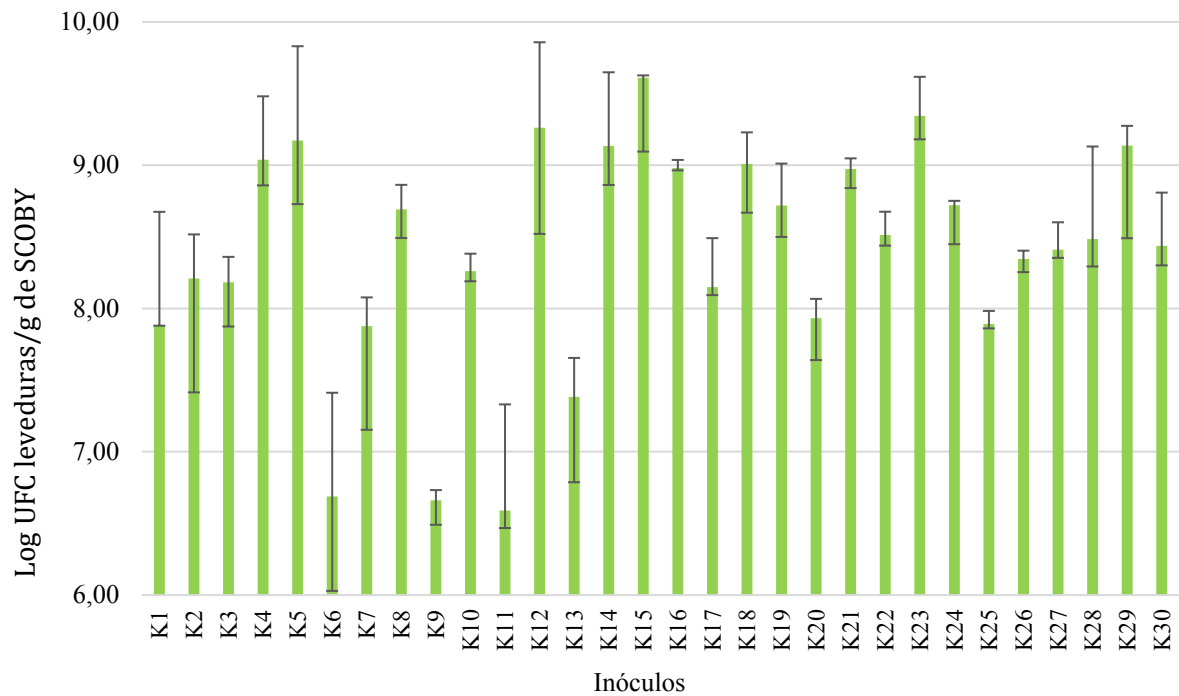


Figura 7 – Quantificação dos microrganismos nos inóculos de kombucha. Contínua

C



D

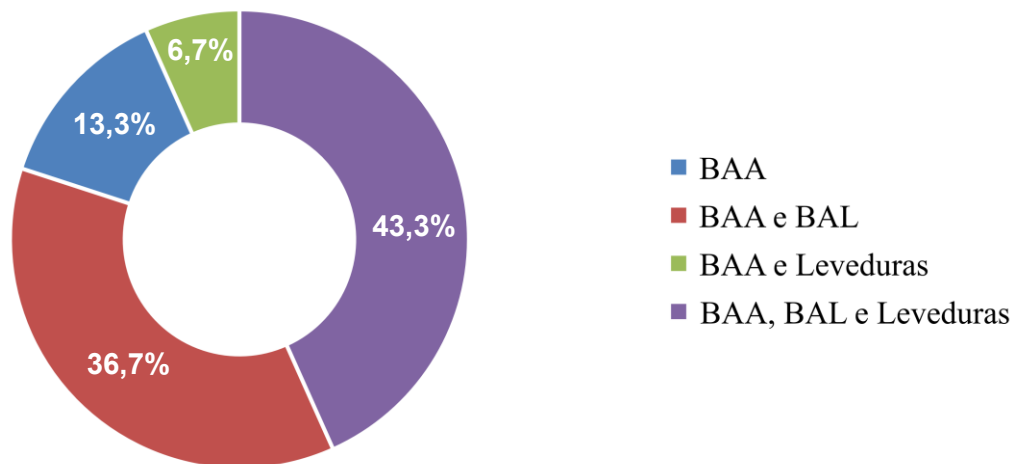


Figura 7 – Quantificação dos microrganismos nos inóculos de kombucha: (A) Bactérias acéticas (BAA); (B) Bactérias lácticas (BAL); e (C) leveduras; (d) Predominância dos grupos microbianos nos SCOBY avaliados.

Apenas os inóculos K7, K15, K24 e K27 apresentaram exclusivamente maior contagem de BAA em comparação com os demais grupos microbianos (BAL e leveduras); ou seja, 13,3% dos inóculos analisados (Figura 7D). Dessa forma, apesar de alguns estudos relatarem uma predominância de BAA na kombucha (NGUYEN et al., 2015), neste estudo

verificou-se que para 36,7% dos inóculos não houve diferença estatisticamente significativa entre as populações de BAA e BAL. Marsh et al. (2014) identificaram proporções consideráveis de BAL dos gêneros *Lactobacillus* e *Lactococcus* na kombucha e no SCOBY, sendo que as proporções de BAL foram menores nas amostras analisadas nos três primeiros dias de fermentação e maiores no 10º dia, totalizando 35% do sequenciamento a nível de gênero das BAL de kombuchas irlandesas; os autores sugerem que BAL podem ser mais abundantes na kombucha do que se supunha até então, particularmente nos últimos estágios da fermentação.

As maiores populações de BAL foram observadas para os inóculos K5, K12, K14, K15, K18, K23 e K29 (de 9,11 a 9,35 Log UFC/g); as menores, para K1, K6, K7, K9, K11, K13, K20 e K27 (de 6,48 a 7,84 Log UFC/g) (Figura 7B e Material Suplementar - Apêndice B). As populações de BAL quantificadas em outros estudos variaram consideravelmente, de 3 Log UFC/g após 25 dias de fermentação (Santos et al., 2017) a 7 Log UFC/g após 8 dias de fermentação (Coton et al., 2017). Tais diferenças podem estar relacionadas às condições empregadas durante a processo fermentativo. Assim, embora geralmente BAL sejam consideradas menos relevante para a kombucha, este grupo pode estar relacionado a efeitos importantes, considerando-se suas reconhecidas funções na prevenção do crescimento de bactérias indesejáveis, sejam estas patogênicas (contribuindo para a segurança do produto) ou deterioradoras (impactando nas características nutricionais e sensoriais da bebida) (GAO et al., 2019).

