

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica  
Área de Tecnologia de Alimentos

Avaliação de variáveis de maior impacto na formação de etanol no processo  
produtivo de kombucha

Daniel Quarentei Rossini

Versão Corrigida

Dissertação apresentada para a Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo como  
exigência para obtenção do grau de Mestre em  
Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Stewart  
Bittencourt Bogsan

São Paulo  
2023

Daniel Quarentei Rossini

Avaliação de variáveis de maior impacto na formação de etanol no processo  
produtivo de kombucha

Comissão Julgadora  
Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Prof. Dr.  
Orientador/presidente

---

1º Examinador

---

2º Examinador

---

3º Examinador

---

4º Examinador

São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

R835a Rossini, Daniel Quarentei Avaliação de variáveis de maior impacto na formação de etanol no processo produtivo de kombucha / Daniel Quarentei Rossini. - São Paulo, 2023.  
85 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.  
Orientador: Bogsan, Cristina Stewart Bittencourt

1. Fermentação. 2. Alimentos Fermentados. 3. Planejamento Experimental. I. T. II. Bogsan, Cristina Stewart Bittencourt, orientador.

## **Agradecimentos**

Agradeço em primeiro lugar à minha mãe, que me ajudou de tantas maneiras, a ingressar, cursar, respirar e concluir esse trabalho. Muito obrigado pelas palavras, conforto, estrutura e financiamento, sem sua ajuda eu não teria percorrido esse caminho com tanta firmeza.

Ao meu pai, que além do suporte financeiro, também me inspirou a gostar dos estudos e das coisas da vida.

Ao meu irmão mais velho, que vivendo longe e construindo sua família me proporcionou a oportunidade de sonhar com um objetivo que me manteve animado e alegre.

Ao meu irmão mais novo, que ao mesmo tempo descobria novos caminhos na vida e na formação acadêmica e compartilhou comigo o prazer de aprender e se transformar.

À minha tia, que como uma segunda mãe, também me deu apoio e suporte de tantas maneiras, do financeiro até a alegria gratuita do cotidiano.

À minha namorada, que compartilhando a vida comigo me fez companhia em momentos difíceis e trouxe a alegria e empolgação que me fazia redescobrir a beleza do que faço e do que somos. Sua presença na minha vida me ajudou de formas que nem mesmo consigo explicar.

À minha orientadora Cristina, que acreditou na minha capacidade de idealizar, planejar e realizar um projeto, que me recebeu de volta à Universidade depois de alguns anos de um caminho que ao final me colocou no lugar onde eu queira estar.

Aos meus colegas, em especial Ícaro e Rayane, que foram sempre tão gentis e divertidos. Me alegro que mesmo diante de uma realidade difícil como a pandemia conseguimos criar laços de amizade e parceria.

À professora Inar Castro Erger, que me abriu os olhos à estatística e ao planejamento experimental, permitindo que esse projeto percorresse um caminho mais firme do que eu podia imaginar.

Ao professor Maurício Yonamine e todos seus alunos do laboratório de toxicologia, em especial ao doutorando André Luis Fabris, por toda ajuda e suporte na realização das análises de etanol.

A todos os professores, funcionários e estudantes da USP e da FCF por me ensinarem cada qual à sua maneira a me formar mestre num período tão conturbado no mundo e no Brasil.

Finalmente, gostaria de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro através da bolsa de estudos do programa SWE com número de processo 130471/2021-6.

## Resumo

ROSSINI, D.Q. **Avaliação de variáveis de maior impacto na formação de etanol no processo produtivo de kombucha.** 2023. 85f. Dissertação de Mestrado [Programa de Mestrado]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 2023.

A kombucha é uma bebida fermentada resultante da ação de leveduras e bactérias sobre um substrato constituído por sacarose dissolvida numa infusão de *Camellia Sinensis*. O interesse crescente do mercado nacional e internacional na kombucha trouxe a necessidade de estabelecer parâmetros de qualidade da bebida. No Brasil estabeleceu-se uma legislação baseada em sua composição química. Nossos resultados preliminares demonstram que 11 de 12 kombuchas comerciais disponíveis na cidade de São Paulo - SP ultrapassaram a concentração limite de etanol de 0,50% v/v (20°C) antes mesmo da legislação entrar em vigor. As mesmas 12 kombuchas foram analisadas após a publicação da legislação e ainda 66,7% das amostras apresentaram níveis de etanol em desacordo com a lei. Assim, se faz necessário controlar os parâmetros físico-químicos da bebida, em especial a formação de etanol. Parâmetros da fermentação, tais como concentração inicial de sacarose, temperatura, geometria do fermentador e tempo de fermentação são potenciais variáveis de impacto nas respostas do sistema fermentativo, incluindo a concentração de etanol. Um experimento de triagem de variáveis foi realizado em duas colônias de kombuchas comerciais com composição microbiológica distintas para encontrar quais variáveis do processo fermentativo causam maior impacto na variação de etanol. A concentração inicial de sacarose e a área interfacial específica do fermentador foram as variáveis de maior impacto na variação de etanol. Os resultados indicam que o estudo das variáveis de maior impacto e uma possível modelagem do sistema fermentativo deve ser feita para cada comunidade microbiana nas condições de trabalho de cada produtor comercial.

Palavras-chave: kombucha, etanol, planejamento experimental, triagem de variáveis

## Abstract

ROSSINI, D.Q. **Evaluation of variables with the greatest impact on ethanol formation in the kombucha production process.** 2023. 85f. School of Pharmaceutical Sciences. University of São Paulo, Brazil. 2023.

Kombucha is a fermented beverage resulting from the action of yeasts and bacteria on a substrate consisting of dissolved sucrose in an infusion of *Camellia Sinensis*. The growing interest of the national and international market in kombucha has brought the need to establish quality parameters for the beverage. In Brazil, legislation based on its chemical composition has been established. Our preliminary results show that 11 out of 12 commercial kombuchas available in the city of São Paulo - SP exceed the ethanol concentration limit of 0.50% v/v (20°C) even before the legislation comes into effect. The same 12 kombuchas were analyzed after the publication of the legislation, and 66.7% of the samples still showed ethanol levels that are not in compliance with the law. Therefore, it is necessary to control the physical-chemical parameters of the beverage, especially the formation of ethanol. Fermentation parameters such as initial sucrose concentration, temperature, fermenter vessel geometry, and fermentation time are potential impact variables on the fermentative system responses, including ethanol concentration. A variable screening experiment was conducted on two distinct commercial kombucha colonies with different microbiological compositions to identify which process variables have the greatest impact on ethanol variation. The initial sucrose concentration and specific interfacial area of the fermenter were the variables with the greatest impact on ethanol variation. The results indicate that the study of the most impactful variables and possible modeling of the fermentative system should be done for each microbial community under the working conditions of each commercial producer.

Keywords: kombucha, ethanol, experimental planning, screening of variables

## Sumário

RESUMO.....	5
ABSTRACT .....	6
1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. COMO É PREPARADA A KOMBUCHA.....	10
1.2. COMPOSIÇÃO MICROBIOLÓGICA .....	11
1.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA .....	16
1.4. POLIFENÓIS.....	18
1.5. ETANOL.....	19
1.5.1. FATORES QUE INFLUENCIAM A FERMENTAÇÃO E A FORMAÇÃO DE ETANOL.....	22
1.5.1.1. COLÔNIA FERMENTATIVA.....	22
1.5.1.2. INÓCULO LÍQUIDO E PELÍCULA SCOPY .....	26
1.5.1.3. FONTE DE CARBONO .....	27
1.5.3.4. TIPO DE CHÁ .....	27
1.5.3.5. TEMPERATURA DA FERMENTAÇÃO .....	29
1.5.3.6. GEOMETRIA DO FERMENTADOR.....	34
1.5.3.7. TEMPO DE FERMENTAÇÃO .....	36
2. OBJETIVOS.....	37
2.1. OBJETIVO GERAL .....	37
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	37
3.1. ANÁLISE DE ETANOL EM KOMBUCHAS COMERCIAIS.....	37
3.1.1. KOMBUCHAS COMERCIAIS.....	37
3.1.2. PREPARO DAS AMOSTRAS .....	38
3.1.3. DETERMINAÇÃO DE ETANOL POR GC-FID-HEADSPACE .....	38
3.1.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	39
3.2. COMPOSIÇÃO MICROBIOLÓGICA DOS SCOPY DE TRABALHO.....	39
3.2.1. PLAQUEAMENTO E CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA .....	39
3.2.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	40
3.3. TRIAGEM DAS VARIÁVEIS DA FERMENTAÇÃO DE MAIOR IMPACTO NA PRODUÇÃO DE ETANOL, ACIDEZ FIXA, ACIDEZ VOLÁTIL E PH DA KOMBUCHA .....	40

3.3.1. MÉTODO DE TRIAGEM DE VARIÁVEIS .....	40
3.3.2. PREPARO DAS KOMBUCHAS .....	44
3.3.3. DETERMINAÇÃO DE ETANOL VIA CG-FID- <i>HEADSPACE</i> .....	44
3.3.4. ACIDEZ TOTAL TITULÁVEL .....	44
3.3.5. ACIDEZ FIXA TITULÁVEL.....	44
3.3.6. ACIDEZ VOLÁTIL .....	45
3.3.6. PH.....	45
3.3.7. BRIX .....	45
3.3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	46
4.1. ETANOL NAS KOMBUCHAS COMERCIAIS .....	46
4.2. COMPOSIÇÃO MICROBIOLÓGICA DOS SCOPY DE TRABALHO .....	51
4.3. TRIAGEM DAS VARIÁVEIS DA FERMENTAÇÃO DE MAIOR IMPACTO NA PRODUÇÃO DE ETANOL, ACIDEZ FIXA, ACIDEZ VOLÁTIL E PH DA KOMBUCHA .....	54
4.3.1. COMPARAÇÃO DAS VARIÁVEIS DE MAIOR IMPACTO SOBRE AS RESPOSTAS DE SC1 E SC2.....	76
5. CONCLUSÕES.....	77
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78



## 1. Introdução

Tradicionalmente, a kombucha é uma bebida fermentada resultante do metabolismo de leveduras e bactérias sobre um substrato que consiste numa infusão de *Camellia Sinensis* adoçada com sacarose, resultando numa bebida levemente ácida com a formação de um biofilme de celulose sobre o líquido (LAUREYS; BRITTON; CLIPPELEER, 2020; TRAN et al., 2020; VILLARREAL-SOTO et al., 2018).

Acredita-se que sua origem seja asiática, mais especificamente chinesa, no entanto não existem fontes verificáveis que sustentem com precisão o momento e a geografia de sua origem (TRAN et al., 2020), apesar disso, atualmente é possível verificar sua ampla popularidade diante da numerosa lista de nomes em variados países, tais como: Cainii grib, Fungus japonicus, Cembuya orientalist, Tschambucco, Volga spring, Mo-Gu, Champignon de longue vie, Teekwass, Kwassan, Kargasok tea, Cainii kvass, Japonskigrib, Kambuha, Tea Kvass, Jsakvasska, Heldenpilz, and Kombuchaschwamm (LAUREYS; BRITTON; CLIPPELEER, 2020).

A popularidade da kombucha no ocidente vem aumentando, seu mercado cresce consistentemente com perspectivas ainda maiores para os próximos anos, com uma taxa de crescimento anual média de 17,5% entre 2019 e 2024 nos EUA e um mercado global de aproximadamente 3,5 bilhões de dólares em 2022 (LAUREYS; BRITTON; CLIPPELEER, 2020; MORDOR INTELLIGENCE, 2023; TROITINO, 2017). Esse cenário pode ser compreendido devido ao aumento do consumo de produtos com alegações funcionais e de benefícios à saúde de uma maneira geral, mas também com a escolha da kombucha como um substituto aos refrigerantes convencionais.

No caso da kombucha, até o momento existe apenas um teste clínico controlado em humanos que indicou benefício à saúde associados ao consumo da bebida (MENDELSON et al., 2023), nesse estudo foi comprovada a ação anti-hiperglicêmica da kombucha quando consumida por indivíduos diabéticos. Outras propriedades já apresentaram bons resultados em testes in vitro, tais como: capacidade antioxidante, atividades antibacterianas e antiproliferativas, detoxificação e estímulo imunológico (CARDOSO et al., 2020; VINA; SEMJONOV; DENINA, 2014). É possível que mais algumas dessas alegações possam vir a ser comprovadas

devido a composição química das kombuchas, em geral ricas em polifenóis, vitaminas e ácidos orgânicos tais como glucurônico e acético (TRAN et al., 2020).

### 1.1. Como é preparada a kombucha

Conforme esquematizado na figura 1, o preparo artesanal da kombucha consiste em cinco passos: (1) infusão de folhas de *Camellia Sinensis* em água quente (80 a 100°C) por cerca de alguns minutos (5 a 10 minutos), (2) adição de sacarose (na maioria das vezes na forma de açúcar convencional) em quantidades que variam de 50 a 100 g/L, (3) filtração da parte sólida não dissolvida e resfriamento natural, (4) inoculação das leveduras e bactérias na forma do biofilme (SCOBY) e/ou de uma porção de kombucha já fermentada de um lote anterior (10 a 15 % v/v), (5) cobrindo o recipiente com um pano de malha fina para evitar insetos, deixa-se fermentar à temperatura ambiente por 7 a 10 dias.

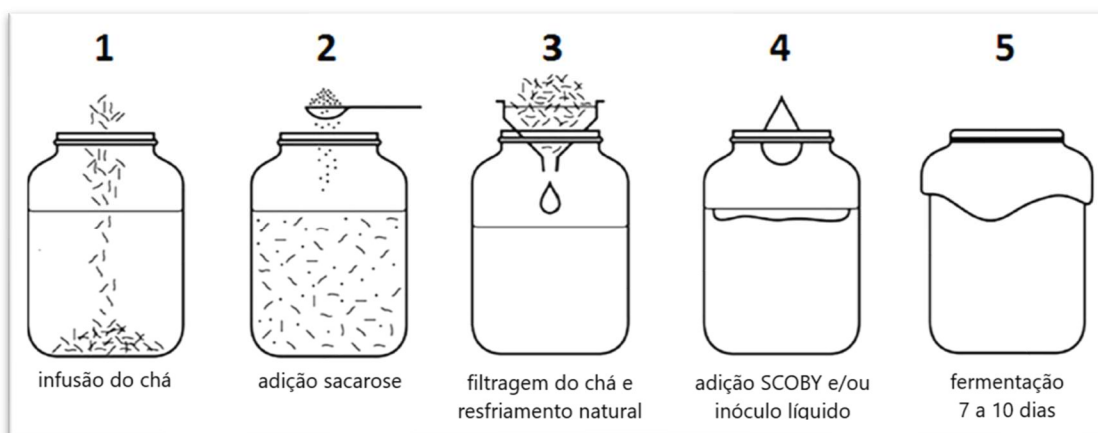


Figura 1 – Etapas do preparo artesanal da kombucha (adaptada de Diez-Ozaeta e Astiazaran (2022)).

Após a bebida atingir um perfil sensorial desejado, transfere-se o conteúdo do recipiente fermentador para garrafas que serão fechadas para uma segunda fermentação estritamente anaeróbica onde o CO<sub>2</sub> formado ficará preso no líquido tornando a kombucha gaseificada.

## 1.2. Composição microbiológica

A composição qualitativa básica dos micro-organismos presentes na kombucha consiste em leveduras variadas, bactérias do ácido acético e eventualmente e em menor quantidade bactérias do ácido láctico (COTON et al., 2017; MARSH et al., 2014; REVA et al., 2015). A variedade de leveduras e bactérias apresentadas pela literatura é ampla em termos de gêneros e espécies, a lista que se encontra na tabela 1 abaixo foi elaborada por Soares, de Lima e Schmidt (2021) reunindo os microrganismos encontrados até então em kombuchas de laboratório e comerciais.

Tabela 1 - Leveduras e Bactérias encontradas na kombucha

**Leveduras**

<i>Arxula adenivorans</i>
<i>Brettanomyces lambicus</i>
<i>Brettanomyces clausenii</i>
<i>Brettanomyces custersii</i>
<i>Candida kefir</i>
<i>Candida krusei</i>
<i>Candida stellata</i>
<i>Candida stellimalicola</i>
<i>Candida tropicalis</i>
<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Debaryomyces hansenii</i>
<i>Dekkera anômala</i>
<i>Dekkera bruxellensis</i>
<i>Eremothecium ashbyii</i>
<i>Eremothecium cymbalariae</i>
<i>Halomonas sp.</i>
<i>Hanseniaspora uvarum</i>
<i>Hanseniaspora meyeri</i>
<i>Hanseniaspora valbyensis</i>
<i>Hanseniaspora vineae</i>
<i>Herbaspirillum sp.</i>
<i>Kazachstania telluris</i>
<i>Kazachstania exígua</i>
<i>Kloeckera apiculata</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>
<i>Lachancea thermotolerans</i>
<i>Lachancea fermentati</i>
<i>Lachancea kluyveri</i>
<i>Merimblaingelheimense</i>
<i>Meyerozyma caribbic</i>
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
<i>Mycoderma sp.</i>
<i>Mycotorula sp.</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Saccharomyces Ludwig</i>
<i>Saccharomyces ludwigii</i>
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>Starmeraamethionina</i>
<i>Starmeracaribae</i>
<i>Pichia fermentans</i>
<i>Pichia mexicana</i>
<i>Sporopachydermialactativor</i>
<i>Torulaspora delbrueckii</i>
<i>Torulopsis sp.</i>
<i>Zygowilliopsis californica</i>
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>

**Bactérias**

<i>Acetobacter sp.</i>
<i>Acetobacter aceti</i>
<i>Acetobacter pasteurianus</i>
<i>Acetobacter nitrogenifigens</i>
<i>Acetobacter peroxydans</i>
<i>Bacterium gluconicum</i>
<i>Enterobacter cancerogenus</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Enterobacter ludwigii.</i>
<i>Gluconacetobacter kombuchae</i>
<i>Gluconacetobacter europaeus</i>
<i>Gluconobacter saccharivorans</i>
<i>Gluconobacter oxydans</i>
<i>Komagataebacter xylinus</i>
<i>Komagataebacter rhaeticuse</i>
<i>Komagataebacter hansenii</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Oenococcus oeni</i>

Embora a listagem de leveduras e bactérias encontradas seja grande, Harrison e Curtin (2021) analisaram 103 kombuchas comerciais e encontraram uma maior abundância relativa para as espécies do gênero *Brettanomyces/Dekkera* e *Komagataeibacter* para leveduras e bactérias respectivamente. É possível verificar a distribuição nas populações analisadas nas figuras 2 e 3.