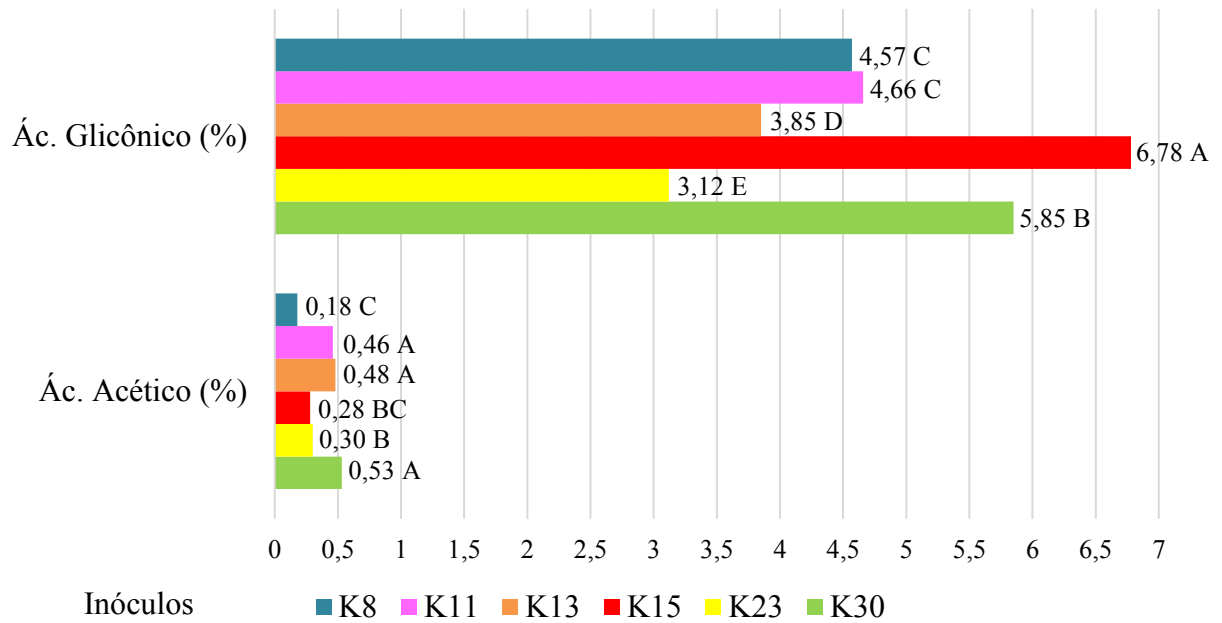
Leveduras são essenciais para a produção de compostos aromáticos frutados, ésteres voláteis e traços de etanol durante a fermentação da kombucha, contribuindo de maneira significativa nos atributos sensoriais (MAYSER et al. 1995). A ecologia das espécies envolvidas na fermentação envolve uma dinâmica populacional que se inicia com as espécies osmotolerantes, sucedidas e finalmente dominadas por espécies ácido-tolerantes (TEOH, HEARD e COX, 2004). Para os inóculos avaliados, as maiores populações de leveduras foram observadas para K4, K15, K23 e K29 (8,90 a 9,48 Log UFC/g). K1, K6, K7, K9, K11, K13 e K17 apresentaram as menores populações, não diferendo estatisticamente entre si (de 6,03 a 6,78 Log UFC/g) (Figura 7C e Material Suplementar - Apêndice B). Santos, Barbosa e Lacerda (2017) relataram populações de leveduras na fração líquida variando entre 6,17 Log UFC/mL e 7 Log UFC/mL após 25 dias de fermentação. Já Teoh, Heard e Cox (2004) quantificaram o grupo na película celulósica após 7 dias de fermentação e encontraram valores entre 6 e 8 Log UFC/g. Diferenças quanto à abundância dos grupos microbianos podem estar relacionadas ao tipo de amostra avaliado; de qualquer maneira, tais valores estão próximos aos encontrados neste trabalho.

Considerando-se todos os inóculos analisados, em apenas 6,7% observou-se predominância de BAA e leveduras, sem diferença estatística entre si; para 43,3% dos SCOBY avaliados, não houve predominância de nenhum dos grupos, uma vez que não foi observada diferença estatística para os tamanhos de suas populações (Figura 7D). Não existe um padrão mínimo desejável para populações de BAA, BAL e leveduras em kombucha; de maneira geral, as populações dos SCOBY aqui avaliados foram superiores às de outros estudos, o que pode impactar na performance fermentativa e, conseqüentemente, na qualidade da bebida.

Cabe salientar que apesar de comumente se relacionar a maior abundância de microrganismos a maiores valores de acidez, K23 e K15 se destacaram pelas elevadas populações microbianas, mas com reduzida ATT. Padrão inverso foi observado para K11, com as menores populações e ATT elevada. A partir da análise de correlação de Pearson entre os parâmetros físico-químicos e os microbiológicos, obteve-se uma correlação positiva fraca, de 0,40, demonstrando que outros fatores podem impactar esses resultados que não a densidade populacional. Tendo em vista que os sistemas microbianos são complexos e muitas vezes de difícil predição (CARPENTER, 1999) e que os inóculos apresentam diferenças significativas em termos de composição microbiana, modificações do substrato decorrentes do metabolismo podem ocorrer de maneira distinta (COTON et al., 2017), contribuindo para uma variedade considerável nos atributos de qualidade do produto final.

Considerando-se, portanto, esta diversidade, os 6 inóculos que mais diferiram entre si quanto aos valores de pH e ATT do substrato fermentado, populações de BAL, BAA e leveduras (K8, K11, K13, K15, K23 e K30) foram selecionados para análise do consumo de carboidratos fermentescíveis e produção de ácidos orgânicos ao término da fermentação. Independentemente do SCOBY, ácido glicônico foi o mais abundante na kombucha, seguido do ácido acético (Figura 8A). K15 foi a kombucha que resultou na maior concentração de ácido glicônico (6,78 %); K11, K13 e K30 resultaram na maior produção de ácido acético (0,46, 0,48 e 0,53 %, respectivamente), com valores consideráveis de ATT ao término da fermentação (0,97, 1,36 e 1,96 %, respectivamente). Diferentemente de K8, que apresentou a menor concentração (0,18 %), e, conseqüentemente, menor ATT (0,15 %). Valores inferiores de ácido glicônico (4,14%) e superiores de ácido acético (1,04%) foram observados em kombucha de chá verde fermentada por 15 dias (KAEWKOS, BOVONSOMBUT e TRAGOOLPUA (2019); valores superiores de ácido acético (0,84%) também foram observados em outros estudos (JAYABALAN et al. 2007).

A



B

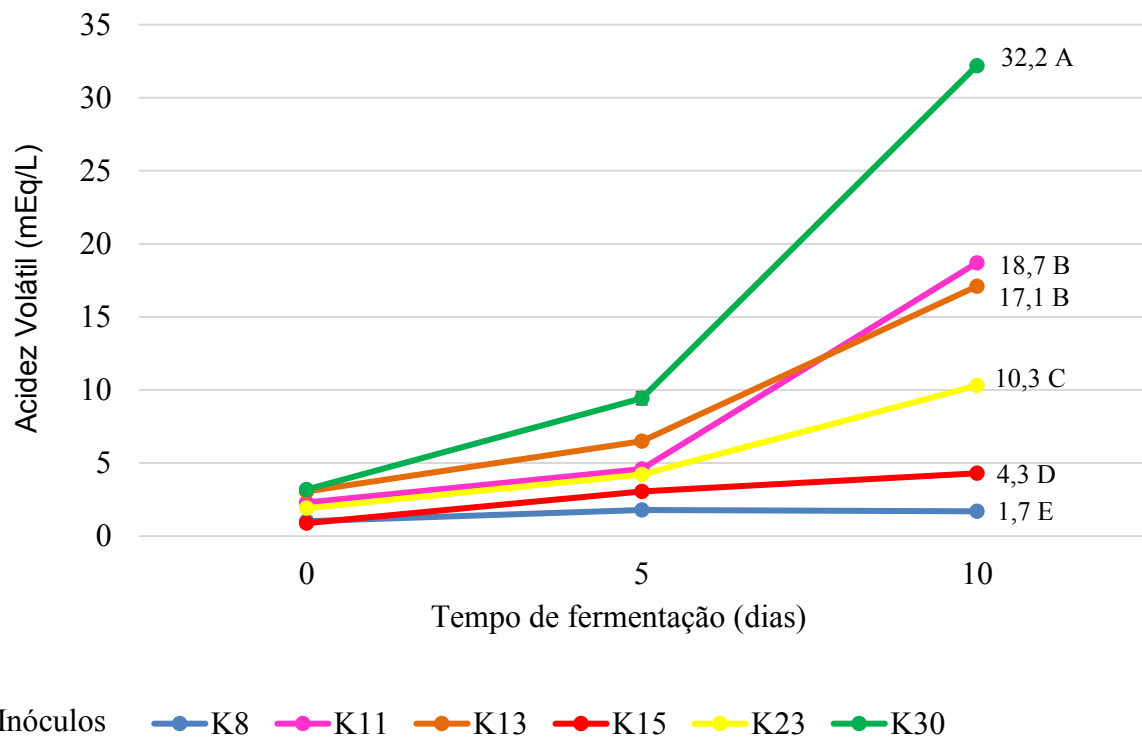


Figura 8 - Quantificação dos ácidos orgânicos e etanol sintetizados na kombucha utilizando diferentes SCOBY durante 10 dias de fermentação (continua).

C

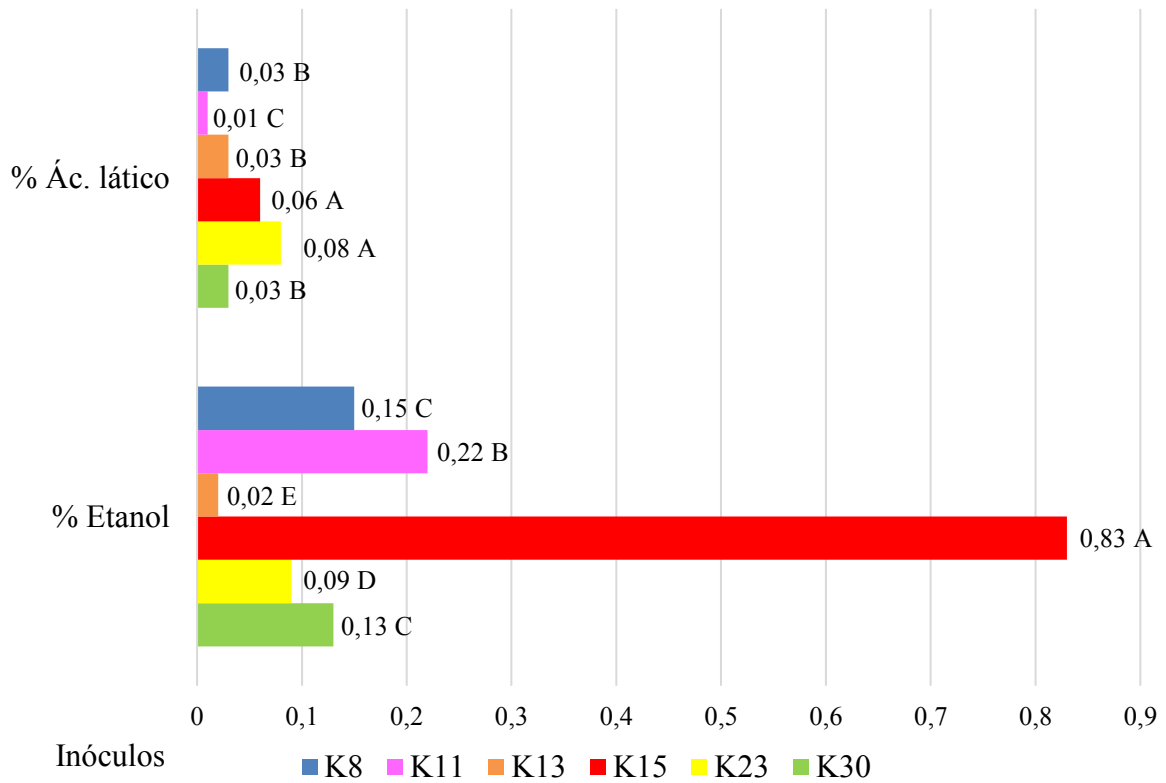


Figura 8 - Quantificação dos ácidos orgânicos e etanol sintetizados na kombucha fermentada por diferentes SCOBY durante 10 dias. A) Concentração do ácido glicônico e ácido acético, expresso em % (g/100 mL de kombucha); B) Concentração de ácidos voláteis presentes na kombucha (mEq/L); C) Concentração de ácido láctico e etanol, expresso em % (g/100 mL de kombucha). Colunas seguidas da mesma letra para cada metabólito não diferem estatisticamente entre si (nível de significância de 5% pelo teste *Kruskal-Wallis* e *Mann-Whitney*).

A glucona-delta lactona e sua forma hidrolisada, o ácido glicônico, têm sido utilizados industrialmente como reguladores da acidez em alimentos, com a característica de conferirem pouco gosto ácido (QUIROGA, 2016). Este ácido orgânico, assim como o acético, é determinante para o sabor e o aroma da kombucha. Enquanto o ácido acético ($pK_a = 4,75$) contribui para um sabor mais ácido e adstringente, o ácido glicônico ($pK_a = 3,86$) resulta em gosto ácido mais suave e refrescante (CHU e CHEN, 2006; WANG et al., 2020). Tais propriedades sensoriais estão associadas à força de dissociação dos ácidos; em geral, quanto maior o pH do meio em relação ao pK_a do ácido, mais abundante é sua forma dissociada (i.e., mais cargas H^+ livres) (TRAN et al., 2020), o que impacta na maior percepção sensorial da acidez.

Essa relação pode explicar, em parte, o fato do inóculo K15 apresentar a maior concentração de ácido glicônico (6,78 %) e a maior quantificação de BAA, porém uma baixa acidez volátil (4,30 %). Espécies de BAA e *Pseudomonas savastanoi* foram as primeiras culturas tidas como modelo para a produção de ácido glicônico; atualmente, sabe-se que outras espécies são potenciais produtoras, como *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Acetobacter methanolicus* (RAMACHANDRAN et al., 2006). Ainda que a identificação taxonômica não tenha sido realizada neste estudo, a maior abundância de BAA neste inóculo pode ter influenciado diretamente nos resultados observados.

O teor de acidez volátil das bebidas obtidas a partir dos diferentes inóculos variou de 0,89 a 32,2 mEq/L no decorrer dos 10 dias de fermentação (Figura 8B). Como era de se esperar, as kombuchas que apresentaram as maiores concentrações de ácido acético também resultaram nos maiores valores de acidez volátil, sendo elas K30, K11 e K13, que não diferiram estatisticamente entre si. O oposto foi observado para K8, que apresentou o menor teor de acidez volátil ao final do processo fermentativo (1,7 mEq/L). A IN 41/2019 determina os valores mínimos e máximos de concentrações de ácidos voláteis (30 - 130 mEq/L) do produto final, evidenciando que todas as bebidas analisadas neste momento apresentaram valores inferiores ao mínimo estabelecido, exceto K30 (32,2 mEq/L).

Considerando-se que a maior parte dos inóculos avaliados não atendeu à exigência legal mesmo após 10 dias fermentação (tempo superior ao comumente observado na produção comercial), talvez o padrão vigente para acidez volátil para kombucha possa ser, futuramente, revisado. Além disso, fica demonstrada a complexidade de se determinar o ponto de finalização do processo fermentativo, visto que apesar da acidez volátil da kombucha K30 estar na faixa ótima, seu pH ultrapassou o limite inferior estabelecido pela mesma legislação após 10 dias de fermentação. Apesar da determinação da acidez volátil ser exigida na legislação brasileira, a maior parte dos estudos publicados até o momento faz uso da determinação da acidez total titulável, provavelmente por ser uma análise menos laboriosa. Diversos estudos têm indicado uma variedade de ácidos orgânicos voláteis presentes na bebida ao final da fermentação, incluindo, principalmente, o ácido acético (MOURA, 2019). Dessa forma, o valor da acidez volátil na bebida em geral é muito próximo ao da acidez total, tendo em vista a baixa concentração de ácidos fixos, como por exemplo o ácido láctico.

Em relação ao ácido láctico, K23 e K15 foram os inóculos que resultaram em maiores concentrações (0,08 e 0,06 %, respectivamente). K11 apresentou a menor concentração (0,01 %), além da menor população de BAL dentre os inóculos avaliados (Figura 8C). Este ácido apresenta pKa de 3,85, significativa estabilidade química e térmica; na área de alimentos, é

amplamente utilizado para estender a vida útil dos produtos, contribuindo para o controle de microrganismos indesejáveis, bem como na prevenção de alterações nos atributos sensoriais do produto (BENEVENUTI, 2016).