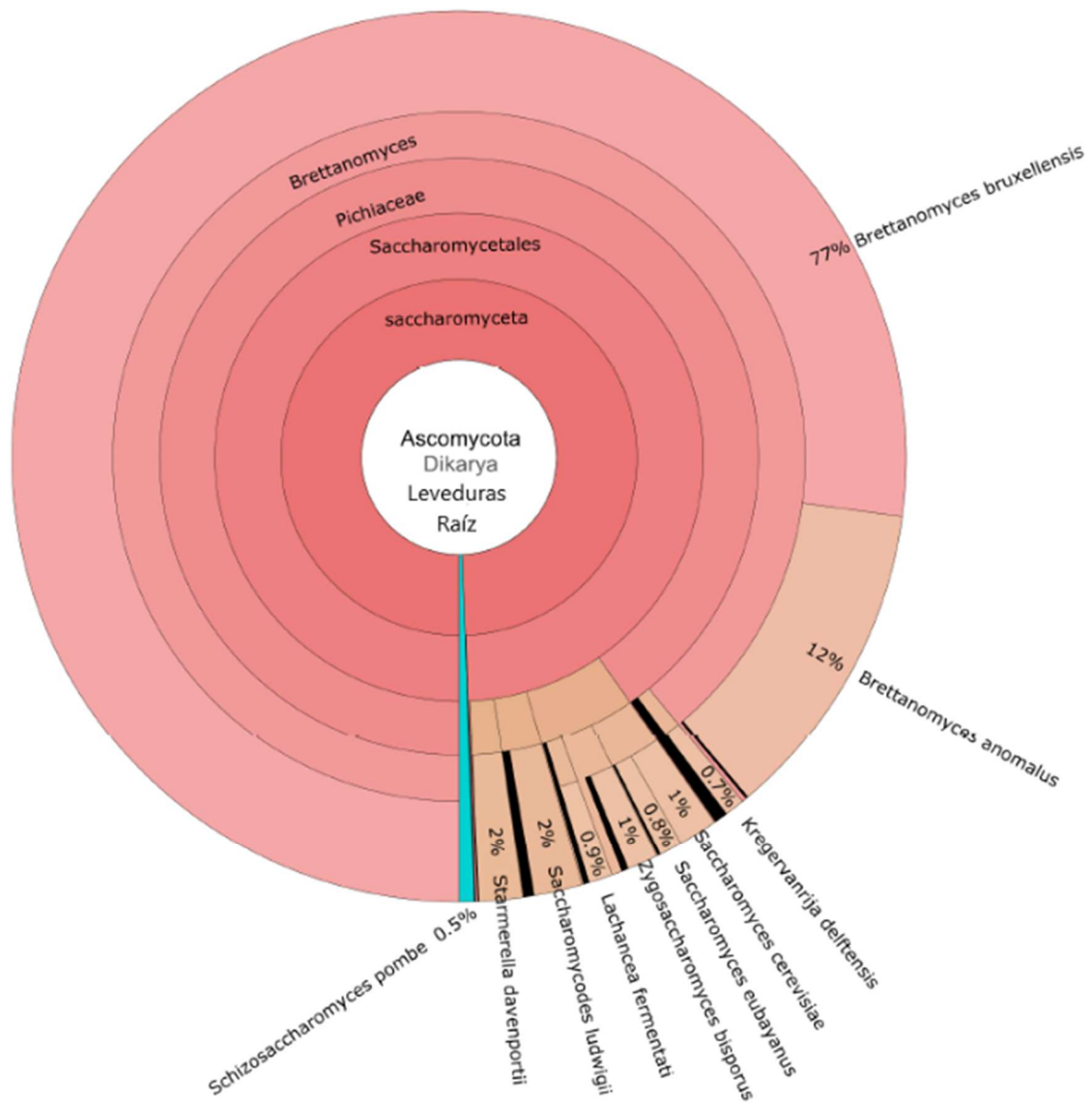


Figura 2 – Sequenciamento *Shotgun* de fungos de um “meta”-SCOBY (adaptada de Harrison e Curtin (2021)).

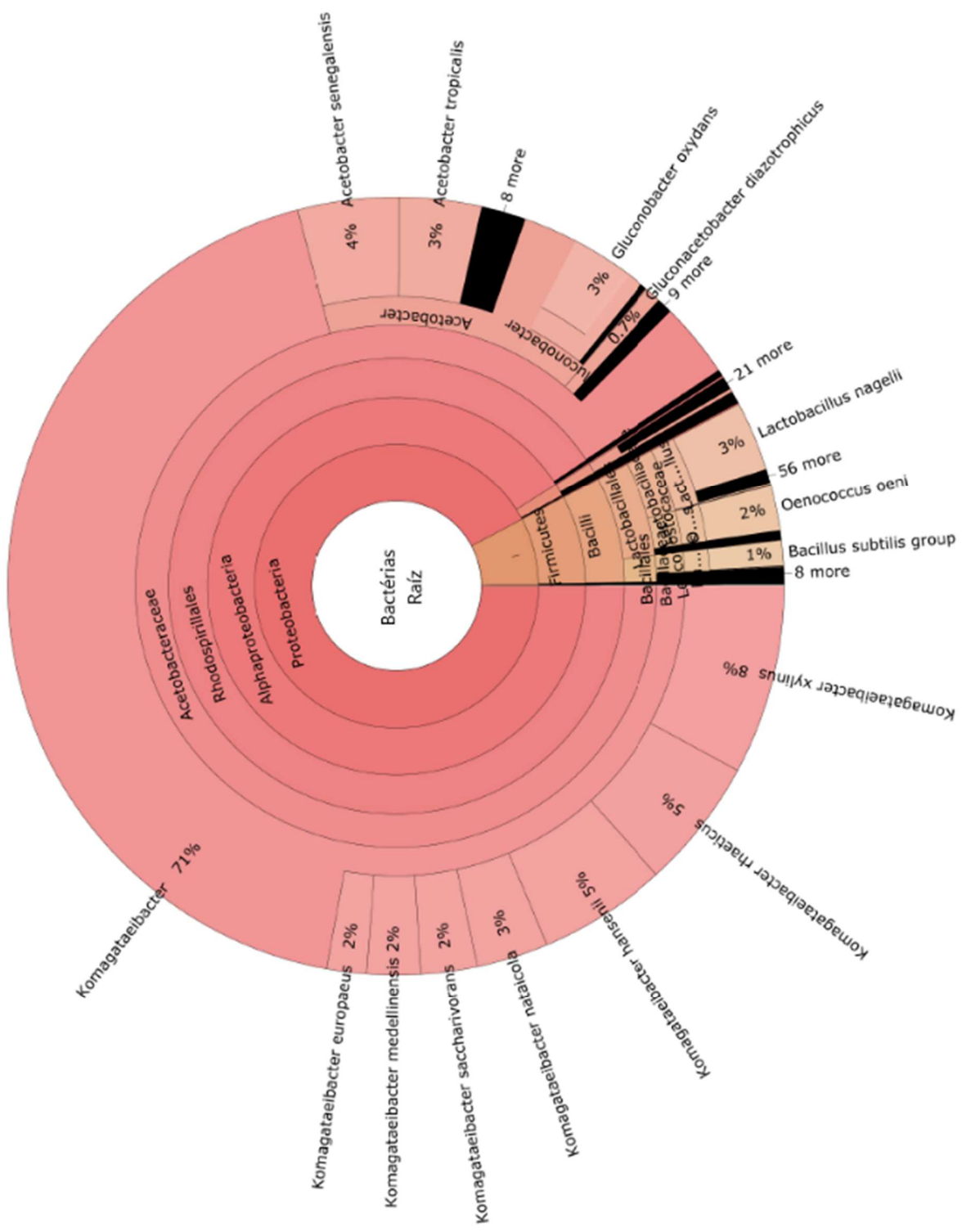


Figura 3 – Sequenciamento *Shotgun* de bactérias de um “meta”-SCOBY (adaptada de Harrison e Curtin (2021)).

Em termos de prevalência, leveduras *Brettanomyces* foram encontradas em 99% das amostras, enquanto *Zygosaccharomyces*, *Starmarella* e *Lachancea* foram

encontradas em 39-63% das amostras. Já bactérias do gênero *Komagataeibacter* foram detectadas em 97% das amostras e *Lactobacilliacae* e *Lactobacillales* foram detectadas em aproximadamente 33% das amostras. Esses resultados podem ser observados na figura 4.

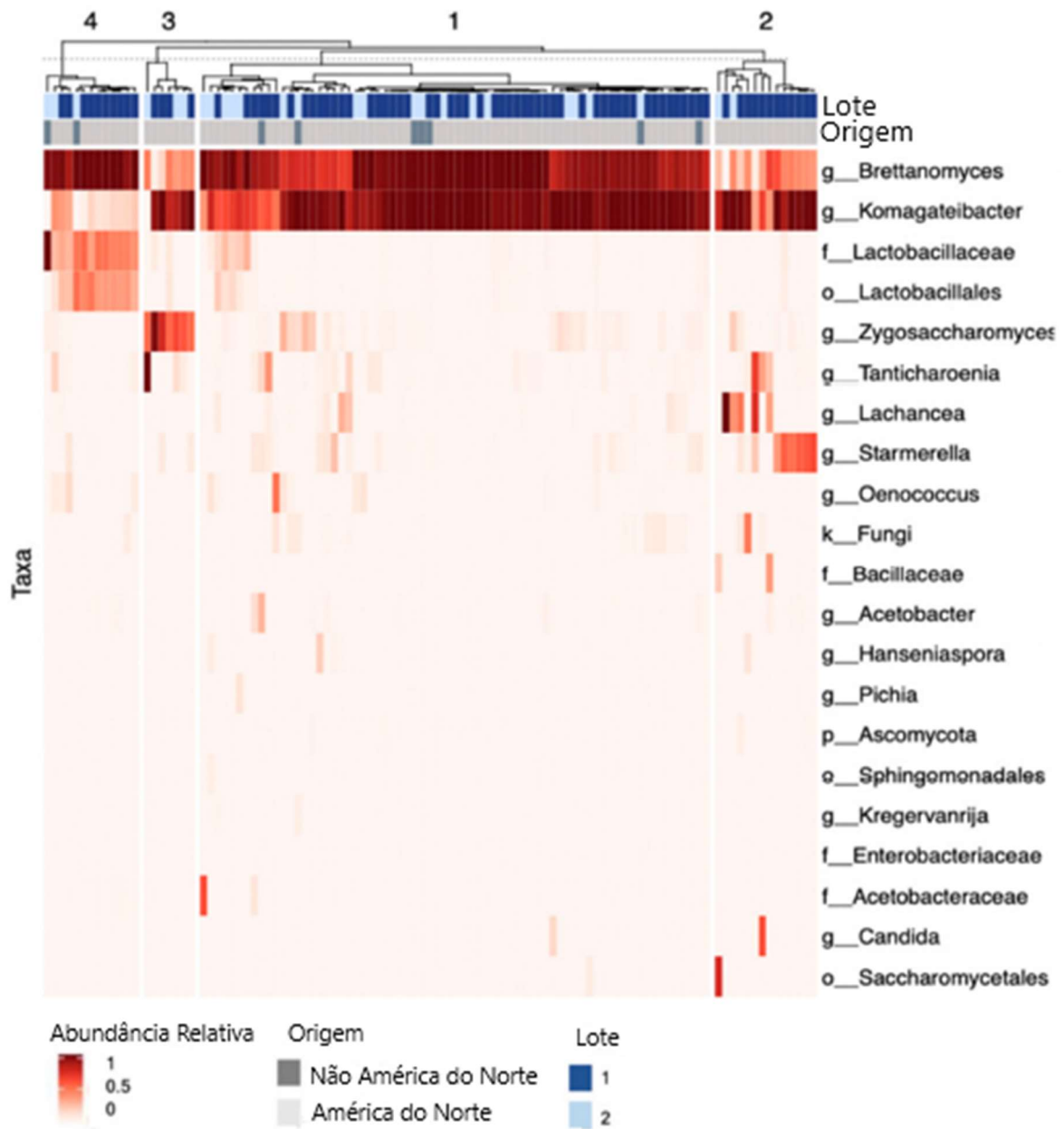


Figura 4 –Abundâncias relativas de gêneros para fungos e bactérias dentro de cada kombucha agrupados por similaridade e divididos em 4 k-clusters (adaptada de Harrison e Curtin (2021)).

É possível observar na figura 4 que a análise de similaridade entre os kombuchas analisados gerou quatro grupos diferentes. O cluster I é dominado por

*Brettanomyces* e *Komagataeibacter*. O cluster II quanto às bactérias também é dominado pelo gênero *Komagataeibacter*, no entanto apresenta moderada abundância de *Brettanomyces* e elevada abundância de *Starmerella* ou *Lachancea*. O cluster III também é dominado por bactérias do gênero *Komagataeibacter*, mas com baixa a média abundância de *Brettanomyces* e alta abundância de *Zygosaccharomyces*. Finalmente, o cluster IV apresenta leveduras do gênero *Brettanomyces* dominantes, mas com baixa abundância de *Komagataeibacter* e grande abundância de *Lactobacillales*.

### 1.3. Composição química

Estudos de cinética de fermentação das kombuchas tem apontado que a hidrólise da sacarose é acompanhada de uma diminuição do pH e aumento da acidez total (figura 5), bem como a produção de etanol, ácido acético, ácido glucônico e celulose como metabólitos majoritários do consumo da glicose e frutose (LONCAR et al., 2014; SIEVERS et al., 1995; SREERAMULU; ZHU; KNOL, 2000).

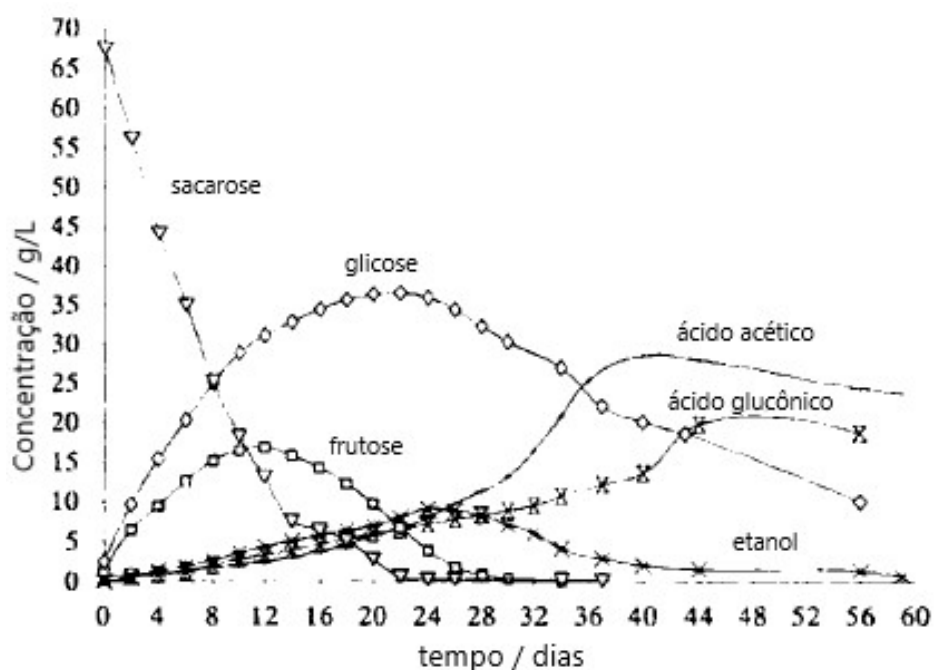


Figura 5 - Concentração dos substratos durante um período de 60 dias de fermentação de uma Kombucha obtida em uma farmácia local. As quantidades de sacarose, D-glicose, D-frutose, D-ácido glucônico, ácido acético e etanol foram determinadas enzimaticamente (adaptada de Sievers et al. (1995)).



Ao longo do processo fermentativo é estabelecida uma simbiose entre leveduras e bactérias onde a sacarose é hidrolisada pelas enzimas invertases das leveduras fornecendo glicose e frutose ao meio, que são consumidas produzindo ácidos orgânicos e etanol com conseqüente diminuição do pH (figura 6). A glicose é oxidada à ácido glucônico e glucurônico, mas também é utilizada por parte das bactérias, em especial *Komagataeibacter xylinum* na produção de celulose formando uma película sobre o líquido, que é capaz de abrigar tanto as próprias bactérias quanto as leveduras. É preciso evidenciar que parte do etanol formado pela fermentação anaeróbica das leveduras é consumido por bactérias na formação do ácido acético. (LAUREYS; BRITTON; CLIPPELEER, 2020; MAY et al., 2019; VILLARREAL-SOTO et al., 2018).

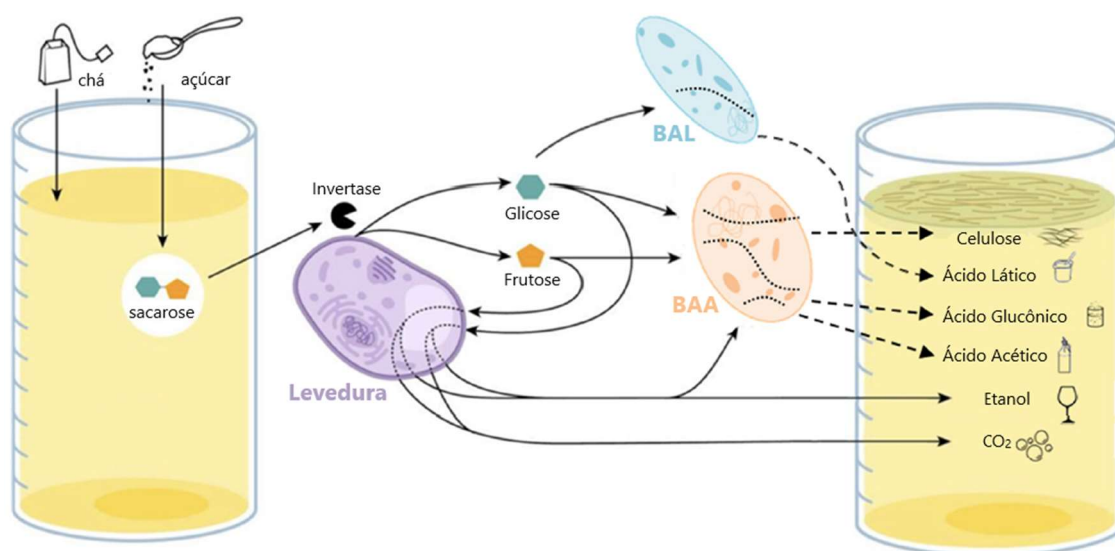


Figura 6 – Dinâmica química dos principais metabólitos formados na fermentação da kombucha, BAL são bactérias do ácido láctico e BAA são bactérias do ácido acético (adaptada de May et al. (2019)).