Como leveduras exercem um papel importante na fermentação da kombucha, é praticamente inevitável a formação de etanol, mesmo que em traços. Por conta disso, a IN 41 (MAPA) determina que a kombucha seja devidamente classificada como de baixo teor alcoólico ($\leq 0,5$ % de etanol) (devendo constar no rótulo a informação “Pode conter álcool em até 0,5 % v/v”) ou alcoólica (0,6 - 8,0 % de etanol) – sendo também obrigatória a declaração da graduação alcoólica no painel principal do rótulo, expresso em porcentagem em volume % (v/v). No mercado internacional, as kombuchas que apresentam teor alcoólico acima de 4% são comumente denominadas de “*hard kombucha*” (SUHRE, 2020). Considerando-se as bebidas avaliadas para este parâmetro, todas poderiam ser classificadas como de baixo teor alcoólico, com exceção de K15 ($0,83 \pm 0,06$ % v/v). K13, que apresentou teor alcoólico abaixo de 0,05 % v/v, poderia ser designada como “zero álcool”, “zero % álcool” e até mesmo “0,0%” (BRASIL, 2019). Os resultados obtidos reforçam, portanto, a importância da adequação da rotulagem da bebida quanto ao teor alcoólico, a partir do controle rígido dos parâmetros fermentativos visando ao atendimento à legislação vigente no país.

Outro aspecto relevante para a produção da bebida diz respeito à concentração de açúcares residuais. Apesar da microbiota fermentadora consumir grande parte dos carboidratos fermentescíveis no decorrer do processo fermentativo, os açúcares adicionados não são completamente esgotados ao término da fermentação. A hidrólise enzimática da sacarose por enzimas extracelulares sintetizadas por leveduras (invertases) libera glicose e frutose, monossacarídeos disponíveis para serem metabolizados por acéticas e lácticas, produzindo ao final do processo fermentativo inúmeros metabólitos, como CO₂, traços de etanol, ácidos orgânicos e a película celulósica (SCHROEDER, 2019; JAYABALAN et al., 2014). Neste estudo, concentração de 8% (p/v) de sacarose foi utilizada; os valores para os açúcares residuais observados após 10 dias de fermentação estão apresentados na Figura 9. As kombuchas K8 e K15 foram as que apresentaram as maiores concentrações de açúcares residuais: 5,16 e 3,58% para sacarose, 1,70 e 1,73% para glicose e 1,07 e 1,44% para frutose, respectivamente. Observa-se, portanto, o uso limitado da principal fonte de energia do substrato por esses inóculos, correspondendo a apenas 35,5% e 55,3% da concentração de sacarose inicialmente adicionada. Esses resultados refutam, portanto, a ideia popularmente difundida de que a kombucha apresenta reduzido teor de açúcar, uma vez que praticamente todo o carboidrato seria consumido no decorrer da fermentação. Trata-se, pois, de uma ideia equivocada, considerando-

se que a depender do SCOBY utilizado, os níveis de açúcares residuais no produto final podem variar significativamente. Isso é reforçado pelos resultados observados para o inóculo K30, que, nas mesmas condições, consumiu 7,72% da sacarose adicionada inicialmente, resultando em bebidas com os menores valores de açúcares residuais dentre os SCOBY avaliados.

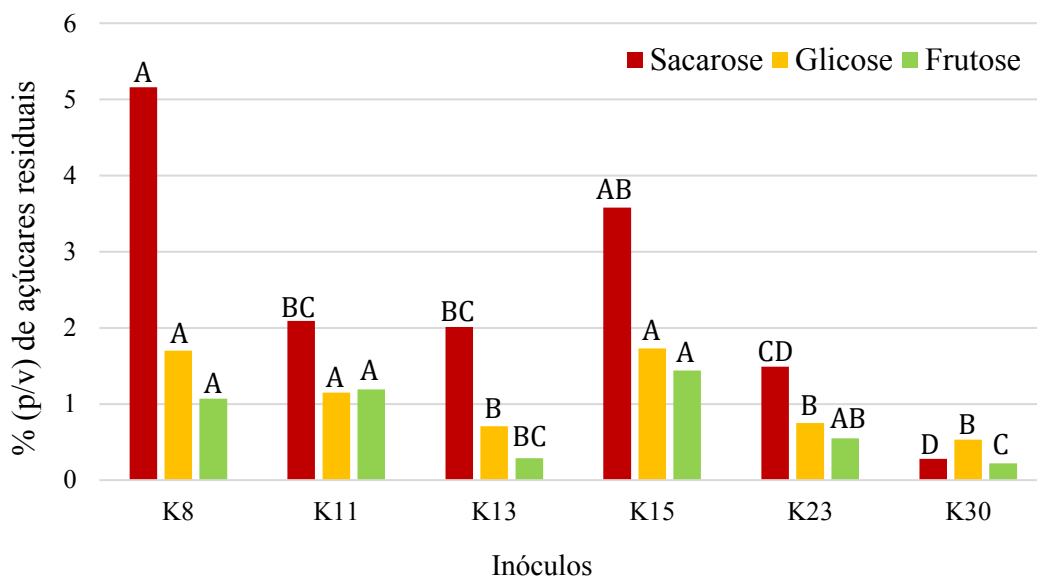


Figura 9 – Concentração dos açúcares residuais na kombucha fermentada durante 10 dias (valores expressos em %, ou seja, g/100 mL de kombucha). Colunas seguidas da mesma letra para cada tipo de carboidrato não diferem estatisticamente entre si (nível de significância de 5% pelo teste *Kruskal-Wallis* e *Mann-Whitney*).

Em relação à celulose bacteriana (CB), algumas espécies de BAA são descritas como importantes produtoras (RUKA, SIMON e DEAN, 2014). Diferentemente da celulose vegetal, a CB não contém hemicelulose, pectina e lignina em sua composição; tal pureza confere vantagens quanto à purificação e à aplicação industrial (RAHMAN e NETRAVALI, 2016), dispensando a necessidade de pré-tratamentos complexos e, conseqüentemente, reduzindo os custos de energia e processamento. Nas Figuras 10 e 11, pode-se observar o aspecto dos SCOBY após tratamento com solução alcalina e após tratamento seguido de secagem; na Tabela 2, estão apresentados os rendimentos de CB, produtividade volumétrica e capacidade de retenção de água para as películas geradas pelos inóculos avaliados.

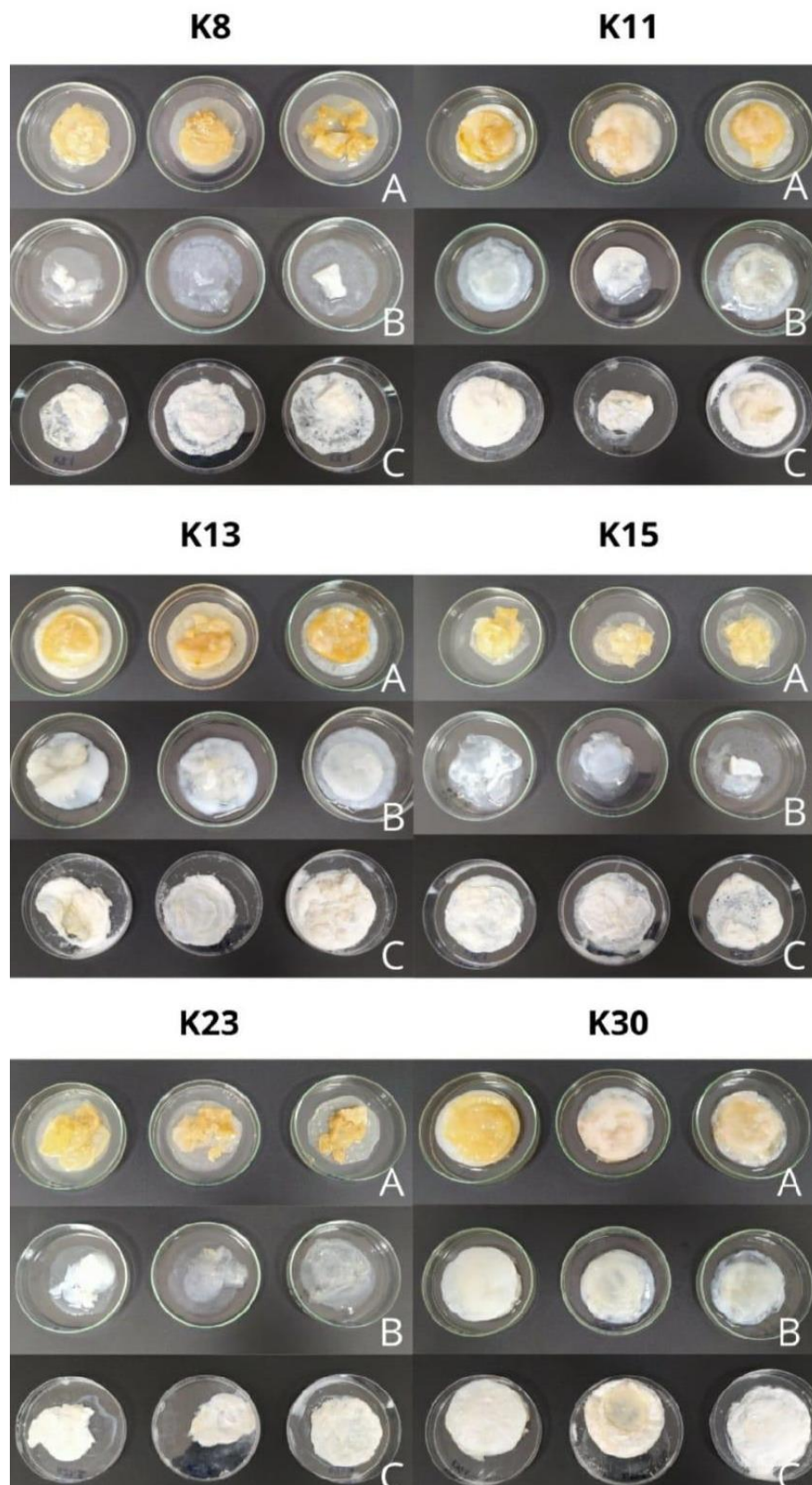


Figura 10 – Aspecto visual dos SCOBY de kombucha. (A) SCOBY formado após 10 dias de fermentação; (B) SCOBY purificado após tratamento com água destilada e solução alcalina; e (C) SCOBY após liofilização. Fonte: Autoria própria.



Figura 11 – Material celulósico de SCOBY após o processo de liofilização. Fonte: Autoria própria.

Tabela 2 - Rendimento de celulose, produtividade volumétrica e capacidade de retenção de água dos SCOBY formados após 10 dias de fermentação.

Inóculos	Rend. SCOBY úmido (g/100 mL)	Rend. CB seco (g/100 mL)	Produtividade (g/L.h)	CRA (%)
K8	1,728 ± 0,189 ^e	0,030 ± 0,004 ^b	0,001	98,26
K11	5,588 ± 0,071 ^c	0,144 ± 0,068 ^a	0,006	97,43
K13	11,754 ± 1,071 ^b	0,297 ± 0,225 ^a	0,012	97,47
K15	2,692 ± 0,287 ^d	0,054 ± 0,007 ^b	0,002	98,01
K23	2,651 ± 0,661 ^d	0,039 ± 0,014 ^b	0,002	98,54
K30	16,788 ± 1,114 ^a	0,257 ± 0,076 ^a	0,011	98,47

Médias e seus respectivos desvios-padrão seguidos da mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si (nível de significância de 5% pelo teste *Kruskal-Wallis* e *Mann-Whitney*).

O inóculo K30 apresentou o maior rendimento de SCOBY em base úmida; apesar disso, o mesmo não diferiu estatisticamente de K11 e K13 em relação aos rendimentos de CB em base seca, demonstrando relevante capacidade de retenção de água. A CB apresenta elevada relação superfície/volume, o que facilita as interações com os componentes circundantes do meio e aumenta a capacidade de retenção de água em até 100 vezes em relação ao próprio peso

(VITTA e THIRUVENGADAM, 2021). Essa característica, aliada à alta porosidade, faz com que a CB seja considerada um material adequado para impregnação de substâncias antimicrobianas e outros compostos bioativos para aplicação industrial (GREGORY et al., 2021); além disso, cargas iônicas provenientes das ligações de hidrogênio permitem que certos materiais sejam nela incorporados com facilidade (SWINGLER et al., 2021).

Apesar da síntese de CB ocorrer naturalmente durante a fermentação da kombucha, sua produção é considerada metabolicamente onerosa para as bactérias, consumindo cerca de 10% de todo o ATP gerado no metabolismo (DONINI et al., 2010). A produtividade volumétrica de CB foi relativamente baixa nas condições avaliadas neste estudo; para obtenção de rendimentos maiores, em geral são empregados meios de cultivo específicos, como Hestrin-Schramm (HS) – constituído de glicose, peptona, extrato de levedura, fosfato dissódico e ácido cítrico (VASCONCELOS et al., 2020; PRATAMA, DEVANTHI e KHO, 2021) – bem como diferentes suplementos ao meio de cultivo, como carboximetilcelulose (CHENG, CATCHMARK e DEMIRCI, 2011), glicerol e ácidos orgânicos (LEE et al., 2011). Além disso, o rendimento de CB pode ser melhorado pelo uso de concentrações maiores dos ácidos succínico e cítrico (JUNG et al., 2010), uma vez que ácidos orgânicos que participam do ciclo do ácido tricarboxílico são assimilados e utilizados como fonte de energia, resultando em maior produção de CB. Como neste estudo o objetivo principal foi avaliar a performance fermentativa relacionada à produção da bebida, era de se esperar que os aspectos produtivos relacionados à síntese de CB não fossem tão expressivos. De qualquer maneira, os inóculos avaliados podem ser explorados futuramente, considerando-se seu potencial de aplicação biotecnológica.

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, foi possível constatar que o pH inicial do chá de arranque é uma variável fermentativa importante e que pode influenciar na redução do tempo de fermentação da kombucha. Além disso, considerando-se apenas este parâmetro, os inóculos que apresentaram valores abaixo de 2,5 poderiam ter suas fermentações encerradas no 4º dia de fermentação, de maneira a se atender ao disposto na legislação vigente no país. A ampla variação dos valores de acidez total e volátil das bebidas sugere diferenças quanto às características sensoriais do produto, ainda que análises sensoriais não tenham sido realizadas. Populações de leveduras, bactérias acéticas e lácticas foram superiores às relatadas em outros estudos; estas últimas foram particularmente expressivas, a despeito da pouca relevância comumente atribuída ao seu papel para a qualidade da bebida. A análise da diversidade microbiana dos inóculos por meio de identificação taxonômica poderá contribuir para uma melhor compreensão acerca da influência da microbiota na performance fermentativa e, conseqüente, nos atributos de qualidade da kombucha. Ácido glicônico foi identificado como o mais abundante nas kombuchas avaliadas, seguido do ácido acético. As concentrações de açúcares residuais do produto final diferiram dentre os SCOBY utilizados, demonstrando que parte significativa dos açúcares adicionados no início do processo persistem no produto final. Quanto à produção de celulose, apesar dos valores pouco expressivos para o rendimento e produtividade, os inóculos avaliados podem ser explorados futuramente para fermentação a partir de outros tipos de substratos, visando à aplicação biotecnológica em diferentes setores industriais.