Além dos metabólitos principais mostrados na figura 6, de um modo geral, as kombuchas contém outros ácidos orgânicos, açúcares, vitaminas, amino ácidos, aminos biogênicos, purinas, pigmentos, lipídeos, proteínas, enzimas hidrolíticas, cafeína, dióxido de carbono, polifenóis, minerais e outros metabólitos da ação microbiana. (BISHOP et al., 2022; BAUER-PETROVSKA; TOZI, 2000; JAYABALAN et al., 2014)

Os compostos bioativos contidos na kombucha tem origem tanto no chá utilizado quanto na atividade metabólica dos micro-organismos presentes, a figura 7

apresenta a ação da microbiota da kombucha na produção de alguns desses compostos (ANTOLAK; PIECHOTA; KUCHARSKA, 2021)

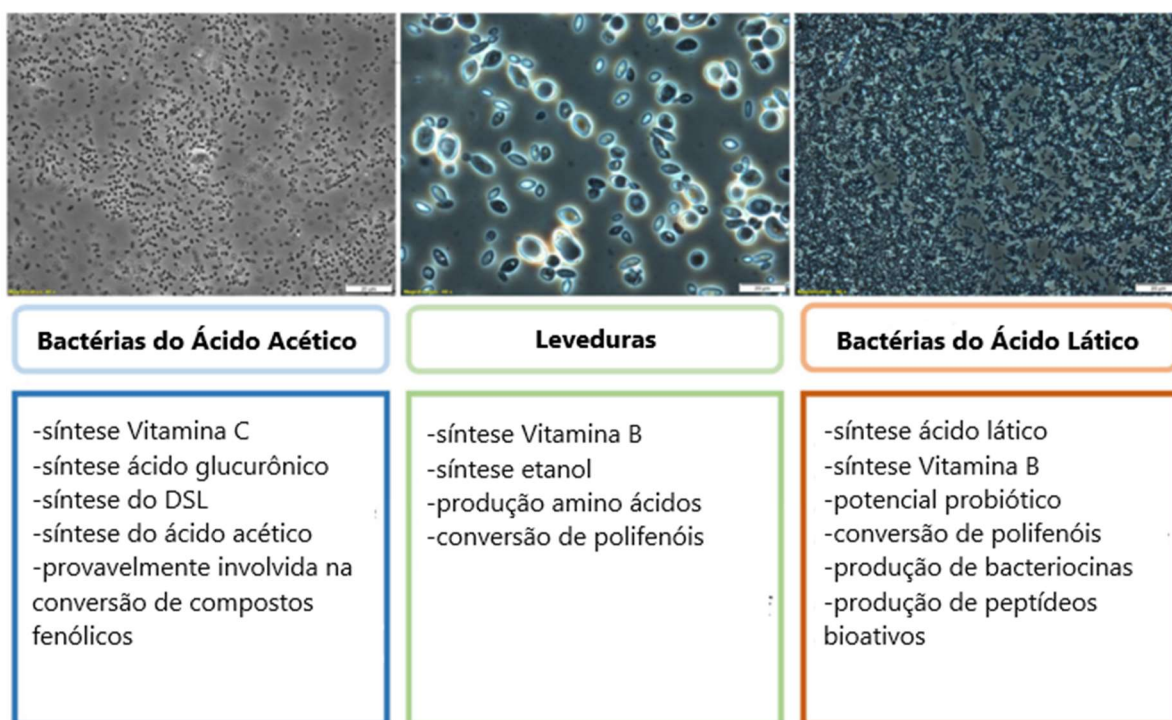


Figura 7 – Compostos bioativos resultantes da ação dos micro-organismos presentes na maioria das kombuchas (adaptada de Antolak, Piechota e Kucharska (2021)).

## 1.4. Polifenóis

Os polifenóis tem ação comprovada como antioxidantes e são a maior fração desses compostos na dieta humana (SCALBERT; JOHNSON; SALTMARSH, 2005), dito isso vale destacar sua presença e transformações na fermentação das kombuchas.

São substâncias presentes em tecidos vegetais que são extraídos durante a infusão do chá verde ou preto, formando uma fração de polifenóis solúveis em água. Os principais polifenóis encontrados nas folhas do chá são flavonoides, compostos bioativos produzidos pelo metabolismo das plantas (BISHOP et al., 2022).

Enquanto as catequinas são os polifenóis mais abundantes no chá verde, as teaflavinas e tearubiginas se encontram em maior quantidade no chá preto devido ao processo de oxidação pelo qual se submetem as folhas (BISHOP et al., 2022). Além

disso, já foi relatado que os polifenóis do chá preto são mais suscetíveis as biotransformações pelo metabolismo microbiano, produzindo uma bebida fermentada com maior diferença em composição química quando comparada ao chá não fermentado (CARDOSO et al., 2020).

## 1.5. Etanol

Diante dessa variabilidade na composição da kombucha vimos o surgimento de legislações locais que buscam garantir padrões de qualidade e identidade dessa categoria de bebida. No caso do Brasil, a resolução normativa do MAPA de setembro de 2019 que passou a vigorar em julho de 2021 e define normas de produção bem como padrões de composição química, tais como o pH (mínimo de 2,5 e máximo de 4,2), teor alcoólico (máximo de 0,5% v/v a 20°C) e a acidez volátil (mínimo de 30 mEq/L e máximo de 130 mEq/L expressos em ácido acético) (Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2019).

Apesar de muitos autores definirem a kombucha como uma bebida naturalmente fermentada com baixos níveis de etanol, uma revisão bibliográfica da literatura disponível indica ocorrência de quantidades de etanol superiores ao limite de 0,5% v/v a 20°C em kombuchas produzidas em experimentos controlados conforme é possível visualizar na tabela 2.

**Tabela 2 - Etanol na Kombucha encontrado na Literatura**

referência	starter	Brix inicial	chá	Temp	tempo	% ABV
Neffe-Skocinska 2017	50g	10	6g/L	20 °C	10 dias	1,36%
Coton 2017	NA	NA	NA	NA	8 dias	1,27%
Sievers 1995	10% v/v	7	1,5 g/L	20/22°C	24 dias	1,15%
Liu 1996	NA	10	3,3 g/L	25/30°C	6 dias	1,01%
Rezende Cardoso 2019	10%v/v	5	12g/L	25 °C	10 dias	0,92%
Reiss 1994	15% v/v	5	5 g/L	20/22°C	10 dias	0,80%
Chen 2000	20% v/v	10	4 g/l	24 °C	14 dias	0,70%
Greenwalt 1998	NA	10	4,4 g/L	25°C	9 dias	0,60%
Gaggia 2018	10%v/v	8	8g/L	27 °C	7 dias	0,59%
Loncar 2006	15% v/v	6,6	1,5 g/L	30°C	10 dias	0,51%
Kallel 2012	10% v/v	10	12 g/L	24°C	15 dias	0,38%
Ihsani 2021	NA	11	15g/L	NA	7 dias	0,32%
Loncar 2006	10% v/v	6,6	1,5 g/L	22°C	10 dias	0,25%
Barbosa 2020	10%v/v	8	15g/L	28 °C	15 dias	0,13%
Chakravorty 2016	10 a 15% v/v	10	NA	28 °C	7 dias	0,04%
Loncar 2014	15%v/v	7	1,5g/L	22 °C	5 dias	0,03%

Além disso, Talebi et al. (2017) realizaram um estudo com 18 amostras de kombuchas comerciais disponíveis no mercado norte-americano encontrando um cenário de desrespeito à legislação local com resultados acima dos limites permitidos para todas as amostras analisadas, trazendo a necessidade de readequação dos produtores locais. A figura 8 apresenta os resultados.

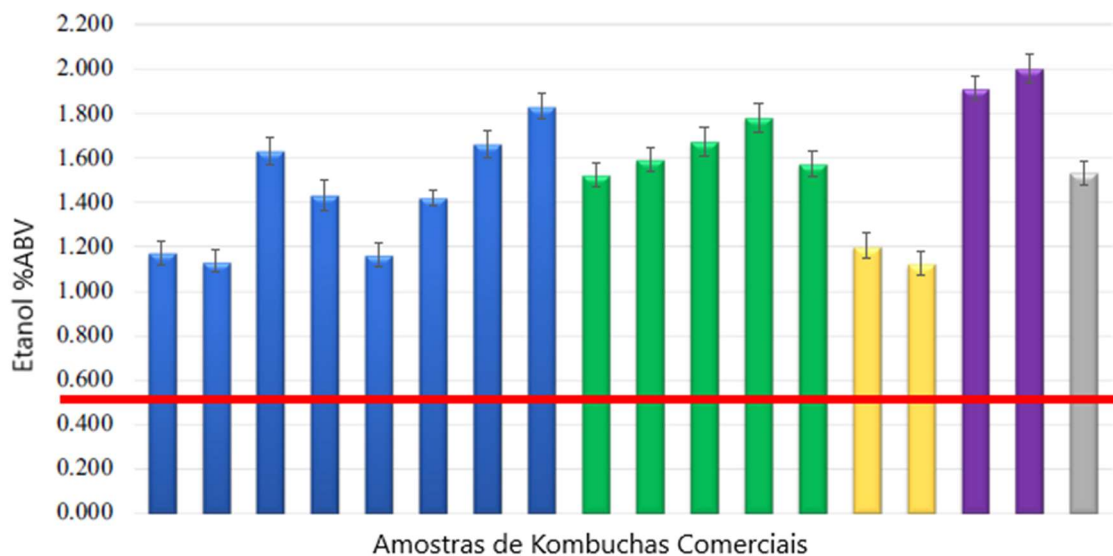


Figura 8 - Determinação de etanol em amostras de kombucha comerciais, as cores diferentes no gráfico representam produtos de empresas diferentes. A linha vermelha indica 0,5% ABV (unidade equivalente a utilizada pela legislação brasileira para o teor de etanol “% v/v a 20°C”) que é o limite de etanol para bebidas não alcoólicas pelo *US Alcohol and Tobacco Tax and Trade Bureau* (adaptada de Talebi et al., 2017).

Andreson et al. (2022) também analisaram kombuchas comerciais e encontraram 10 amostras com concentrações de etanol acima de 5 g/L (correspondente a mais que 0,5% v/v a 20°C) dentre 16 amostras investigadas, como pode ser visto na figura 9.

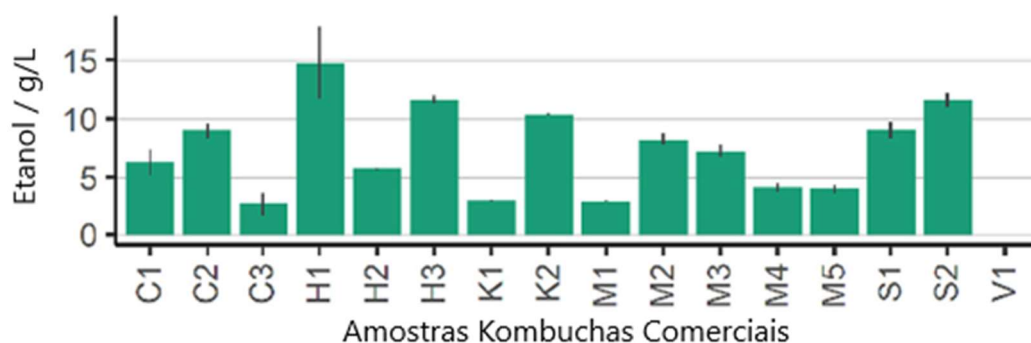


Figura 9 – Concentrações de etanol encontradas em 16 amostras de kombuchas comerciais (adaptado de Andreson et al. (2022))

Tais resultados indicam que não há uma homogeneidade quanto ao processo de produção das kombuchas tanto em nível de pesquisas acadêmicas quanto no âmbito da produção comercial em relação aos níveis obtidos de etanol.

### 1.5.1. Fatores que influenciam a fermentação e a formação de etanol

#### 1.5.1.1. Colônia fermentativa

A colônia da kombucha, também conhecida como SCOBY, abreviação do inglês, *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*, é compreendida como uma associação simbiótica entre leveduras e bactérias.

Um estudo comparativo entre nove kombuchas de diferentes origens apresentou as diferenças quantitativas de metabólitos em um período longo de fermentação (CHEN; LIU, 2000). Neste estudo observou-se que os resultados encontrados para metabólitos principais como o etanol ou ácido acético sofrem grande variação em função da colônia utilizada e indicam uma dificuldade na produção artesanal que atenda os padrões de legislação ou mesmo a obtenção de um perfil sensorial consistente para a bebida (figuras 10 e 11).

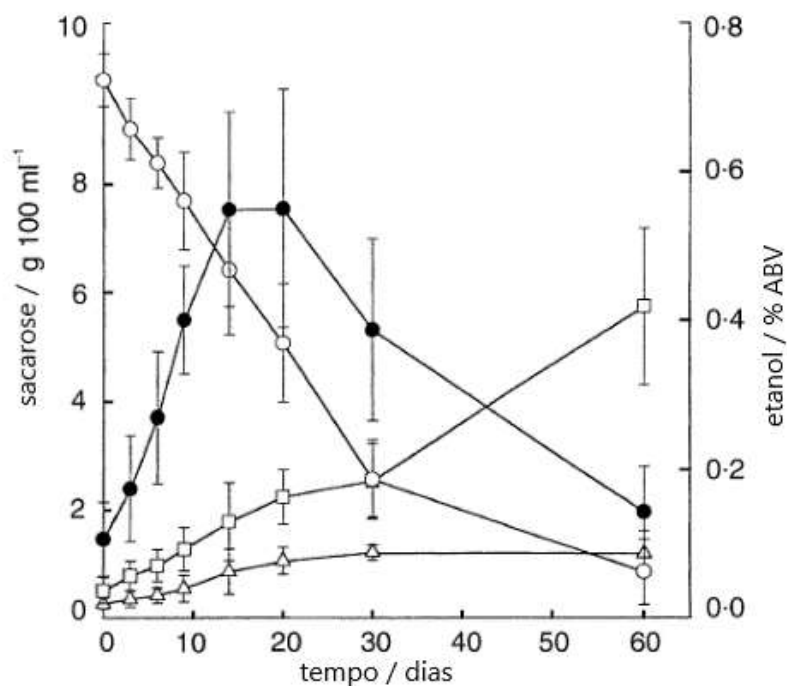


Figura 10 - Mudanças nas concentrações de sacarose residual, glicose, frutose e etanol nos metabólitos da kombucha durante fermentação prolongada de nove amostras de kombucha de fontes diferentes, as barras de erro representam o desvio padrão das nove amostras. (○), sacarose; (Δ), glicose; (□), frutose; (●) etanol (adaptada de Chen e Liu (2000)).

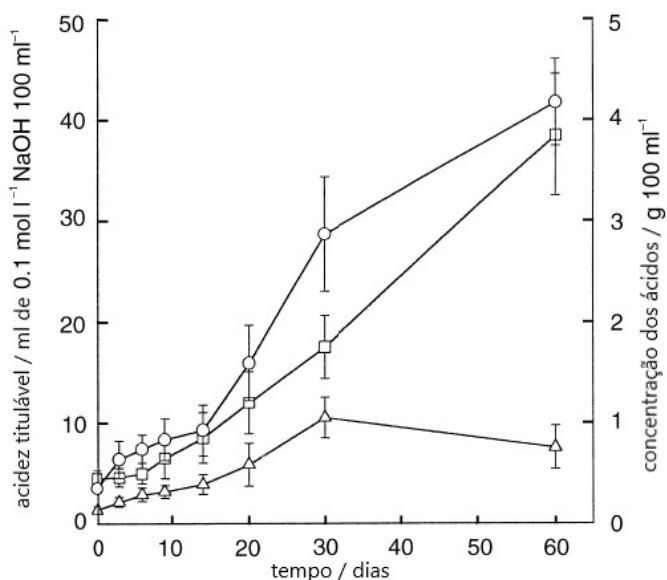


Figura 11 - Mudanças na acidez titulável, concentração de ácido acético e ácido glucônico nos metabólitos da Kombucha durante fermentação prolongada. (○), acidez titulável; (Δ), ácido acético; (□), ácido glucônico, as barras de erro representam o desvio padrão das nove amostras (adaptada de Chen e Liu (2000)).

É possível verificar que algumas kombuchas apresentaram etanol acima e outras abaixo do valor de 0,5% ABV entre 10 e 20 dias de fermentação. Além disso, os valores de acidez titulável também apresentaram grande diferença relativa.

Villarreal-Soto et al. (2020) realizaram um estudo com três kombuchas diferentes e apresentaram a composição microbiológica e a cinética química dos principais metabólitos evidenciando os impactos da microbiota na composição de cada kombucha com é possível verificar nas figuras 12 e 13.

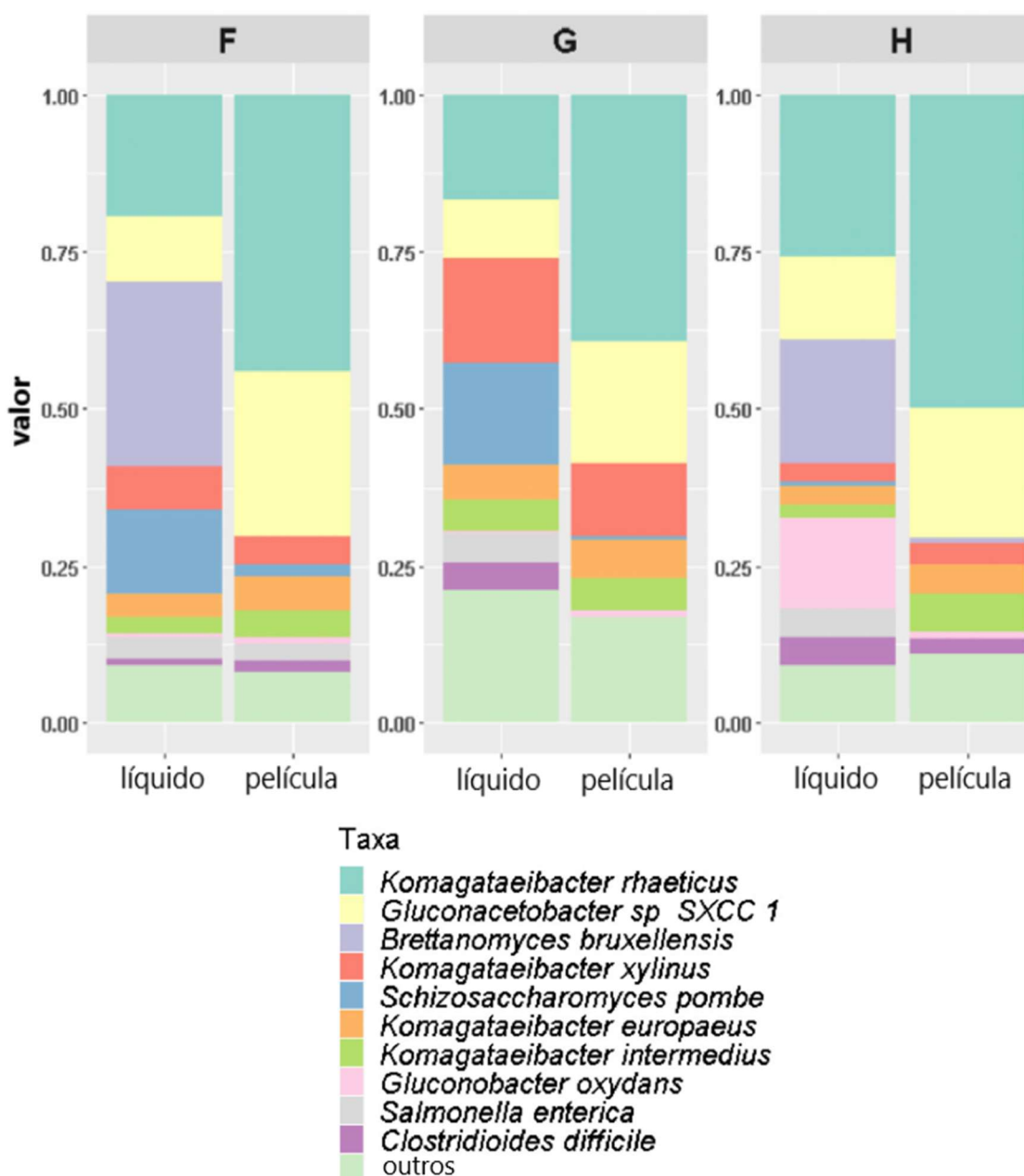


Figura 12 – Classificação taxonômica da população microbiana no líquido e na película celulósica em três diferentes kombuchas (F, G e H) com 15 dias de fermentação (adaptada de Villarreal-Soto (2020)).