REFERÊNCIAS

AMORIM, J. D. P. **Obtenção de celulose bacteriana aditivada com extrato de própolis para aplicação em cosméticos**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2020. Disponível em:< <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/38837>>. Acesso em jan., 2022.

AKYUZ, S.; YARAT, A. The pH and Neutralisable Acidity of the Most-Consumed Turkish Fruit and Herbal Teas. **OHDMBSC**, p.75-78, 2010. Disponível em:< <https://www.walshmedicalmedia.com/open-access/the-ph-and-neutralisable-acidity-of-the-mostconsumed-turkish-fruit-and-herbal-teas-2247-2452-9-411.pdf>>. Acesso em jan. 2022.

ANTÔNIO, R. V. et al. **Produção de celulose bacteriana a partir de diferentes substratos**. 1º Simpósio de Integração Científica e Tecnológica do Sul Catarinense – SICT-Sul. Santa Catarina: Rev. Técnico Científico (IFSC), 2012.

BENEVENUTI, C. S. J. **Prospecção Tecnológica da Produção de ácido láctico no contexto de Biorrefinarias: Tendências e oportunidades**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2016. Disponível em:<http://epqb.eq.ufrj.br/download/prospeccao-tecnologica-da-producao-acido-latico-no-contexto-de-biorrefinaria.pdf>. Acesso em jan. 2022.

BOGDAN, M. et al. Lactic acid bacteria strains isolated from Kombucha with potential probiotic effect. **Romanian Biotechnological Letters**, p. 1 – 7, 2018.

BRASIL, Instrução Normativa n. 41 de 17 de setembro de 2019. Estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha em todo o território nacional. Brasília, 17 set. 2019. Disponível em:<<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-41>>. Acesso em Jan 2022.

BRUINI, B. et al. Aspectos físico-químicos e microbiológicos no processo de fabricação da kombucha. **Revista Engenharia**, p. 48-67, 2019.

CARPENTER, S. R. Microcosm experiments have limited relevance for community and ecosystem ecology: Reply. **Ecology**, v. 80, n. 3, p. 1085 - 1088, 1999.

CHENG, K. C.; CATCHMARK, J. M.; DEMIRCI, A. Effects of CMC addition on bacterial cellulose production in a biofilm reactor and its paper sheets analysis. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 3, p. 730-736, 2011. doi: 10.1021/bm101363t

CHU, S. D.; CHEN, C. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. **Food Chemistry**, v. 98, n. 3, p. 502-507, 2006. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.05.080

COTON, M. et al. Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 5, p. 1 – 40, 2017. doi:10.1093/femsec/fix048

COX, M.; NELSON, D. L. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Rio Grande do Sul: Artmed Editora, 6ª ed, 2014.

CRUZ, M. L. **Avaliação de condições operacionais na fermentação alcoólica VHG empregando diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae***. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2019. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/24567/3/AvaliacaoCondicoesOperacionais.pdf>>. Acesso em jan. 2022.

DONINI, Í. A. et al. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química**, v. 35, p. 165 - 178, 2010. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-46702010000400021>

FILIPPIS, F.; TROISE, P. V.; ERCOLINI, D. Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. **Food Microbiology**, v. 73, p. 11-16, 2018. doi: [10.1016/j.fm.2018.01.008](https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.008)

GAO, Z. et al. Inhibitory Effect of Lactic Acid Bacteria on Foodborne Pathogens: A Review. **Journal of Food Protection**, v. 82, n.3, p. 441–453, 2019. doi: [10.4315/0362-028x.jfp-18-303](https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-18-303)

GREGORY, D. A. et al. Bacterial cellulose: A smart biomaterial with diverse applications. **Materials Science and Engineering**, v. 145, n. 10, p. 6 – 23, 2021. doi: [10.1016/j.mser.2021.100623](https://doi.org/10.1016/j.mser.2021.100623)

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**. v. 44, n. 2, p. 121 – 129, 2001. doi:[10.1016/s0167-7012\(00\)00241-4](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(00)00241-4)

IVANISOVÁ, E. et al. Evaluation of chemical, antioxidant, antimicrobial and sensory properties of kombucha tea beverage. **Food Sci Technol**, v. 57, v. 5, p. 1840–1846, 2020. doi: [10.1007/s13197-019-04217-3](https://doi.org/10.1007/s13197-019-04217-3)

JAFARI, R. et al. Isolation, molecular and phylogenetic identification of microorganisms from Kombucha solution and evaluation of their viability using flow cytometry Reyhaneh. **Food Science and Technology**, p. 1 – 12, 2021. doi: [10.1590/fst.63220](https://doi.org/10.1590/fst.63220)

JAYABALAN, R.; MARIMUTHU, S.; SWAMINATHAN, K. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. **Food Chemistry**, v. 102, n. 1, p. 392–398, 2007. doi: [10.1016/j.foodchem.2006.05.032](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.032)

JAYABALAN, R. et al. A review on kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 538-550, 2014. doi: [10.1111/1541-4337.12073](https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073)

JAYABALAN, R. et al. Preservation of kombucha tea: effect of temperature on tea components and free radical scavenging properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 19, p. 9064 - 9071, 2008. doi: [10.1021/jf8020893](https://doi.org/10.1021/jf8020893)

JUNG, H. I. et al. Influence of glycerol on production and structural–physical properties of cellulose from *Acetobacter* sp. V6 cultured in shake flasks. **Bioresource technology**, v. 101, n. 10, p. 3602 – 3608, 2010. doi: [10.1016/j.biortech.2009.12.111](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.111)

KAEWKOS, T.; BOVONSOMBUT, S.; TRAGOOLPUA, Y. Efficacy of Kombucha Obtained from Green, Oolong, and Black Teas on Inhibition of Pathogenic Bacteria, Antioxidation, and

Toxicity on Colorectal Cancer Cell Line. **Microorganisms**, v. 12, n. 7, p. 1 – 70, 2019. doi:10.3390/microorganisms7120700

KALLEL, L. et al. Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 226 - 232, 2012. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.018>

LEE, C. M. et al. Cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* strains ATCC 53524 and ATCC 23768: Pellicle formation, post-synthesis aggregation and fiber density. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 270–276, 2015. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.06.091

LEE, K. Y. et al. Surface only modification of bacterial cellulose nanofibres with organic acids. **Cellulose**, v. 18, n. 3, p. 595-605, 2011. doi: 10.1007/s10570-011-9525-z

LUNKES, L. B. F.; HASHIZUME, L. N. Avaliação do pH e da acidez titulável de chás comercialmente disponíveis no mercado brasileiro. **RGO - Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 62, n. 1, p. 59 - 64, 2014. doi: <https://doi.org/10.1590/1981-8637201400010000092623>

LUTZ, I. A. **Métodos físicos químicos para comparação de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 4^a ed. (1^a Edição digital), 2008. Disponível em:<<https://wp.ufpel.edu.br/nutricaoobromatologia/files/2013/07/NormasADOLFOLUTZ.pdf>>. Acesso em Jan de 2022.

MARSH, A. J. et al. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. **Food Microbiology**, v. 38, p. 171–178, 2014. doi: 10.1016/j.fm.2013.09.003

MAYSER, P. et al. The yeast spectrum of the “tea fungus Kombucha”. **Mycoses**, v. 38, p. 289 - 295, 1995. doi: 10.1111/j.1439-0507.1995.tb00410.x

MOURA, A. B. **Monitoramento do processo fermentativo da kombucha de chá Mate**. Vitória de Santo Antão: Universidade Federal de Pernambuco, 2019. Disponível em:<<https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/33633/1/MOURA%2C%20%20Aurea%20Barbosa%20de.pdf>>. Acesso em mai. 2020.