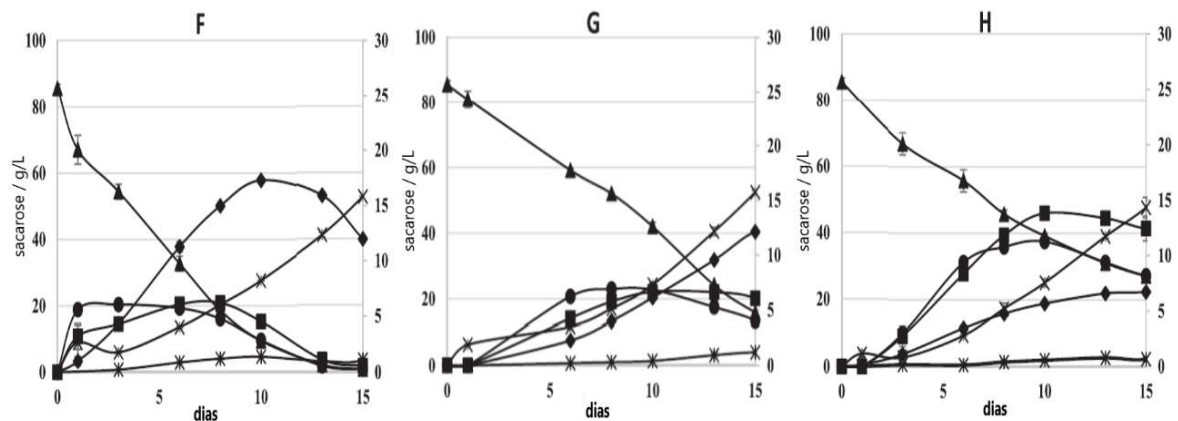


Figura 13 – Evolução dos principais metabólitos durante a fermentação de três kombuchas diferentes (F, G e H). (▲) sacarose, (●) glicose, (■) frutose, (\*) glicerol, (◆) etanol e (x) ácido acético (adaptada de Villarreal-Soto (2020)).

É possível verificar que cada kombucha apresentar perfis de cinética de fermentação muito particulares. Em relação ao etanol nota-se na kombucha H uma curva de formação que se estabiliza próximo do décimo dia em torno de 5 g/L (aproximadamente 0,5% v/v a 20°C), enquanto que na kombucha G tem-se uma curva permanentemente ascendente durante todo o período, atingindo o valor final de 12,5 g/L (aproximadamente 1,3% v/v) e finalmente para a kombucha F observa-se uma etapa de crescimento até o décimo dia até 17 g/L (aproximadamente 2,0% v/v) com posterior decréscimo até 12,5 g/L, possivelmente com maior ação das bactérias oxidando o etanol formado.

Os resultados reforçam a necessidade de conhecer a composição microbiológica da cultura fermentativa de trabalho para se controlar o perfil cinético de metabólitos formados, uma vez que leveduras de espécies ou cepas diferentes podem apresentar metabolismos distintos durante a fermentação da kombucha, assim como bactérias acéticas também poderão apresentar grande variabilidade na capacidade de oxidar o etanol formado pelas primeiras.

### 1.5.1.2. Inóculo líquido e película SCOBY

Alguns estudos mencionam o uso apenas da película SCOBY como fonte inicial de microrganismos, enquanto que outros autores realizaram estudos da fermentação sem a presença prévia da película contando com o aporte de microrganismos da kombucha já fermentada na forma de inóculo líquido (LONCAR et al., 2001, 2006, 2014; MALBASA; LONCAR; DJURIC, 2008). Enquanto que a forma mais usual comercialmente é o uso tanto do líquido quanto da película como *starters* (iniciadores) da fermentação.

O inóculo líquido nada mais é que a kombucha preparada anteriormente que além de servir como aporte de micro-organismos, é utilizado como forma de diminuir o pH abaixo de 4,2 evitando a proliferação de patógenos e iniciar um processo fermentativo seguro (CHEN; LIU, 2000). Esse objetivo é alcançado em geral com 5 a 15% v/v de concentração de inóculo líquido sobre o volume inicial da fermentação. Alguns estudos divergem ao comparar a contagem de células viáveis entre o inóculo líquido e a película SCOBY (CHEN; LIU, 2000; MARSH et al., 2014). No entanto, é clara a distinção entre as duas fases em relação à composição qualitativa dos microrganismos como já apresentado por Villarreal-Soto et al. (2020) e pode ser observado nas três culturas analisadas (figura 12).

A quantidade de líquido fermentado utilizado apresentou impacto moderado como variável fermentativa quando comparado com outros parâmetros. Aparentemente a escolha pela menor quantidade desse inóculo que garanta o pH abaixo de 4,2 sem carregar excesso de ácido seria uma otimização vantajosa para o produto final, uma vez que tanto a aceitação da acidez pelo público (LONCAR et al., 2006), como pela legislação, são fatores limitantes (Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2019). Além disso, o uso de menores quantidades de inóculo líquido significa um rendimento maior dos lotes da kombucha fermentados em sistema de *backslopping* (utilização de parte do lote já pronto como inóculo para o próximo lote).

### 1.5.1.3. Fonte de carbono

As quantidades utilizadas de sacarose variam entre 50 e 100g/L. A escolha da quantidade de sacarose pode se dar por uma questão sensorial ou mesmo na expectativa de produção de um determinado metabólito em maior quantidade (BLANC, 1996; MALBASA et al., 2008; REISS, 1994). De modo geral se observa uma relação diretamente proporcional entre a quantidade de sacarose e a formação de etanol. No entanto, como se trata de uma rede de reações concomitantes, é necessário otimizar a quantidade inicial de sacarose junto a outros parâmetros para se obter a bebida com perfil sensorial desejado e composição química em acordo com a legislação atual (Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2019; LONCAR et al., 2014).

Apesar da sacarose na forma de açúcar comum ser fonte de carbono mais usada para a produção da kombucha, alguns estudos avaliaram outras fontes de carbono, tais como o melaço, obtendo quantidades menores de ácido acético e maiores de ácido láctico quando comparado em quantidade equivalente de sacarose pura (LONCAR et al., 2001; MALBASA; DJURIC, 2008; MALBASA et al., 2008). Não foram realizadas análises para verificar se houve alguma modificação na microbiota das kombuchas fermentadas com melaço que poderiam implicar nesse perfil de ácidos modificado.

O uso de diversas outras fontes de carbono tem sido descrito na literatura e apresenta alternativas para a produção da bebida e formação de outros metabólitos de interesse durante a fermentação, porém não será aqui exposto uma vez que a legislação brasileira da kombucha obriga o uso de açúcares proveniente do caldo de cana, tais como, sacarose, melaço, melado e rapadura (Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2019).

### 1.5.3.4. Tipo de chá

O chá preto (*Camellia Sinensis* tostada) é o substrato mais utilizado nos estudos da Kombucha, porém o uso do chá verde (*Camellia Sinensis* verde e seca) tem ganhado cada vez mais espaço nas produções comerciais.

As quantidades utilizadas estão entre 5 a 10 g/L, sofrendo pequenas variações em função de receitas específicas para obtenção de maior ou menor propriedades intrínsecas do chá, tais como a quantidade de antioxidantes, não necessariamente influenciando na fermentação como fator de crescimento microbiano (DE FILIPPIS et al., 2018; HUR et al., 2014).

Gaggia et al. (2018) compararam o desenvolvimento da microbiota na fermentação de kombuchas feitos a partir de chá verde, preto e rooibos (*Aspalathus linearis*) e encontraram pouca diferença entre as populações que cresceram nos substratos de *Camellia Sinensis* porém foi possível observar alguma diferença na população bacteriana do kombucha de rooibos (figura 14), mostrando que existe uma sensibilidade da microbiota quanto a outros substratos e, portanto, tornando o kombucha final quimicamente diferente não apenas pelo próprio aporte de nutrientes e compostos da infusão mas também pela modificação dos metabólitos dado a mudança na microbiota.

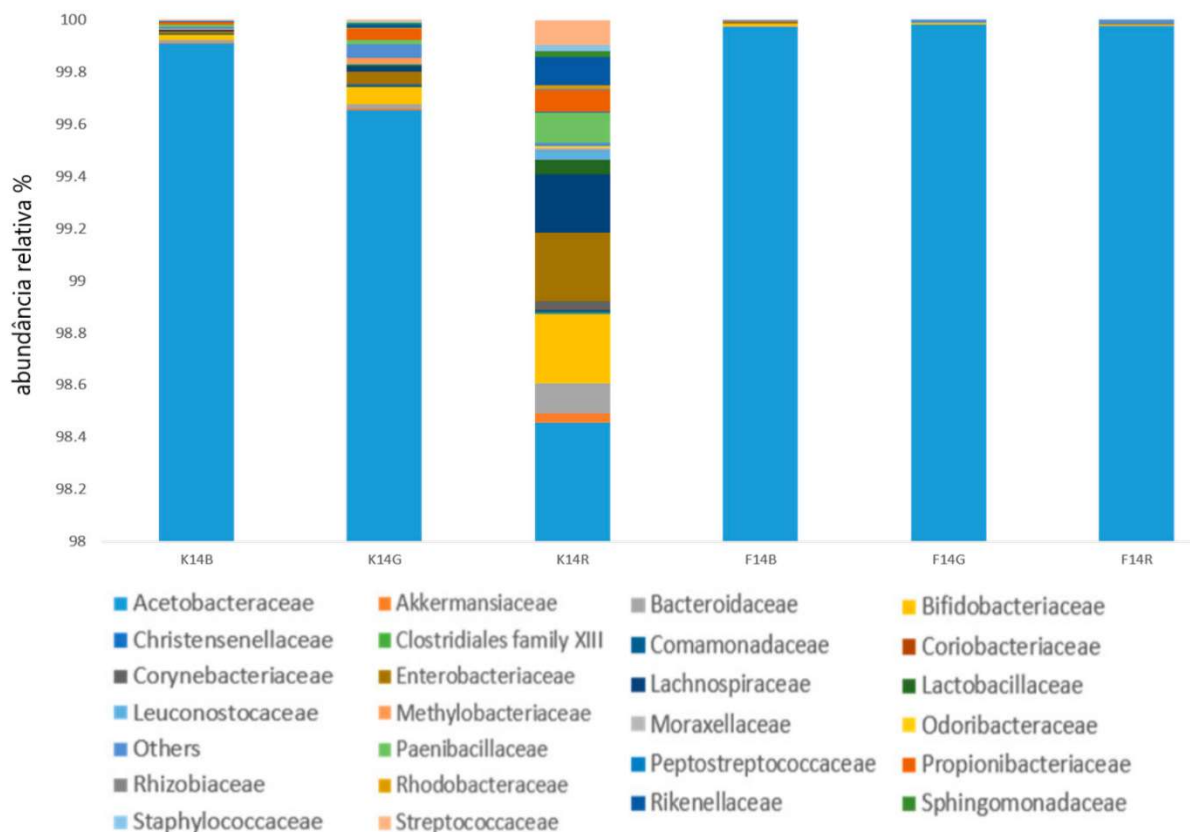


Figura 14 – Região apresentada compreende a faixa entre 98% e 100%. K14B refere-se a parte líquida da fermentação com chá preto, K14G e K14R referem-se a chá verde e rooibos. F14B refere-se a película formada na fermentação com chá preto, F14G e F14R referem-se a chá verde e rooibos. (adaptada de Gaggia et al. (2018))

Percebe-se que o maior impacto se deu na fração presente na fase líquida, enquanto que a população da película não sofreu alterações significativas de composição. De qualquer maneira, vale ressaltar que os autores encontraram diferenças em menos de 0,5% da população microbiana da fase líquida quando comparados os substratos mais comuns como o chá preto e verde.

### 1.5.3.5. Temperatura da fermentação

Considerando a composição microbiológica variada entre leveduras e bactérias, cada qual apresentando uma resposta metabólica particular à variação de temperatura, verifica-se um alto impacto na composição da kombucha quando o processo fermentativo é conduzido em diferentes temperaturas (DE FILIPPIS et al., 2018; HUR et al., 2014; LONCAR et al., 2006; NEFFE-SKOCINSKA et al., 2017).

Vitas et al. (2019) conduziram a fermentação da kombucha em três temperaturas distintas e obtiveram um perfil cinético da formação de etanol diferente para cada condição (figura 15).

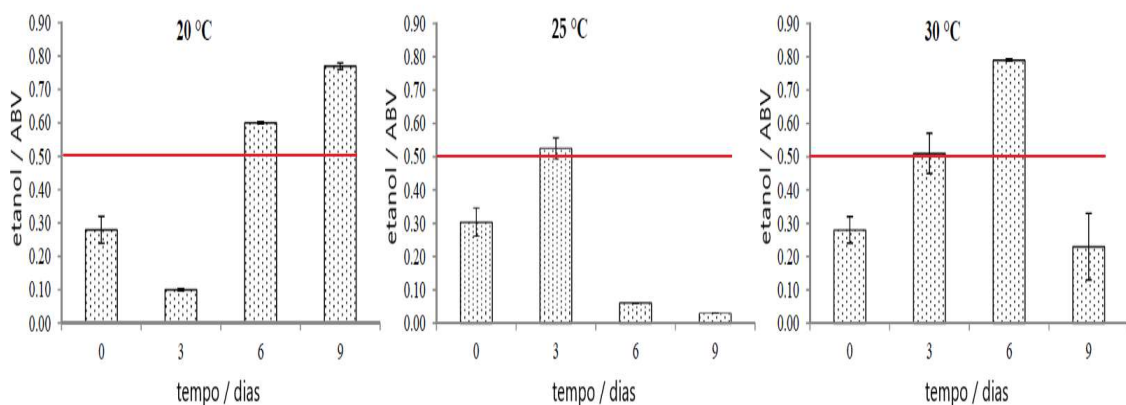


Figura 15 – Porcentagem de etanol em ABV para kombuchas fermentadas a 20°C, 25°C e 30°C durante nove dias. Linha horizontal vermelha indica 0,5% ABV (adaptada de Vitas et al. (2019)).

Uma das etapas iniciais do processo fermentativo da kombucha é a hidrólise da sacarose em glicose e frutose que serão metabolizadas pelos microrganismos. Essa reação é catalisada principalmente por enzimas presentes nas leveduras e

sensível a temperatura do meio, no entanto não se encontra uma relação simples entre o consumo de sacarose e aumento de temperatura, embora essa relação indique uma relação diretamente proporcional (LONCAR et al., 2014).

Aung, Lee e Eun (2022) conduziram uma análise metabolômica ao longo da fermentação de kombuchas sob diferentes temperaturas e puderam verificar o impacto da temperatura sobre algumas rotas metabólicas possivelmente presentes no metabolismo microbiano das kombuchas. A figura 16 apresenta o impacto do tempo e da temperatura em cada rota metabólica.

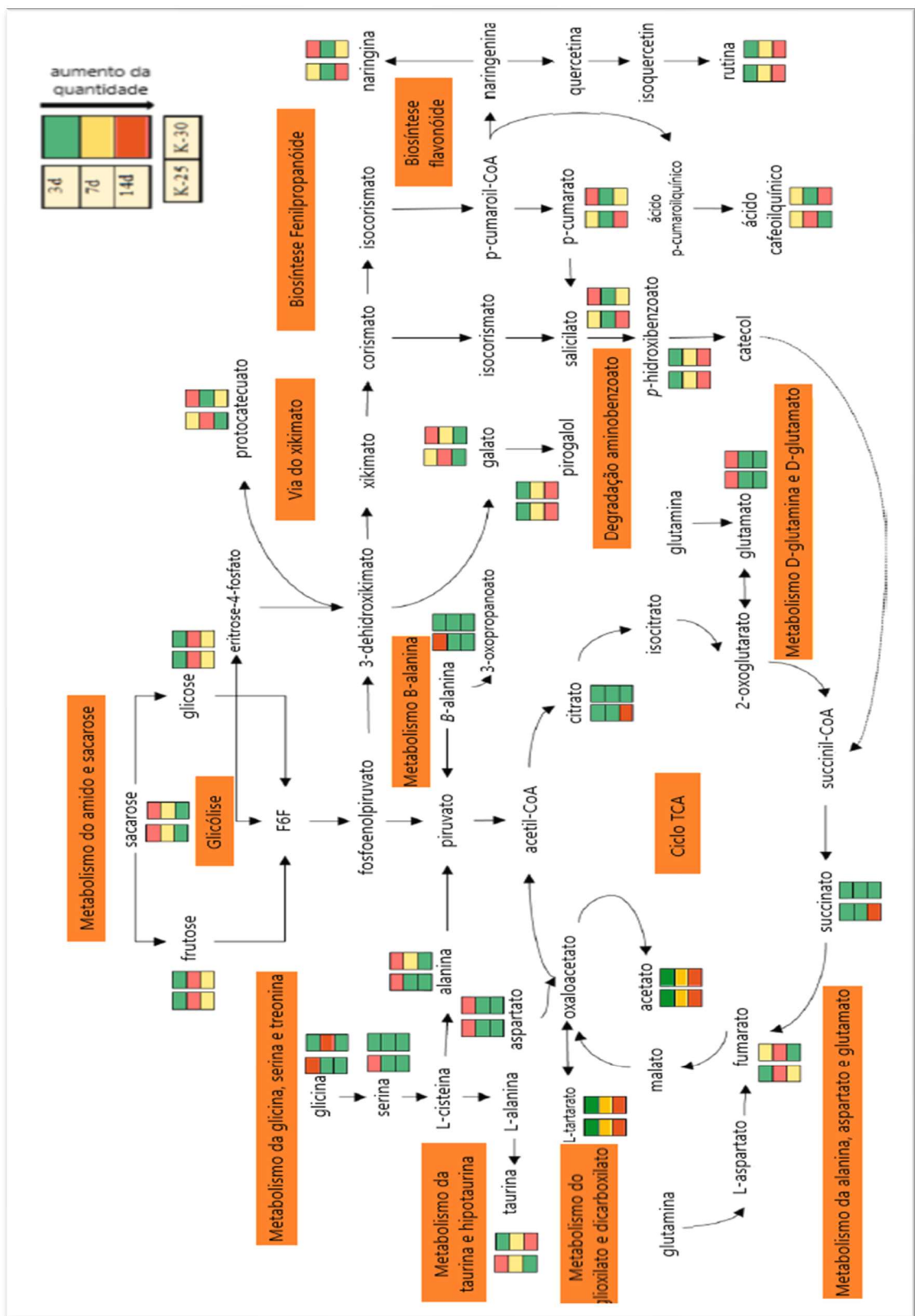


Figura 16 – Rotas metabólicas previstas em kombuchas a partir da formação e degradação de metabólitos analisados. As cores verde, amarelo e vermelho representam níveis crescente dos compostos. K-25 e K-30 indicam a fermentação a 25°C e 30°C respectivamente (adaptada de Aung, Lee e Eun (2022)).

É possível verificar na figura 16 que algumas rotas sofreram impacto com a variação da temperatura enquanto outras parecem não ser tão sensíveis a esse fator, muito embora deve-se notar que a faixa de variação proposta no experimento conduzido pode não ter sido grande o suficiente para gerar diferenças estatisticamente observáveis na concentração de alguns metabólitos.

A variação da temperatura na fermentação pode impactar benéficamente a produção de metabólitos de interesse, como exemplo o ácido glucurônico, pela variação de espécies do gênero *Gluconacetobacter* como demonstrado por De Filippis et al. (2018), nesse estudo os autores avaliaram o impacto da temperatura na abundância relativa entre *Gluconacetobacter saccharivorans* e *Gluconacetobacter xylinus* e a produção de ácidos glucônico e glucurônico. Foi obtido um aumento de 27 vezes na concentração de ácido glucurônico quando se aumentou a temperatura seguido de um domínio quase que total da espécie *Gluconacetobacter saccharivorans* diante da *Gluconacetobacter xylinus*. A figura 17 apresenta as variações relativas entre as populações e a formação dos dois ácidos quando as kombuchas foram fermentadas a 20°C e a 30°C.



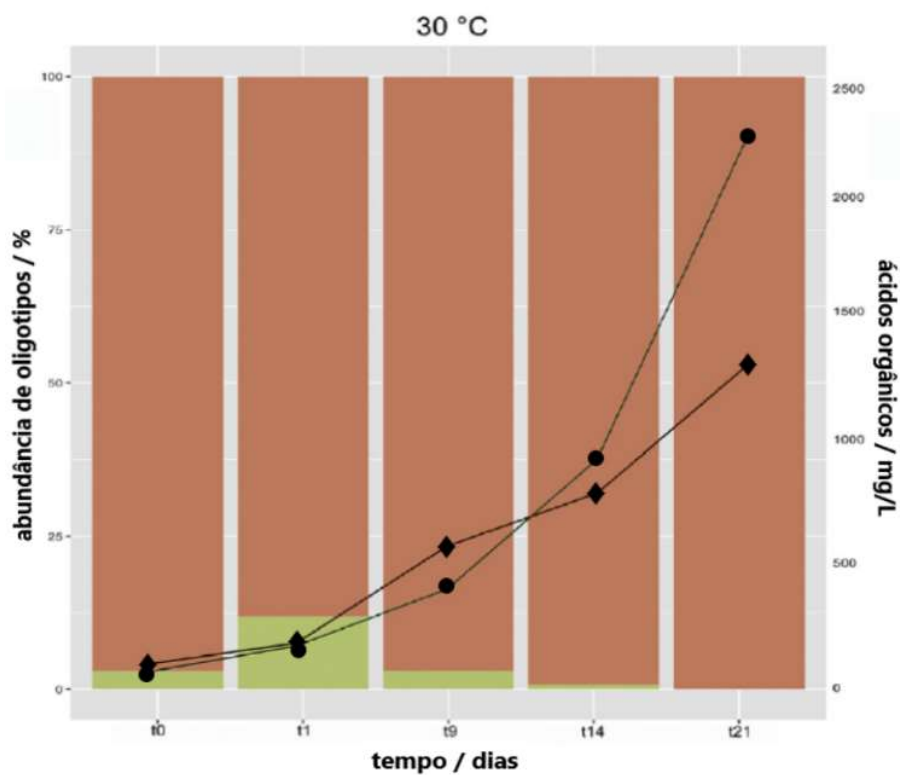
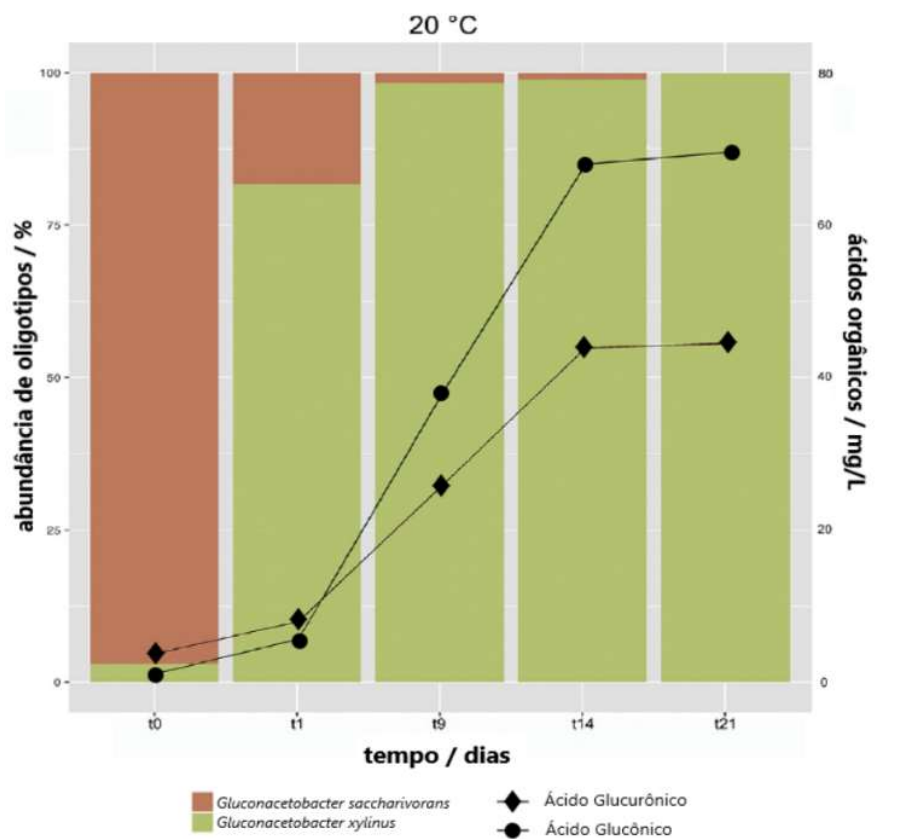


Figura 17 – Impacto da temperatura na abundância relativa entre *Gluconacetobacter saccharivorans* e *Gluconacetobacter xylinus* ao longo de 21 dias de fermentação e impacto na produção de ácido glucônico e glucurônico (adaptada de De Filippis et al. (2018)).

### 1.5.3.6. Geometria do fermentador

A geometria do fermentador pode afetar a fermentação através da variação da área específica interfacial, um parâmetro estudado por Cvetkovic et al. (2008) na investigação para escalonamento da produção de Kombucha comercial. Os autores encontraram uma relação de aumento da acidez titulável produzida durante a fermentação com o aumento da área específica interfacial, concluindo ser um parâmetro relevante na cinética de acidificação (figura 18).

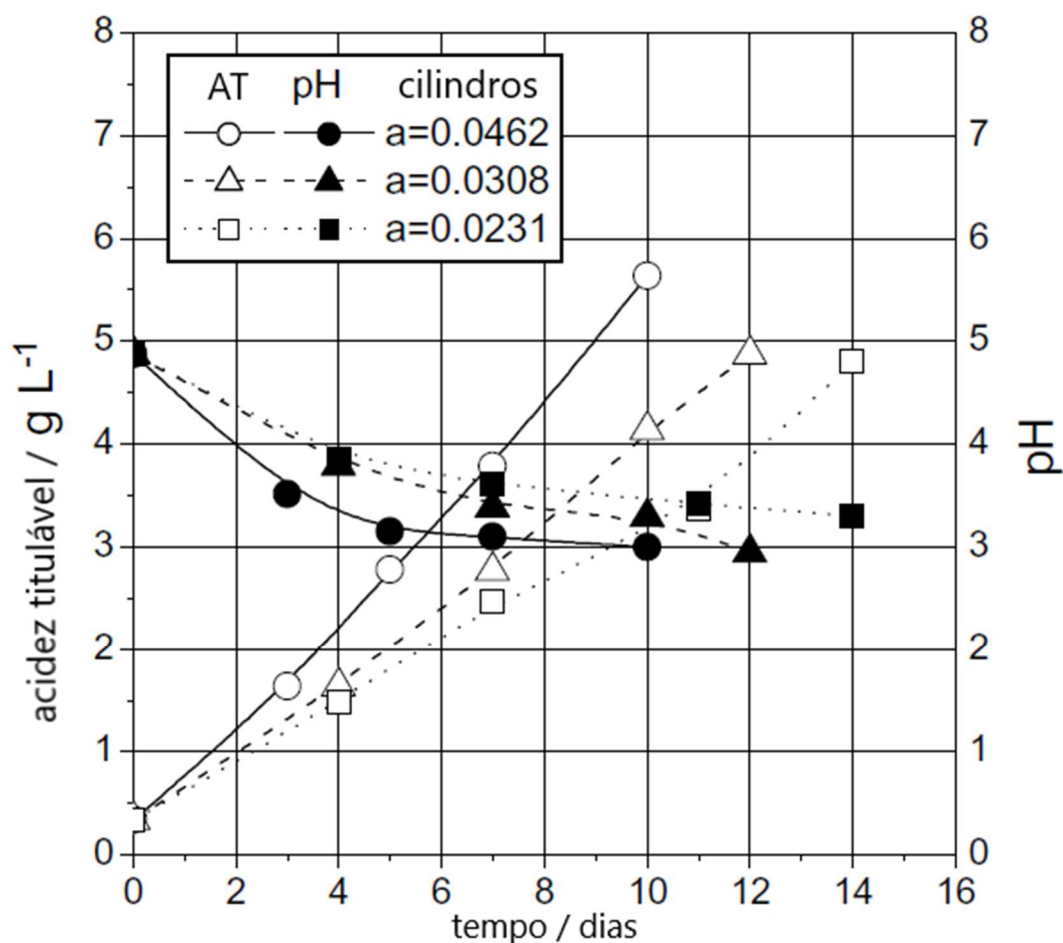


Figura 18 – Mudanças no pH e acidez titulável em cilindros com áreas interfaciais específicas diferentes (adaptada de Cvetkovic et al (2008)).

A definição de área interfacial específica é dada pela equação 1:

$$a = \frac{\text{área superficial exposta ao ar}}{\text{volume de líquido}} \quad (1)$$

Uma segunda possível consequência seria o aumento da disponibilidade de oxigênio com o aumento da área exposta ao ar e um potencial aumento da oxidação do etanol formado, reduzindo sua quantidade residual na kombucha.

Villarreal-Soto et al. (2019) avaliaram a produção de metabólitos e a atividade anti-inflamatória em fermentadores com a mesma área interfacial específica, mas com relação área por altura diferentes e encontraram resultados distintos para cada geometria como pode ser observado na figura 19 para o etanol e ácido acético.

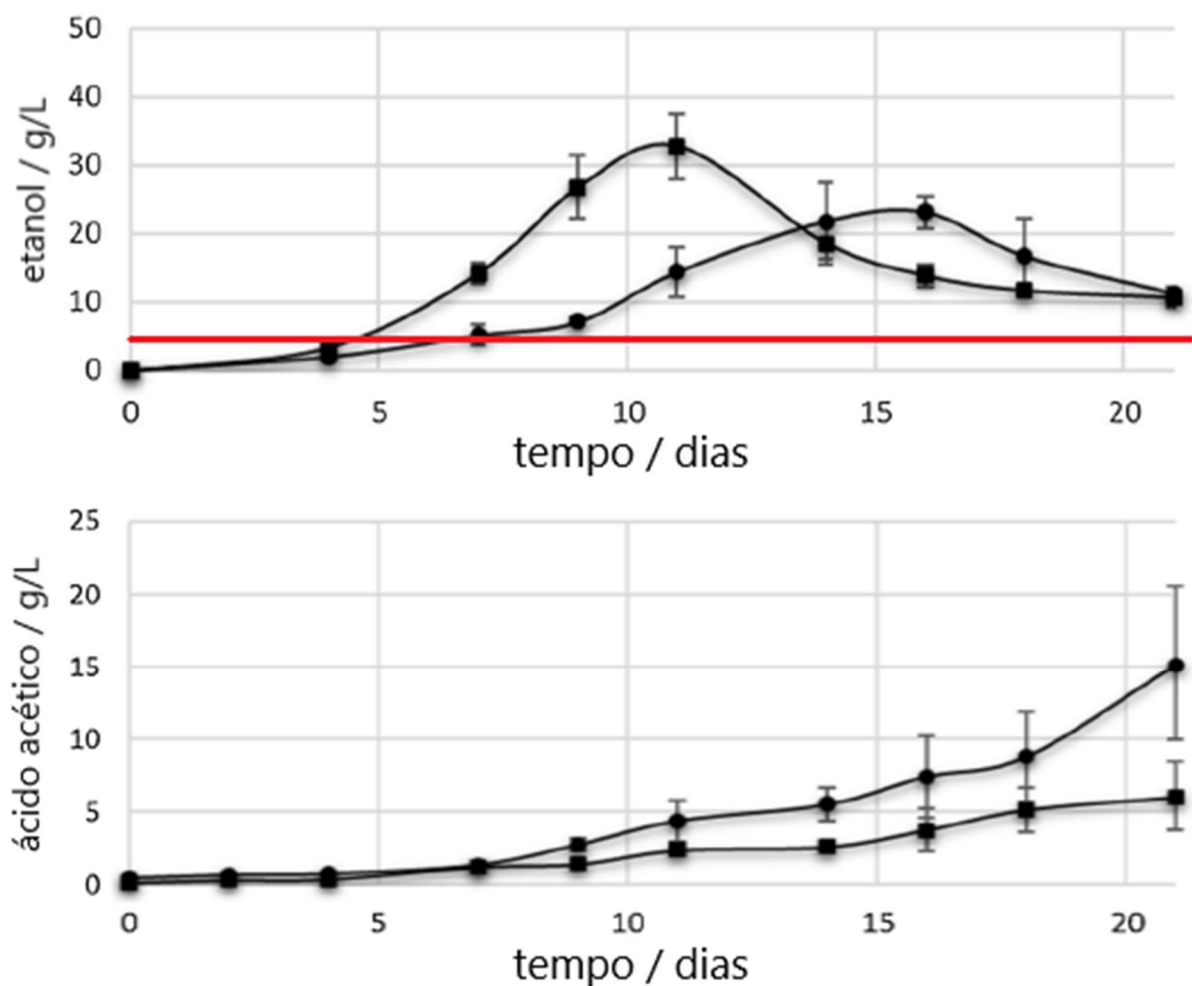


Figura 19 – Cinética de formação de etanol e ácido acético para diferentes relações superfície por altura (s/h): (●) s/h = 4,19 cm e (■) s/h = 27,41 cm. Linha horizontal vermelha indica 0,5% ABV (adaptada de Villarreal-Soto et al. (2019)).

Esses resultados demonstram um grande impacto da geometria do fermentador sobre as concentrações de etanol e ácido acético, porém não indicaram a mesma tendência observada por Cvetkovic *et al.* (2008) o que pode ser explicado pelas

diferenças na composição microbiológica de cada kombucha utilizada, uma vez que as concentrações de etanol obtidas por Villarreal-Soto et al. (2019) foram bem maiores que a maioria dos estudos publicados.

#### 1.5.3.7. Tempo de Fermentação

O tempo de fermentação nas investigações sobre a fermentação da kombucha em geral varia de 10 a 14 dias conforme apresentado na tabela 2, no entanto existem estudos com tempo maiores como 60 dias (CHEN; LIU, 2000).

De um modo geral, pelo já apresentado acima no texto, ao longo do processo observa-se um decréscimo do pH e um aumento da acidez titulável resultante dos ácidos orgânicos produzidos pelo metabolismo microbiano. O perfil cinético do etanol pode ser visto tendo dois momentos, inicialmente com crescimento e posterior decréscimo, possivelmente pelo seu consumo pelas bactérias acéticas numa taxa maior que sua formação pelas leveduras. Alguns estudos apresentam perfis de formação de etanol sem essa posterior diminuição, isso provavelmente se deve ao tempo final em que se monitorou a fermentação, não tendo atingido o momento do decréscimo do etanol.

Fermentações com tempos elevados podem ser vantajosas para a produção de metabólitos de interesse, mas tem seu alcance limitado quando se busca a produção de uma bebida palatável e segura ao consumo. Tanto o MAPA no Brasil (Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2019) quanto o FDA nos EUA (NUMMER, 2013) também regulam sobre os limites de acidez volátil e pH adequados, sendo pH mínimo de 2,5 para evitar potenciais riscos à saúde no consumo da Kombucha. O FDA recomenda tempo máximo de fermentação de 10 dias para evitar a formação excessiva de ácidos orgânicos provenientes da fermentação. No entanto, o tempo de fermentação fica submetido às escolhas dos parâmetros anteriores, ou seja, é passível de se otimizar o tempo de fermentação junto dos outros parâmetros fermentativos para se obter uma kombucha com composição química desejada e em acordo com a legislação.