NEFFE-SKOCINSKA, K. et al. Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. **Journal CyTA - Journal of Food**, v. 15, n. 4, p. 601 - 607, 2017. doi: 10.1080/19476337.2017.1321588

NGUYEN, N. K. et al. Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1149 – 1155, 2015. doi: 10.1016/j.lwt.2015.07.018

NUMMER, B. A. Kombucha brewing under the food and drug administration model food code: risk analysis and processing guidance. **Journal of Environmental Health**, p. 8-11, 2013. Disponível em:<<https://agriculture.ny.gov/system/files/documents/2019/03/kombuchanummer.pdf>>. Acesso em jan. 2022.

ÖZOGUL, F.; HAMED, I. The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amines formation: a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 58, n. 10, p. 1660 - 1670, 2018. doi: 10.1080/10408398.2016.1277972

PRATAMA, F.; DEVANTHI, P. V. P.; KHO, K. Development of Selective Media for *Komagataeibacter intermedius* and *Dekkera bruxellensis* from a Mixed Culture. **Nusantara Science and Technology Proceedings**, p. 32 - 38, 2021. doi: <https://doi.org/10.11594/nstp.2021.1106>

QUIROGA, A. L. B. Ácidos Alimentícios. **Food Ingredients Brasil**, p. 29 – 42, 2016. Disponível em: https://revista-fi.com.br/upload_arquivos/201606/2016060135153001465239424.pdf. Acesso em jan. 2022.

RAHMAN, M. M.; NETRAVALI, A. N. Aligned bacterial cellulose arrays as “Green” nanofibers for composite materials. **ACS Macro Letters**, v. 5, n. 9, p. 1070-1074, 2016. doi: <https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.6b00621>

RAMACHANDRAN, S. et al. Gluconic acid: Properties, applications and microbial production. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 185–195, 2006.

RUKA, D. R.; SIMON, G. P.; DEAN, K. M. Bacterial cellulose and its use in renewable composites. **Nanocellulose polymer nanocomposites: fundamentals and applications**, p. 89-130, 2014. doi: 10.1002/9781118872246.ch4

SANTOS, M. J. **Kombucha: Caracterização da microbiota e desenvolvimento de novos produtos alimentares para uso em restauração**. Portugal: Universidade de Lisboa, 2016. Disponível em: <https://run.unl.pt/bitstream/10362/19346/1/Santos_2016.pdf> Acesso em mai. 2020.

SANTOS, U. et al. Avaliação de potencial de ervas medicinais: Capim-limão (*Cymbopogon citratus* d.c.), chá verde (*Camellia sinensis* L.) e hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) para obtenção de chás solúveis. **Revista GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**. v. 4, n. 4, 2014. doi: <https://doi.org/10.47059/geintecmagazine.v4i4.566>

SANTOS, W. C. R.; BARBOSA, C. D.; LACERDA, U. A. C. **Obtenção e Caracterização de kombucha de chá preto**. Belo Horizonte: 69ª Reunião Anual da SBPC, 2017. Disponível em: <http://www.sbpcnet.org.br/livro/69ra/resumos/resumos/3112_197ceb2d1c03053d187fae353c9a8273d.pdf>. Acesso em jan. 2022.

SANTOS, Y. M. A. et al. Avaliação da composição de kombucha a base de diferentes chás (verde e preto). **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**, p. 1 – 6, 2019. ISSN:2317-3122

SCHROEDER, J. **Kombucha fermentada a partir de resíduos de acerola**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2019. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/199730/TCC%20J%20C%20A9ssica%20Schroeder.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em mai. 2020.

SELBYVILLE, D. **Crescimento da previsão do mercado de Kombuchá em 16% CAGR até 2025: Global Market Insights**, 2020. Disponível em: <<https://www.prnewswire.com/news->

releases/growth-of-kombucha-market-forecast-at-16-cagr-up-to-2025-global-market-insights-inc-300986945.html>. Acesso em mai. 2021.

SOUSA, L. P. et al. Effect of water and alkali on purification bacterial cellulose membrane from Kombucha. **Research, Society and Development**, p. 52- 61, 2021. doi: 10.33448/rsd-v10i15.23267

SUHRE, T. **Kombuchas produzidas e comercializadas no Brasil: características físico-químicas e composição microbiana**. Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2020. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/211888/001115269.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em jan. 2022.

SWINGLER, S. et al. Recent advances and applications of bacterial cellulose in biomedicine. **Polymers**, v. 13, n. 3, p. 4 – 12, 2021. doi: 10.3390/polym13030412

TAUFNER, K. **Fermentação secundária de kombucha com extrato de *Inga edulis*: Efeito do tempo de fermentação e da concentração do extrato na qualidade do produto**. Vila Velha: Universidade de Vila Velha, 2020. Disponível em: < <https://repositorio.uvv.br/bitstream/123456789/818/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O%20FINAL%20DE%20KARLA%20TAUFNER.pdf>>. Acesso em jan. 2022.

TEOH, A. L.; HEARD, G.; COX, J. Ecology of Kombucha Fermentation Yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, n. 2, p. 119 – 126, 2004. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12

TRAN, T. et al. Microbiological and technological parameters impacting the chemical composition and sensory quality of kombucha. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, p. 1-21,2020. doi:10.1111/1541-4337.12574

VASCONCELOS, G. M. D. D. et al. Production and characterization of cellulose by *Glucanoacetobacter hansenii* in medium containing glucose or mannitol. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 4, p. 1 – 25, 2020. doi: <https://doi.org/10.1590/S1517-707620200004.1144>

VILLARREAL-SOTO, S. et al. Understanding kombucha tea fermentation: a review. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 3, p. 580-588, 2018. doi: 10.1111/1750-3841.14068

VITTA, S.; THIRUVENGADAM, V. Multifunctional bacterial cellulose and nanoparticle embedded composites. **Current Science**, v. 102, n. 10, p. 1398-1405, 2012.

WANG, J. et al. Novel bacterial cellulose/gelatin hydrogels as 3D scaffolds for tumor cell culture. **Polymers**, v. 10, n. 6, p. 5-81, 2018. doi: 10.3390/polym10060581

WANG, S. et al. Effect of synthetic microbial community on nutraceutical and sensory qualities of kombucha. **International Journal of Food Science & Technology**, p. 1 – 7, 2020. doi:10.1111/ijfs.14596

WATAWANA, M. I. et al. Health, wellness, and safety aspects of the consumption of kombucha. **Journal of Chemistry**, p. 1 - 11, 2015. doi: 10.1155/2015/591869

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Doação.

TERMO DE DOAÇÃO

Eu, _____, CPF N° _____, declaro estar ciente que minha participação no projeto de pesquisa “Caracterização microbiana e performance fermentativa de diferentes inóculos brasileiros de kombucha”, sob coordenação do Prof. José Guilherme Prado Martin, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), é na condição de colaborador(a) voluntário(a), estando restrita à doação de SCOBY de kombucha, para fins de pesquisa. Declaro, ainda, que fui informado(a) acerca dos objetivos do referido projeto e que abro mão de quaisquer direitos oriundos do desenvolvimento da pesquisa e de futuros produtos gerados.

Data: ____ / ____ / ____

Assinatura: _____

APÊNDICE B - Tabela da quantificação dos grupos microbianos majoritários presentes nos diferentes SCOBY de kombucha.

Tabela 3 - Quantificação dos grupos microbianos majoritários presentes em cada SCOBY de kombucha.