Dessa forma o trabalho realizado avaliou a possibilidade de variáveis de fermentação comuns aos processos produtivos da kombucha poderem impactar de maneira significativa a concentração de etanol.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar o impacto das variáveis da fermentação da kombucha na produção de etanol.

### 2.2. Objetivos Específicos

- i. Verificar a quantidade de etanol em kombuchas comerciais disponíveis à venda na cidade de São Paulo antes e após a legislação entrar em vigor;
- ii. Avaliar o impacto da legislação sobre as kombuchas comercialmente disponíveis;
- iii. Verificar quais variáveis de fermentação causam maior impacto na produção de etanol, acidez fixa, acidez volátil e pH da kombucha utilizando duas culturas diferentes;

## 3. Materiais e Métodos

### 3.1. Análise de Etanol em Kombuchas Comerciais

#### 3.1.1. Kombuchas comerciais

Foram adquiridas 12 garrafas de kombuchas de marcas distintas conforme disponibilidade em 4 diferentes supermercados da cidade de São Paulo e transportadas em caixas térmicas com gelo até o laboratório e mantida sob refrigeração a 4 °C até o processo de preparo das amostras. Esse procedimento foi realizado primeiramente em março de 2021, quando a legislação brasileira de

kombucha ainda não estava em vigor, e depois repetido com as mesmas 12 marcas de kombucha em abril de 2022 já com a legislação em vigor.

### 3.1.2. Preparo das Amostras

Após uma cuidadosa homogeneização do líquido de cada garrafa, amostras de 10 ml foram centrifugadas a 2.790 g por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi recolhido e mantido congelado a -15 °C até o momento da análise.

### 3.1.3. Determinação de Etanol por GC-FID-Headspace

Uma amostra de 200 µl de kombucha foi colocada em vials de headspace de 10 ml contendo 1,8 ml de uma solução de 0,6 g/L de 2-propanol utilizado como padrão interno. Os vials foram selados e submetidos a 70 °C por 30 minutos sem agitação. Com o auxílio de uma seringa, injetou-se 500 µl da fração volátil no sistema CG (modelo 6890, Hewlett-Packard, Little Falls, DE, USA) com detector de Ionização por Chama (FID) equipado com coluna de inox (Poraplot-Q coluna capilar com sílica fundida, 10 m x 0.32 mm i.d. x 0.5 µm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). As temperaturas do injetor, coluna, e detector foram 220 °C, 150 °C e 280 °C respectivamente para uma corrida isotérmica de cinco minutos. O modo de injeção foi split, com uma razão de split de 50:1 e o fluxo do gás carregador (hidrogênio) foi mantido a 1,8 ml/min. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. As concentrações de etanol nas amostras foram calculadas através de uma curva de calibração com quatro padrões preparados da mesma maneira que as amostras e em triplicata. Padrões de controle de qualidade de 5 e 10 g/L foram utilizados para determinar precisão e erro do método.

### 3.1.4. Análise Estatística

Através da distribuição *t-Student* com  $N = 3$ , calculou-se o intervalo de confiança de 95 % da concentração de etanol ao redor da média obtida para cada amostra de kombucha.

## 3.2. Composição microbiológica dos SCOBY de trabalho

Para os experimentos laboratoriais de fermentação utilizamos dois SCOBY diferentes, SC1 e SC2 que foram obtidos de dois diferentes fabricantes de kombucha da cidade de São Paulo.

Ambos foram submetidos a ciclos semanais de fermentação com sacarose na forma de açúcar cristal orgânico e chá verde orgânico por cerca de seis meses antes das análises para atingir um equilíbrio nas condições laboratoriais. As condições utilizadas foram: tempo de fermentação de sete dias, concentração inicial de sacarose de 50 g/L, concentração de chá verde de 5 g/L e temperatura de 25 °C.

A composição microbiológica foi avaliada pela quantidade de leveduras e bactérias acéticas, assumindo que as leveduras são responsáveis pela maior parte do etanol gerado na Kombucha e que as bactérias acéticas convertem parte desse etanol em ácido acético. Dessa maneira, essas duas populações se relacionam com a quantidade final de etanol contido na Kombucha.

### 3.2.1. Plaqueamento e Contagem de Unidades Formadoras de Colônia

Utilizou-se a técnica de diluição seriada e *spread plate* no preparo das placas em quadruplicata que foram incubadas a 25°C por até 5 dias conforme Ceccato-

Antonini (2010). Foram escolhidos quatro meios de cultivo para auxiliar na caracterização qualitativa e quantitativa de cada SCOBY:

- DRBC + Cloranfenicol sob Aerobiose para cultivo de fungos e leveduras.
- RCA + Cicloheximida sob Anaerobiose para cultivo de bactérias anaeróbicas.
- MRS + Cicloheximida + CaCO<sub>3</sub> sob Anaerobiose para cultivo de bactérias lácticas.
- MRS + Cicloheximida + Vancomicina + Etanol + Ácido Acético sob Aerobiose para cultivo de bactérias acéticas, adaptado de Kim et al. (2019).

### 3.2.2. Análise Estatística

Foram realizados testes T (N = 6) entre as médias de unidades formadoras de colônia (UFC) obtidas para cada SCOBY em cada meio e comparadas para avaliar se houve diferença estatisticamente significativa entre elas. Valores serão considerados significativos quando  $p < 0.05$ .

## 3.3. Triagem das variáveis da fermentação de maior impacto na produção de etanol, acidez fixa, acidez volátil e pH da kombucha

### 3.3.1. Método de triagem de variáveis

Diante de um sistema multivariado como a fermentação da kombucha é conveniente avaliar quais variáveis causam maior impacto nas respostas de interesse para que em um segundo momento possa ser realizada uma investigação mais aprofundada em cada uma delas na tentativa de obter condições experimentais mais precisas que satisfaçam as necessidades do produto final.



No caso da kombucha, além do etanol, a acidez volátil e o pH também serão escolhidos como resposta uma vez que são parâmetros legislados pela instrução normativa do MAPA e assim devem respeitar certos limites para permitir a comercialização da kombucha. A resposta acidez fixa também será avaliada uma vez que se relaciona diretamente com o desenvolvimento do processo fermentativo.

O experimento de triagem de variáveis consiste em testar quais variáveis independentes causam o maior impacto nas variáveis dependentes, que são as respostas do sistema.

Dentro dos fatores apresentados como possivelmente impactantes na produção de etanol, testou-se a concentração inicial de sacarose, a porcentagem de inóculo utilizado como starter, o tempo de fermentação e a área interfacial específica.

As outras variáveis foram então fixadas:

Tipo de chá: verde

Temperatura de fermentação: 25°C

Uso apenas do inóculo líquido como *starter* (descarte da película após cada ciclo para obter maior homogeneidade do inóculo *starter*).

A triagem de variáveis é comumente realizada em apenas dois níveis, ou seja, com cada variável assumindo apenas dois valores. Dessa maneira testa-se o impacto nas respostas dentro de uma faixa específica das variáveis. No caso da kombucha foram escolhidos valores que guardam alguma correspondência com aqueles utilizados nas produções comerciais:

Concentração de sacarose: 40 e 60 g/L

Porcentagem de inóculo: 5 e 10 %(m/m)

Tempo de fermentação: 6 e 8 dias

Área interfacial específica: 0,09 a 0,28 cm<sup>-1</sup>

Além dos dois níveis, utilizou-se um ponto central, que além de fornecer informações acerca de possível curvatura no modelo de regressão linear também permite a estimação do erro do modelo ao ser realizadas repetições. Foram realizados experimentos em quadruplicata no ponto central, onde as variáveis assumem valores exatamente equidistantes do nível mais alto e mais baixo.

Em resumo, pode-se verificar na tabela 3, os valores assumidos pelas variáveis em cada nível e a codificação utilizada no cálculo matricial dos efeitos (-1, 0 e +1).

Tabela 3 - Correspondência entre níveis codificados e variáveis de estudo.

nível	sacarose (g/L)	% inóculo (m/m)	tempo (dias)	área esp. Interf. (cm-1)
-1	40	5	4	0,09
0	50	7,5	6	0,18
1	60	10	8	0,28

Uma investigação de quatro variáveis em dois níveis pode ser feita com um desenho fatorial completo de 2<sup>4</sup> experimentos, ou seja, um total de 16 ensaios, no entanto, é possível obter informações suficientes com um desenho reduzido chamado de fatorial fracionário onde 2<sup>(4-1)</sup> experimentos são capazes de fornecer os dados para avaliar os impactos das variáveis nas respostas de interesse. Esse desenho experimental implica em menores custos e tempo de realização, uma vez que reduz o número total de experimentos de 16 para oito.

A tabela 4 abaixo mostra o planejamento fatorial fracionário e os ensaios do ponto central com os níveis assumidos por cada variável em cada experimento:

Tabela 4 - Matriz de planejamento fatorial fracionado  $2^{4-1}$  com ponto central

experimento	fator X1 sacarose	fator X2 %inóculo	fator X3 tempo	fator X4 área esp. interf.
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	1
3	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0

Um modelo poderá ser ajustado através de uma função com termos lineares, e de interação a resposta obtida nos experimentos se ajustar satisfatoriamente a equação 2 (BEZERRA et al., 2008; FUKUDA et al., 2018):

$$y = \beta_0 + \sum_i^k \beta_i x_i + \sum_{ij}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2)$$

Onde o primeiro termo se refere ao intercepto ou a média geral das observações, o segundo termo é a contribuição linear de cada fator, o terceiro termo são as possíveis interações entre e o último termo é o resíduo associado aos experimentos.

Nosso objetivo é encontrar quais termos dessa equação são estatisticamente significativos e o tamanho do impacto causado na resposta estudada.

### 3.3.2. Preparo das kombuchas

Adicionou-se chá verde (*Camellia Sinensis*) em concentração final de 5 g/L em água filtrada sob ebulição por 5 minutos. A infusão foi filtrada e adicionada a sacarose inicial correspondente a cada experimento. Após atingir temperatura de 25°C, adicionou-se o inóculo líquido (*starter*) para porcentagem desejada (massa/massa) de cada experimento. A variação da área específica interfacial se deu variando o volume adicionado aos frascos fermentadores com uma área superficial constante.

Os frascos foram então encubados em estufa com controle de temperatura de 25°C ± 1°C e retirados para processamento e análise conforme o tempo correspondente de cada experimento.

### 3.3.3. Determinação de etanol via CG-FID-Headspace

A determinação de etanol seguiu a mesma metodologia acima descrita nos itens 3.1.2 e 3.1.3.

### 3.3.4. Acidez total titulável

A acidez total titulável foi obtida pela titulação volumétrica de 10 ml da amostra com solução padronizada de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol/L com auxílio de pHmetro como indicador de ponto de equivalência em pH = 8,2 (AOAC 942.15, 2000).

### 3.3.5. Acidez fixa titulável

A acidez fixa foi obtida pela titulação volumétrica de 10 ml da amostra após evaporação completa do líquido. O resíduo sólido foi redissolvido com 50 ml de água destilada e titulado com solução padronizada de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol/L

com auxílio de pHmetro como indicador de ponto de equivalência em pH = 8,2 (AOAC 945.08, 2005).

### 3.3.6. Acidez volátil

A acidez volátil foi calculada indiretamente através dos valores obtidos para a acidez total e fixa (AOAC 945.08, 2005):

$$\text{acidez volátil} = \text{acidez total titulável} - \text{acidez fixa titulável}$$

### 3.3.6. pH

As medidas de pH foram realizadas com equipamento pHmetro portátil Akso modelo AK95 com compensação automática de temperatura. A calibração foi feita com soluções padrão nos pontos de pH = 4,01 e pH = 7,00.

### 3.3.7. Brix

A determinação dos graus Brix foi realizada com refratômetro óptico portátil.

### 3.3.8. Análise Estatística

As análises foram realizadas com software Minitab 19.1. Análises entre grupos foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVA) e teste *de Tukey para distinção de médias*. Valores serão considerados significativos quando  $p < 0.05$ .

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Etanol nas Kombuchas Comerciais

Na primeira etapa de determinação de etanol que ocorreu antes da legislação brasileira entrar em vigor, as garrafas de kombucha apresentaram concentrações variando de 0,40% até 3,56% v/v, sendo que 11 das 12 garrafas apresentaram concentrações acima de 0,50% v/v. Apenas uma kombucha possuía concentração de etanol abaixo de 0,50% v/v. Esses resultados indicaram a necessidade de uma legislação de controle uma vez que os fabricantes estavam produzindo kombuchas com níveis elevados de etanol com 91,7% das amostras acima de 0,50% v/v e uma kombucha chegando a conter alarmantes 3,56% v/v, conteúdo próximo de cervejas. Como é possível ver na figura 20, apenas a amostra **C1** contém menos de 0,50 % v/v.

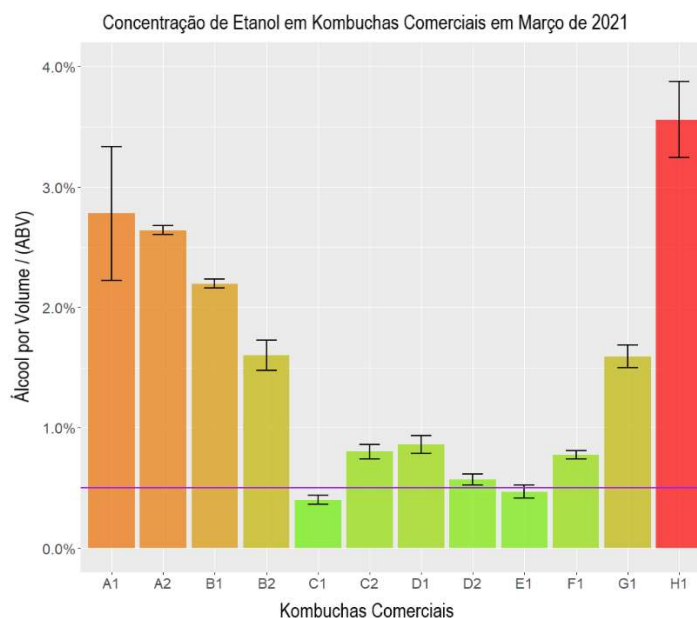


Figura 20 – **Concentração de etanol em amostras de kombuchas comerciais analisadas em março de 2021 comparada com teste t de valor fixo.** As barras de erro indicam um intervalo de confiança de 95% ao redor da média. A linha horizontal roxa indica a concentração de 0,50% ABV (limite legal atual). Amostras de kombucha dos mesmos fabricantes são indicadas pela mesma letra, números indicam sabores diferentes.

Na etapa de determinação de etanol após entrar em vigor a legislação, as garrafas de kombucha apresentaram concentrações variando de 0,11% até 2,40% ABV, sendo que oito das 12 garrafas apresentaram concentrações de etanol acima de 0,50% ABV. Apenas quatro kombuchas apresentaram concentrações de etanol com um intervalo de confiança de 95% que não contém o valor de 0,50% ABV ou acima. Apesar do fato de que todas as kombuchas analisadas apresentaram uma diminuição na concentração de etanol quando comparadas com os resultados antes da legislação estar em vigor, 66,7% das amostras ainda apresentaram concentrações acima de 0,50% ABV, em desacordo com o limite da legislação para kombuchas não alcoólicas (figura 21).

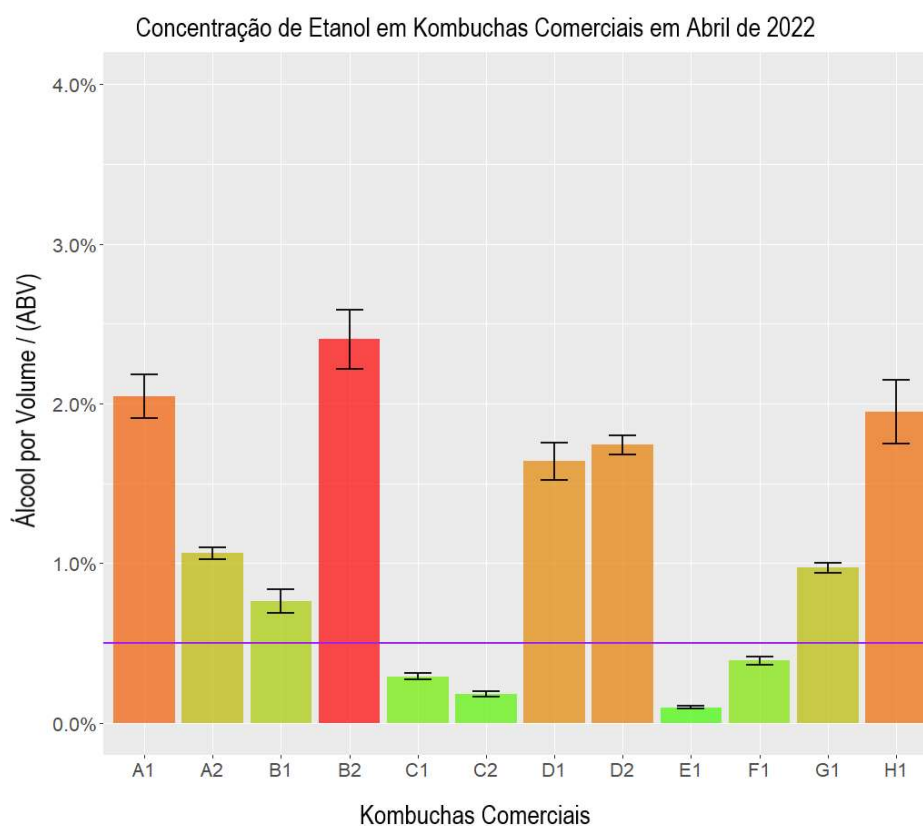


Figura 21 – **Concentração de etanol em amostras de kombuchas comerciais analisadas em abril de 2022 comparada com teste t de valor fixo.** As barras de erro indicam um intervalo de confiança de 95% ao redor da média. A linha horizontal roxa indica a concentração de 0,50% ABV (limite legal atual). Amostras de kombucha dos mesmos fabricantes são indicadas pela mesma letra, números indicam sabores diferentes.

Como qualquer produto de fermentação, a composição da kombucha é afetada por muitos parâmetros como já acima mencionados, tais como: composição microbiológica do inóculo, tipo de chá, fonte de carbono, tempo, temperatura e geometria do fermentador. Dessa maneira, o controle de qualquer composto químico presente é um problema multivariado. O etanol é formado majoritariamente pela ação das leveduras e em seguida pode ser oxidado pelas bactérias acéticas para ácido acético, que por sua vez induz a produção do etanol pelas leveduras (LIU et al., 1996). Ao final, a concentração de etanol é mediada por essas relações simbióticas e por todos fatores que impactam o metabolismo desses micro-organismos envolvidos. A figura 22 apresenta um esquema simplificado sobre o consumo dos açúcares e formação dos maiores metabólitos resultantes da simbiose na kombucha.

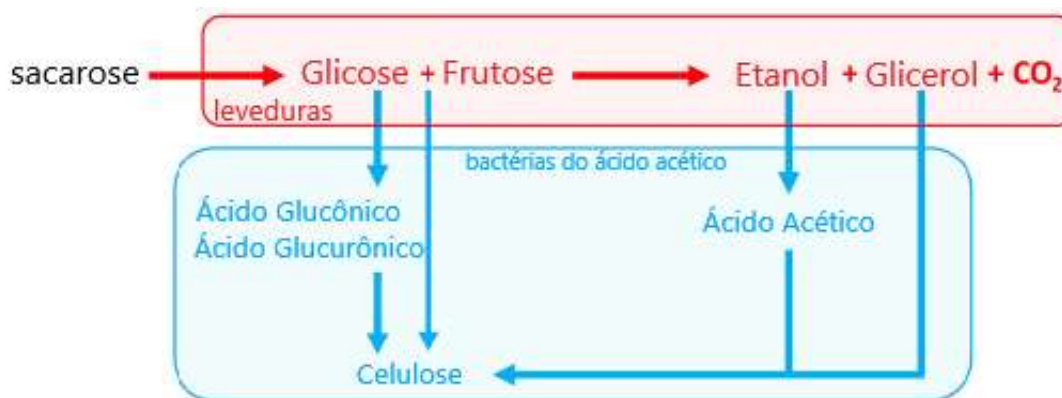


Figura 22 – Principais produtos metabólicos da sacarose pela ação de leveduras e bactérias acéticas da kombucha (adaptado de Laureys, Britton a Clippeleer (2020)).

Ao observar o esquema acima, fica claro que a depender da composição qualitativa e quantitativa das leveduras e bactérias, vias metabólicas serão preferidas nas condições de fermentação escolhida. Não apenas a oxidação do etanol ao ácido acético será uma forma de controlar sua concentração como também a metabolização da glicose e frutose para a formação dos ácidos glucônico e glucurônico e da celulose, diminuindo a disponibilidade do substrato de formação ao etanol.

Diante da variabilidade microbiológica dos SCOBY utilizados pelos produtores (CHEN; LIU, 2000; HARRISON; CURTIN, 2021; MARSH et al., 2014), uma estratégia para o controle do etanol seria uma triagem das variáveis de maior impacto na



produção de etanol para cada fabricante e a posterior construção de modelos preditivos que forneçam condições otimizadas para uma menor concentração de etanol.

Outra dificuldade no controle do etanol é o fato da maioria dos fabricantes de kombucha utilizarem a técnica de *backslopping* para iniciar um novo processo de fermentação, tal procedimento consiste em utilizar parte de um lote recém fermentado como líquido *starter* de um novo lote. A cinética de crescimento dos micro-organismos pode mudar de um lote para outro, mesmo mantendo os parâmetros de fermentação constantes (MAS et al., 2022), dessa forma o conteúdo de etanol pode variar entre lotes e o monitoramento da concentração de etanol durante a fermentação de cada lote deve ser considerado como uma etapa de controle de qualidade importante.

Algumas tentativas de controlar a população microbiana da kombucha através de comunidade sintéticas feitas a partir de leveduras e bactérias selecionadas de kombuchas foram feitas na tentativa de obter atributos sensoriais específicos (LI et al., 2022). Nguyen et al. (2015) testaram razões diferentes entre leveduras e bactérias isoladas de kombuchas para otimizar a produção de ácido glucurônico. Ferremi Leali et al. (2022), Savary et al. (2021) e Wang et al. (2020) testaram comunidades microbianas sintéticas na tentativa de controlar a produção de metabólitos de interesse e atingir atributos sensoriais desejáveis. Essas abordagens podem ser utilizadas para encontrar combinações propícias de leveduras e bactérias que minimizem a concentração final de etanol mantendo um compromisso com um perfil sensorial desejado e outros compostos de interesse à saúde, por exemplo.

Os resultados encontrados para as kombuchas comerciais em abril de 2022 não indicaram um padrão nas concentrações de etanol entre os diferentes fabricantes, possivelmente pelo uso de condições particulares dos parâmetros fermentativos em cada processo de produção. Em relação a cada fabricante, apenas três deles (**C**, **E** e **F**) entre os oito analisados, estão em acordo com o limite legal estabelecido.

Nota-se que para os fabricantes **A**, **B** e **C** existem uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre seus próprios sabores analisados, enquanto que os sabores do

fabricante **D** não apresentaram essa diferença entre si. À medida que muitos fabricantes comercializam suas kombuchas sem filtração e não-pasteurizadas, células viáveis de leveduras e bactérias podem causar mudanças na composição da bebida durante o armazenamento. Talebi et al, (2017) de fato verificaram um aumento na concentração de etanol ao longo do tempo mesmo em garrafas de kombucha refrigeradas. Dessa maneira uma das causas da diferença entre as concentrações de etanol encontrada entre diferentes sabores pode ser devido a fermentação de açúcares residuais disponíveis sejam provenientes da sacarose inicialmente adicionada ou de extratos e sucos de frutas normalmente utilizados na etapa final de saborização do produto.

Vale ressaltar que muitos fabricantes evitam a filtração e pasteurização pela crença de que os micro-organismos presente poderiam trazer algum benefício à saúde do consumidor, no entanto, a fermentação alcoólica que ocorre nas garrafas também é utilizada como fonte de carbonatação da bebida, à medida que além do etanol, também é formado o dióxido de carbono. Essa técnica é conhecida como *primming* e é muito utilizada na carbonatação de bebidas tradicionais, inclusive de qualidade reconhecida como as cervejas belgas e espumantes franceses, bebidas que não são prejudicadas pelo aumento do etanol na garrafa. Esse processo também é conhecido como re-fermentação e é uma alternativa barata e disponível à prática artesanal, uma vez que não demanda investimentos em maquinários capazes de resistir a pressões de até 3 bar de CO<sub>2</sub> que são utilizados nas técnicas de carbonatação artificial, já comuns à indústria de bebidas gaseificadas. Embora custosa, a carbonatação artificial pode ser uma das abordagens para a incipiente indústria de kombucha na tentativa de aumentar o controle sobre o produto engarrafado, não apenas quanto ao teor alcoólico, mas também ganhando maior estabilidade química e biológica na vida de prateleira da kombucha quando associada à filtração e/ou pasteurização para diminuir mudanças no produto devido ao metabolismo microbiano.

Esse cenário encontrado deve preocupar tanto os fabricantes de kombucha quanto as autoridades à medida que se verificou pouco efeito da legislação sobre os produtos disponíveis no mercado, indicando que mudanças no processo de produção da kombucha devem ser adotadas pelos fabricantes para reduzir os níveis de etanol

em seus produtos. É evidente que o tema deve ter um maior volume de pesquisa científica para atender essa demanda, mas também é importante reconhecer, dada a natureza específica e multivariada da questão, que cada fabricante vai enfrentar desafios próprios com suas culturas de bactérias e leveduras.

A iniciativa do *Natural Health and Food Products Research Group* do Instituto de Tecnologia da Columbia Britânica no Canadá de analisar um grande número de kombuchas disponíveis no mercado canadense e produzir documentos públicos de como controlar as concentrações de etanol na produção da kombucha (BCIT, 2022) pode ser uma boa estratégia a ser seguida por outros países como o Brasil, dando subsídios para um mercado em expansão através do diagnóstico preciso do cenário entre o maior número de produtores possíveis e auxiliando na produção de kombuchas seguros ao consumidor que atendam os limites da legislação vigente.

#### 4.2. Composição microbiológica dos SCOBY de trabalho

A escolha dos SCOBY de trabalho se deu em função de diferenças na concentração de etanol obtidas quando submetidos as mesmas condições de fermentação.

Ao conduzir um ciclo fermentativo de sete dias, com 50 g/L de sacarose inicial e 10% (m/m) de porcentagem de inóculo sob 25°C, obtivemos para dois SCOBY diferentes concentrações estatisticamente diferentes, às duas culturas foram dados os nomes de SC1 e SC2. Ambos SCOBY selecionados foram obtidos a partir do cultivo de kombuchas comerciais disponíveis na cidade de São Paulo.

A tabela 5 apresenta os resultados para os SCOBY em triplicata.

Tabela 5 - Concentrações de etanol em g/L para diferentes SCOBY sob mesmas condições de fermentação

	etanol	IC 95% N = 3	
		inferior	superior
SC1	3,44	2,34	4,53
SC2	9,84	7,69	11,99

A tabela 6 apresenta as contagens de unidades formadoras de colônias de diferentes tipos de microrganismos presentes nas kombuchas selecionados para o estudo (SC1 e SC2).

Tabela 6 - Contagem de unidades formadoras de colônia por ml para SC1 e SC2 nos diferentes meios testados

Meio de Cultivo	Tipo de Microrganismo	contagem de UFC		teste t para duas médias (95%)
		SC1	SC2	
DRBC + Cloranfenicol <b>Aerobiose</b>	Fungos e Leveduras	2,9 +/- 0,5 x 10e6	3,4 +/- 1,3 x 10e6	IGUAIS, não há diferença significativa entre as contagens
RCA + Ciclohexitida <b>Anaerobiose</b>	Bactérias Anaeróbicas	3,1 +/- 0,5 x 10e5	6,1 +/- 0,5 x 10e5	DIFERENTES, há diferença significativa entre as contagens
MRS + Ciclohexitida + CaCO3 <b>Anaerobiose</b>	Bactérias Lácticas	zero	zero	IGUAIS, não há diferença significativa entre as contagens
MRS + Ciclohexitida + Vancomicina + Etanol + Ác. Acético <b>Aerobiose</b>	Bactérias Acéticas	2,5 +/- 1,4 x 10e5	5,7 +/- 4,0 x 10e5	IGUAIS, não há diferença significativa entre as contagens

Verificou-se que tanto para fungos e leveduras quanto para bactérias acéticas e lácticas, as contagens de UFC foram estatisticamente iguais entre SC1 e SC2, enquanto que as contagens de UFC no meio RCA em anaerobiose foram diferentes.

Embora exista essa similaridade entre os dois SCOBY na maioria dos meios utilizados, sabe-se que não é possível acessar completamente a composição microbiológica através de métodos de cultivo clássicos que em geral são capazes de promover o crescimento e contagem de apenas 1% dos microrganismos existentes.

A inspeção visual da morfologia das colônias formadas confirma uma distinção entre os dois kombuchas estudados como é possível ver nas figuras 23 e 24 abaixo:

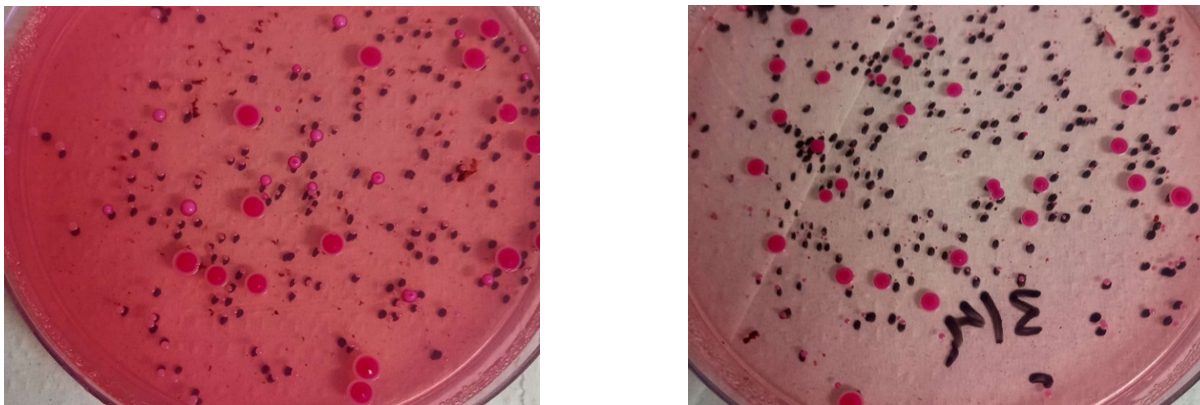


Figura 23 – À esquerda colônias de fungos e leveduras formadas com inóculo de SC1, à direita colônias de fungos e leveduras formadas com inóculo de SC2.

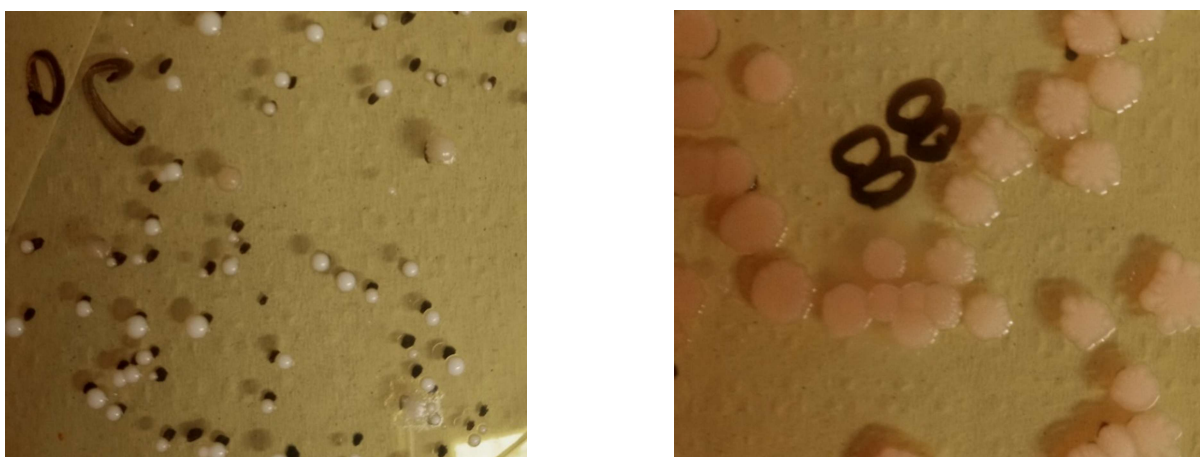


Figura 24 – À esquerda colônias de bactérias acéticas formadas com inóculo de SC1, à direita colônias de bactérias acéticas formadas com inóculo de SC2.

Esses resultados indicam que apesar das contagens de UFC similares entre os SCOBY, existe uma diferença qualitativa entre as colônias de leveduras e bactérias acéticas, que pode resultar em quantidades de etanol e acidez diferentes na kombucha produzida mesmo quando submetidos as mesmas condições de fermentação.

### 4.3. Triagem das variáveis da fermentação de maior impacto na produção de etanol, acidez fixa, acidez volátil e pH da kombucha

Diante dos resultados obtidos por Mas et al. (2022) relatando variações temporais na composição de uma kombucha comercial mantida sob condições constantes ao longo do tempo, considerou-se que pudessem existir diferenças entre os *starters* utilizados para iniciar cada ciclo fermentativo semanal mesmo que esses fossem submetidos às mesmas condições de fermentação: sete dias, com 50 g/L de sacarose inicial e 10% (m/m) de porcentagem de inóculo sob 25°C.

De fato, os starters utilizados apresentaram variação estatística significativa nas concentrações de etanol, mesmo sem apresentar essa variação nos dois parâmetros de controle do final da fermentação, o Brix que indica o açúcar residual e o pH que indica a produção de ácido orgânicos. A tabela 7 apresenta os dados para os *starters* utilizados no início de cada ciclo fermentativo de SC1 e SC2 nos experimentos de triagem de variáveis.

Tabela 7 - Parâmetros de cada starter utilizado nos experimentos de triagem de variáveis. Cores diferentes indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre médias de cada parâmetro

	09/jun	16/jun	23/jun
SC1			
etanol (g/L)	1,27	1,05	0,91
Brix	4,2	4,3	4,2
pH	2,71	2,73	2,62
SC2			
etanol (g/L)	1,13	-	0,59
Brix	4,5	4,5	4,6
pH	3,13	3,25	3,5

Dessa forma, o método de triagem de variáveis por regressão fatorial exigiu que cada ciclo semanal fosse tratado como um bloco para que as possíveis variações pudessem ser computadas no modelo da regressão.

Os resultados dos experimentos de triagem de variáveis de maior impacto para SC1 podem ser verificados na tabela 8 abaixo, cada ciclo fermentativo semanal está indicado como blocos.

Tabela 8 - Resultados das Variáveis Resposta nos experimentos de triagem de variáveis para a kombucha **SC1**. Acidez fixa está expressa em ácido glucônico e acidez volátil está expressa em ácido acético.

	ensaio	sacarose	% inóculo	tempo	área interfacial específica	pH	acidez fixa mEq/100ml	acidez volátil mEq/100ml	etanol g/L	
Bloco 1 semana 1	1	-1	-1	-1	-1	2,95	16,00	46,00	0,58	
	2	1	-1	-1	1	2,70	27,00	38,35	0,18	
	3	-1	1	-1	1	2,60	35,25	54,25	0,16	
	4	1	1	-1	-1	2,90	16,75	55,50	0,84	
	5	-1	-1	1	1	2,43	62,75	65,75	0,21	
	6	1	-1	1	1	-1	2,75	32,00	94,00	0,95
	7	-1	1	1	1	-1	2,66	34,25	129,00	0,83
	8	1	1	1	1	1	2,33	113,00	129,50	0,35
	9	0	0	0	0	0	2,73	28,00	92,25	0,52
	10	0	0	0	0	0	2,73	29,00	90,00	0,49
	11	0	0	0	0	0	2,71	30,50	93,75	0,56
	12	0	0	0	0	0	2,73	28,85	90,90	0,52
Bloco 2 semana 2	1	-1	-1	-1	-1	3,11	10,35	40,25	0,60	
	2	1	-1	-1	1	2,86	19,85	37,00	0,16	
	3	-1	1	-1	1	2,68	28,25	55,85	0,14	
	4	1	1	-1	-1	2,99	15,85	53,50	0,69	
	5	-1	-1	1	1	2,57	47,75	86,25	0,33	
	6	1	-1	1	1	-1	2,75	32,00	96,00	0,71
	7	-1	1	1	1	-1	2,70	31,90	119,10	0,44
	8	1	1	1	1	1	2,45	72,25	100,00	0,42
	9	0	0	0	0	0	2,78	28,60	82,90	0,58
	10	0	0	0	0	0	2,76	27,50	86,25	0,64
	11	0	0	0	0	0	2,77	26,60	85,15	0,68
	12	0	0	0	0	0	2,76	26,10	86,90	0,59
Bloco 3 semana 3	1	-1	-1	-1	-1	2,91	21,05	40,45	0,71	
	2	1	-1	-1	1	2,77	26,25	36,75	0,27	
	3	-1	1	-1	1	2,57	42,25	59,75	0,16	
	4	1	1	-1	-1	2,91	19,15	51,35	1,32	
	5	-1	-1	1	1	2,38	81,00	101,50	0,28	
	6	1	-1	1	1	-1	2,68	30,15	88,85	1,69
	7	-1	1	1	1	-1	2,69	28,10	123,40	0,62
	8	1	1	1	1	1	2,40	85,50	128,90	0,60
	9	0	0	0	0	0	2,68	29,70	93,05	0,61
	10	0	0	0	0	0	2,65	35,00	98,00	0,64
	11	0	0	0	0	0	2,65	34,00	95,50	0,40
	12	0	0	0	0	0	2,68	29,75	96,00	0,68

A partir desses resultados realizou-se a regressão fatorial com o auxílio do software Minitab 19.1 com intervalos de confiança estatística de 95% para todos os parâmetros.