Inóculos	Bactérias Lácticas	Bactérias Acéticas	Leveduras
K1	7,69 ± 0,36 ^{ijkl} ▲●	8,06 ± 0,46 ^{mnpq} ▲	6,78 ± 0,79 ^{ijkl} ●
K2	8,08 ± 0,12 ^{ghi} ●	8,34 ± 0,18 ^{klmno} ▲●	8,70 ± 0,31 ^{bcd} ▲
K3	8,21 ± 0,02 ^{efg}	8,15 ± 0,33 ^{lmnopq}	8,38 ± 0,18 ^{cde}
K4	8,98 ± 0,21 ^{bcd}	9,09 ± 0,13 ^{bcdef}	8,90 ± 0,44 ^{abcd}
K5	9,16 ± 0,24 ^{abc} ▲	9,19 ± 0,27 ^{bcd} ▲	7,29 ± 0,66 ^{hij} ●
K6	6,69 ± 0,79 ^{kl}	6,68 ± 0,77 ^r	6,17 ± 0,72 ^{ijkl}
K7	7,61 ± 0,37 ^{ijkl} ●	8,15 ± 0,24 ^{mnpq} ▲	6,16 ± 0,20 ^{kl} ○
K8	8,61 ± 0,43 ^{def} ▲	8,77 ± 0,41 ^{efghij} ▲	7,72 ± 0,17 ^{ghi} ●
K9	6,60 ± 0,36 ^{kl} ▲	6,72 ± 0,44 ^r ▲	6,23 ± 0,07 ^{kl} ●
K10	8,24 ± 0,18 ^{efg}	8,28 ± 0,22 ^{klmnop}	8,25 ± 0,12 ^{ef}
K11	6,48 ± 0,61 ^l	6,69 ± 0,42 ^r	6,45 ± 0,74 ^{ijkl}
K12	9,23 ± 0,09 ^{ab} ▲	9,29 ± 0,06 ^{abc} ▲	7,80 ± 0,60 ^{fgh} ●
K13	7,38 ± 0,87 ^{hijkl} ▲	7,39 ± 0,69 ^{qr} ▲	6,03 ± 0,27 ^l ●
K14	9,14 ± 0,23 ^{abc}	9,13 ± 0,15 ^{bcde}	8,60 ± 0,51 ^{bcde}
K15	9,19 ± 0,42 ^{abc} ●	10,03 ± 0,16 ^a ▲	9,48 ± 0,02 ^a ●
K16	8,94 ± 0,24 ^{bcd} ▲	9,02 ± 0,24 ^{cdefg} ▲	8,03 ± 0,06 ^{fg} ●
K17	8,17 ± 0,29 ^{fgh} ▲	8,12 ± 0,16 ^{nopq} ▲	6,05 ± 0,34 ^l ●
K18	9,11 ± 0,19 ^{abc} ▲	8,91 ± 0,10 ^{defghi} ▲	7,66 ± 0,22 ^{ghi} ●
K19	8,69 ± 0,35 ^{cde} ▲	8,75 ± 0,46 ^{fghijk} ▲	7,88 ± 0,29 ^{fgh} ●
K20	7,83 ± 0,20 ^{hijkl} ▲	8,04 ± 0,17 ^{opqr} ▲	7,23 ± 0,13 ^{ijk} ●
K21	8,93 ± 0,38 ^{bcd}	9,02 ± 0,35 ^{defgh}	8,37 ± 0,07 ^{de}
K22	8,41 ± 0,38 ^{efg}	8,62 ± 0,42 ^{ghijkl}	8,18 ± 0,16 ^{ef}

Tabela 3 - Quantificação dos grupos microbianos majoritários presentes em cada SCOBY de kombucha (continua).

K23	9,35 ± 0,11 ^a	9,34 ± 0,19 ^{abc}	9,22 ± 0,27 ^{ab}
K24	8,01 ± 0,02 ^{ghij} ○	9,43 ± 0,06 ^{ab} ▲	8,46 ± 0,03 ^{bcde} ●
K25	7,91 ± 0,02 ^{hijk}	7,87 ± 0,11 ^{pqr}	7,80 ± 0,09 ^{ghi}
K26	8,27 ± 0,08 ^{efg} ●	8,43 ± 0,03 ^{ijklmn} ▲	8,42 ± 0,06 ^{cde} ▲
K27	7,84 ± 0,24 ^{hijkl} ●	8,99 ± 0,06 ^{defgh} ▲	7,19 ± 0,19 ^{ijk} ○
K28	8,26 ± 0,55 ^{fgh}	8,70 ± 0,39 ^{ghijk}	8,29 ± 0,65 ^{ef}
K29	9,13 ± 0,14 ^{abc}	9,14 ± 0,06 ^{bcd}	9,10 ± 0,14 ^{abc}
K30	8,25 ± 0,08 ^{efg}	8,63 ± 0,48 ^{hijklm}	8,21 ± 0,37 ^{ef}

Populações microbianas expressas em Log UFC/g de SCOPY, seguidas de seus respectivos desvios-padrão. Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem entre si e médias seguidas do mesmo símbolo na mesma linha não diferem estatisticamente entre si (nível de significância de 5% pelo teste *Kruskal-Wallis* e *Mann-Whitney*).

ANEXO

ANEXO A - Ficha de certificação do chá verde utilizado durante o experimento.



CERTIFICADO DE ANÁLISE GUNPOWDER GREEN TEA 9375

PRODUTO:	CHÁ VERDE GUNPOWDER 9375 - CHINÊS	Cod CHV	GRAU ALIMENTÍCIO
Nome Científico:	<i>Camellia sinensis</i> (L.) O. Kuntze	Método de Secagem:	ESTUFA
Família:	Theaceae		
Parte Utilizada:	FOLHAS	Solvente de Extração:	
Tipo:	Chá Verde GunPowder gramagem 9375.	Excipiente:	
Lote:	AUTO9D04		
Fabricante:	LIANGXI TEA FACTORY		
Cidade Província País	Shaoxing, Zhejiang, China.		
Fornecedor:	http://www.liangxitea.com	Esterilização:	Não
Lote do Fornecedor:	ZH415419358	GMO:	Não Aplicável
Data da Colheita:		9/20 BSE:	Não Aplicável
Data da Fabricação:		9/20 N Certificado de Análise:	94 2/7
Data da Validade:		9/22 Data de Emissão de Certificado:	20/12/20

ANÁLISES ORGANOLÉPICAS, FÍSIO-QUÍMICAS E DOSEAMENTO DE ATIVOS

ANÁLISE	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADO	REFERÊNCIA
Aspecto	FOLHAS E BROTO DESIDRATADOS	CONFORME	UFBA C. SINENSIS 2011, P.15
Cor	VERDE	CONFORME	UFBA C. SINENSIS 2011, P.15
Odor	CARACTERÍSTICO	CONFORME	UFBA C. SINENSIS 2011, P.14
Água (105°C em Estufa)	MÁXIMO 12,00%	3,07%	UFBA C. SINENSIS 2011, P.62
Cinzas Totais	MÁXIMO 10,00%	5,46%	UFBA C. SINENSIS 2011, P.64
Cinzas Insolúvel	MÁXIMO 1,50%	0,79%	UFBA C. SINENSIS 2011, P.64
Material Estranho	MÁXIMO 2,00%	AUSENTE	FARM. BRASILEIRA 5ª ED. VOL. 1 P.197
Análise 1	TEOR DE FLAVONÓIDES - MÍNIMO 0,30%	5,63%	PLANTAS E PRODUTOS VEGETAIS 4 ED. P. 230
Análise 2	TEOR DE CAFEÍNA - MÍN. 2,00% MÁX. 4,00%	3,98%	PLANTAS E PRODUTOS VEGETAIS 4 ED. P. 230
Análise 3	TEOR DE POLIFENÓIS - MÍNIMO 0,50%	3,30%	PLANTAS E PRODUTOS VEGETAIS 4 ED. P. 230

OBSERVAÇÕES

- Mudança de cor pode ocorrer devido ao fato de que o produto é de origem vegetal/animal.
- Armazenamento em local seco e arejado, sem umidade e calor.
- Farmacêutica Responsável: Andréa Bernardes - CRF/SP: 13.987

Fabiano Spohr - CNPJ 33.679.338/0001-70
fabiano_spohr@cloud.com