É interessante avaliar os resultados das regressões para cada uma das semanas e verificar as diferenças, provavelmente resultantes das variações do inóculo utilizado, uma vez que mesmo seguindo uma metodologia de cultivo sob condições iguais, verificou-se que a cada final de ciclo existem diferenças quanto a composição química, muito provavelmente decorrentes de pequenas oscilações na composição qualitativa e quantitativa de cada ciclo.

### Efeitos Padronizados - pH

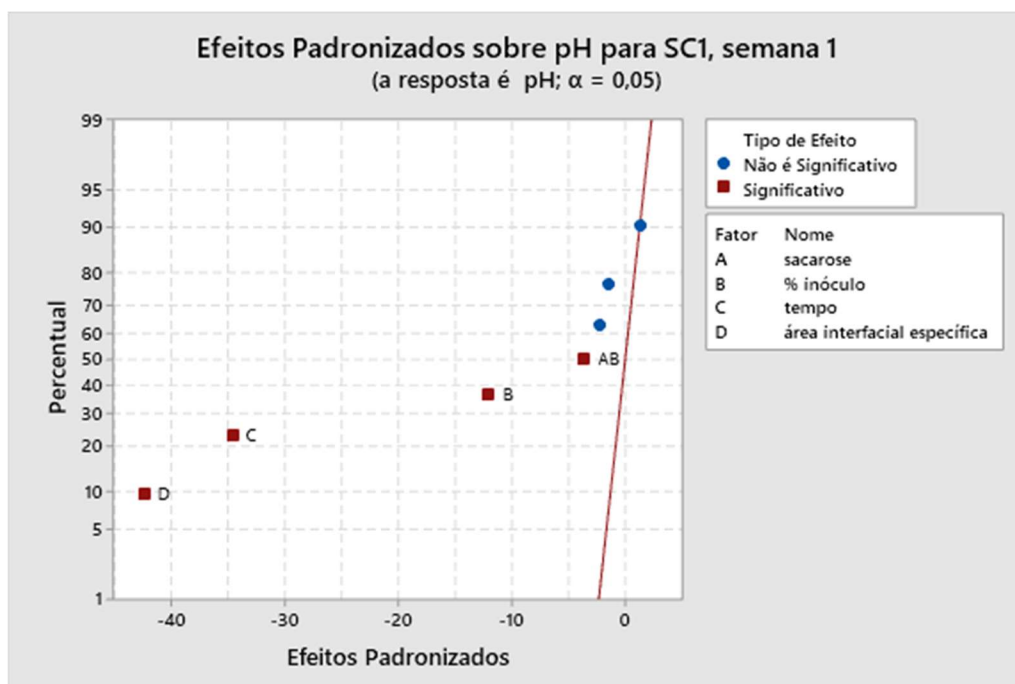


Figura 25 – Efeitos padronizados que indicam a magnitude do impacto dos parâmetros fermentativos sobre pH no primeiro ciclo para SC1.



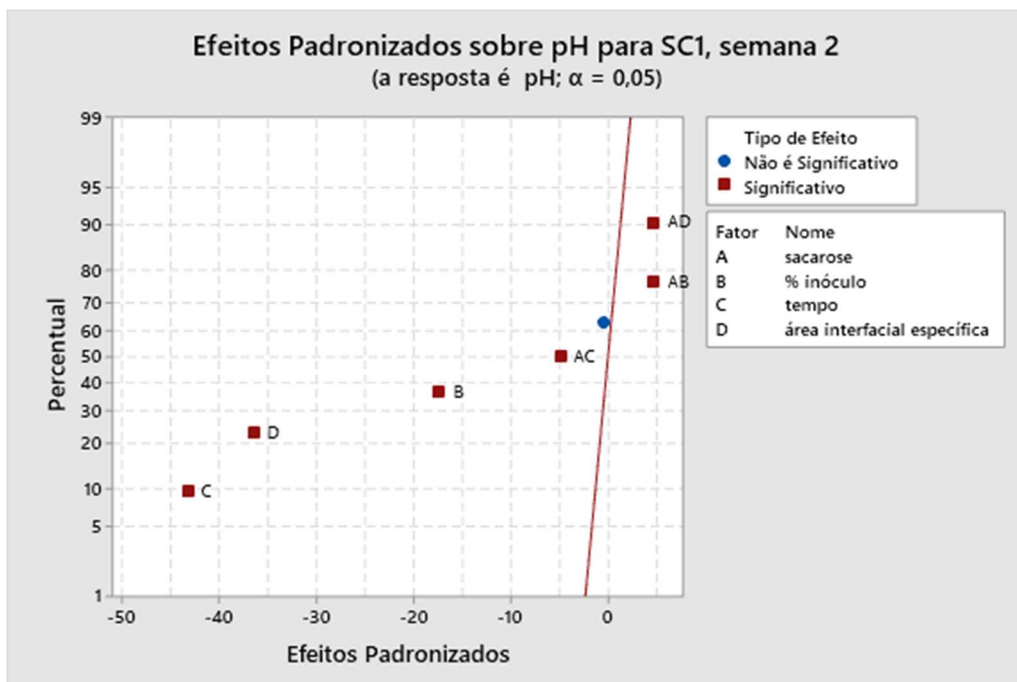


Figura 26 – Efeitos padronizados que indicam a magnitude do impacto dos parâmetros fermentativos sobre pH no segundo ciclo para SC1.

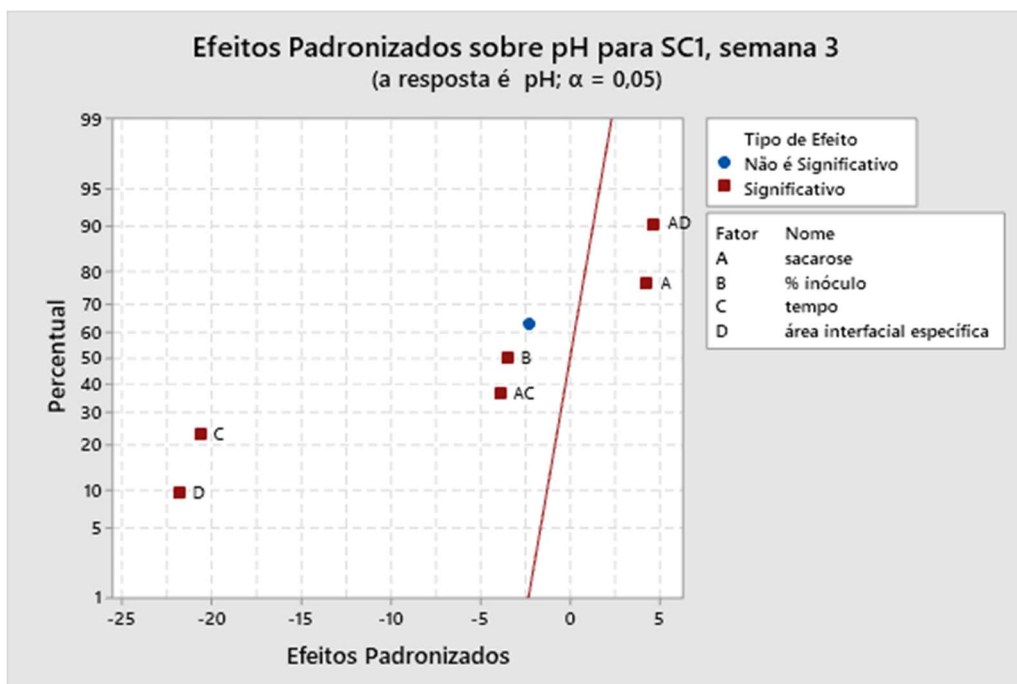


Figura 27 – Efeitos padronizados que indicam a magnitude do impacto dos parâmetros fermentativos sobre pH no terceiro ciclo para SC1.

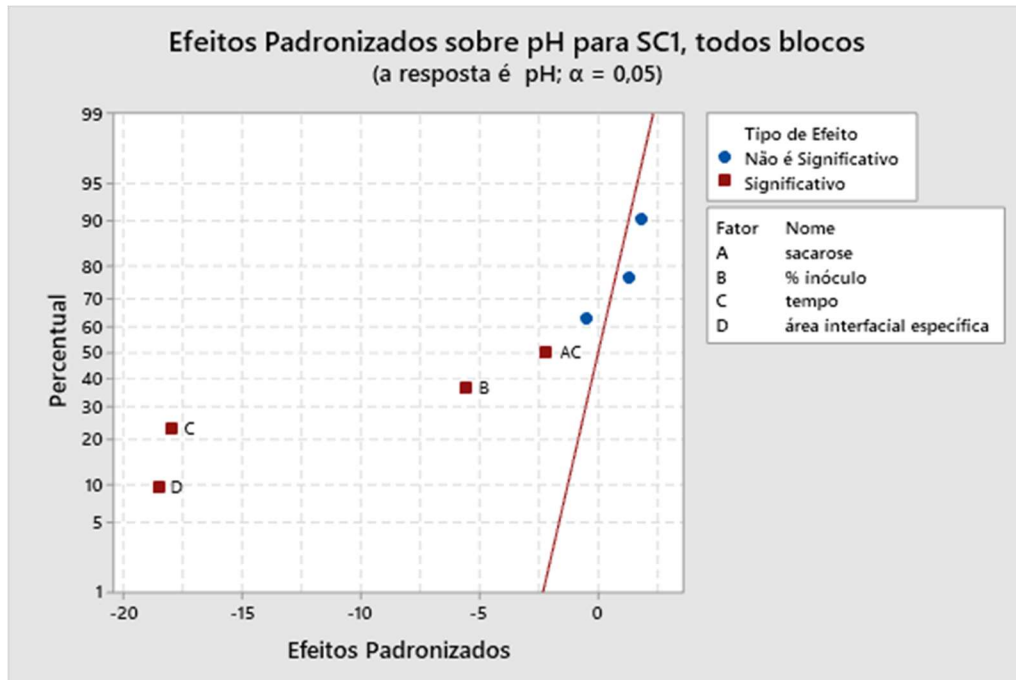


Figura 28 – Efeitos padronizados que indicam a magnitude do impacto dos parâmetros fermentativos sobre pH na média dos três ciclos para SC1.

No caso do impacto das variáveis sobre a variação do pH para o SCOBY SC1 não houve grandes variações entre as semanas e o resultado médio que computou os três blocos não diferiu de cada semana quanto às variáveis de maior impacto. O tempo e a área interfacial específica foram aquelas que mais causaram variação no pH da kombucha estudada, enquanto que a porcentagem de inóculo utilizada como starter e a interação da variação da sacarose com a variação do tempo também impactaram significativamente a variação do pH porém em menor medida.

O pH é um parâmetro da kombucha que é limitado pela legislação em 2,5, logo é necessário ter controle sobre sua evolução, seja pelo cumprimento da legislação que buscar prevenir o consumidor à acidez elevada e potencialmente danosa, mas também pelo efeito sensorial causado pelo excesso de acidez que pode tornar o produto indesejado pelos consumidores

## Efeitos Padronizados - Acidez Fixa

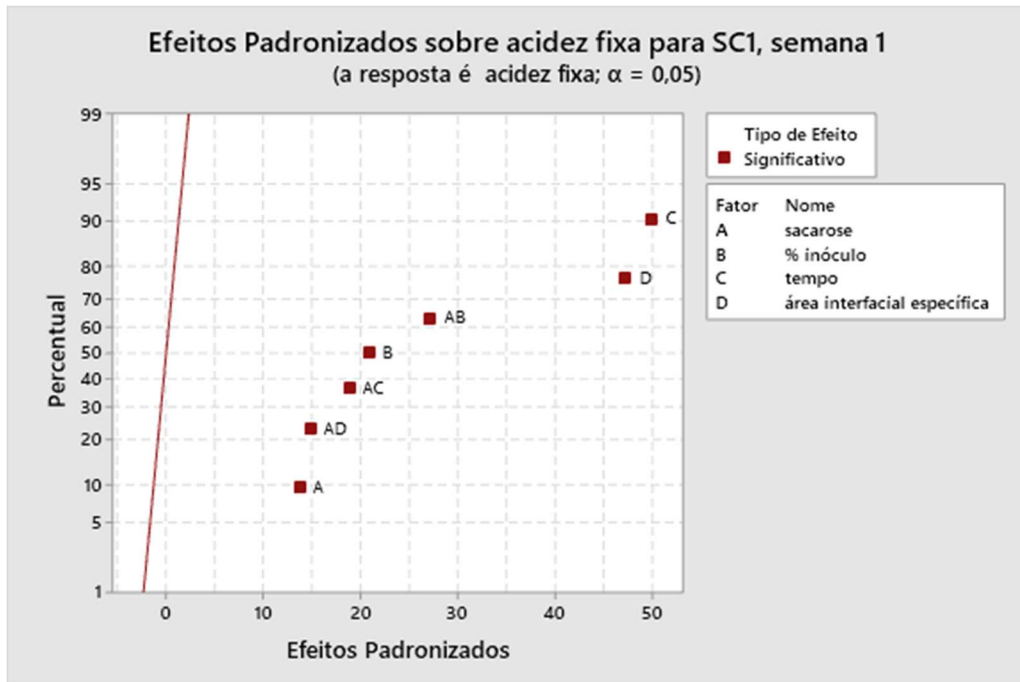


Figura 29 – Efeitos padronizados que indicam a magnitude do impacto dos parâmetros fermentativos sobre acidez fixa no primeiro ciclo para SC1.

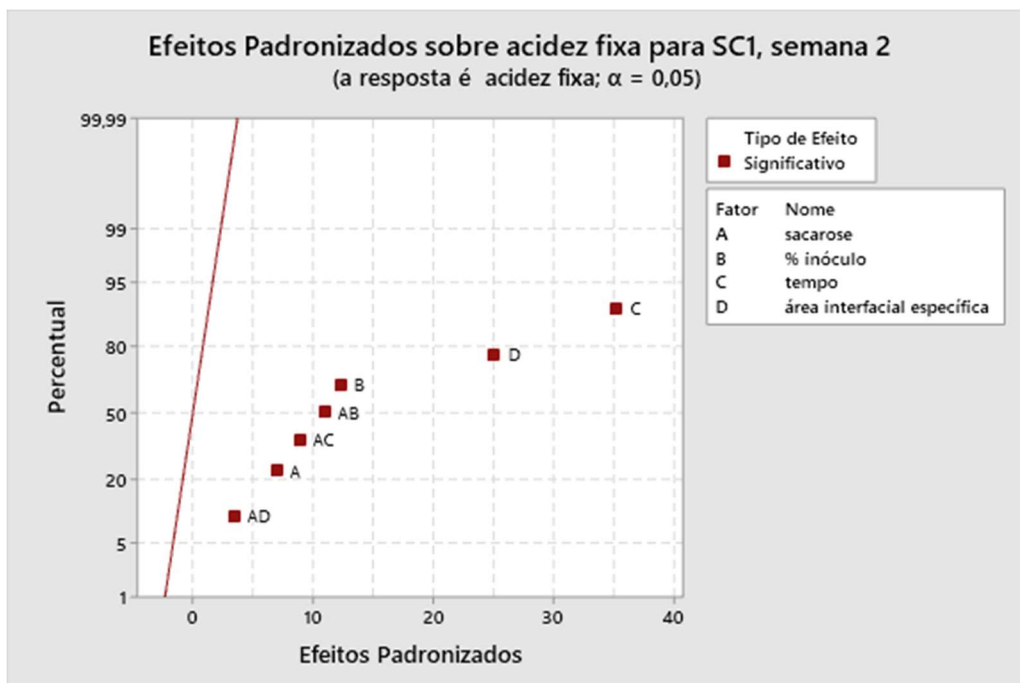


Figura 30 – Efeitos padronizados que indicam a magnitude do impacto dos parâmetros fermentativos sobre acidez fixa no segundo ciclo para SC1.

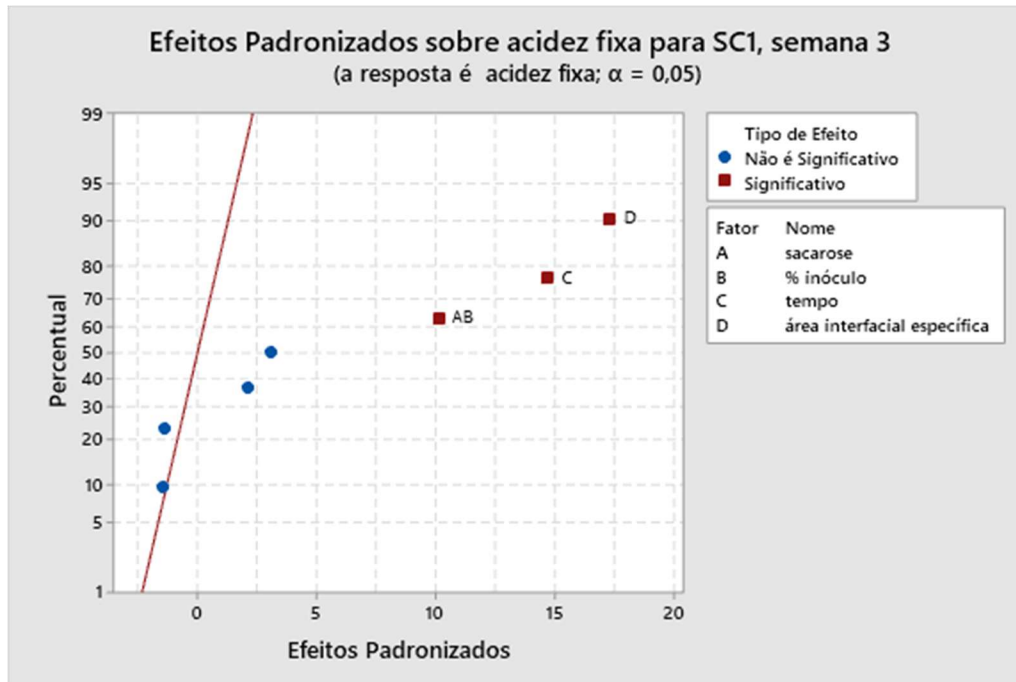


Figura 31 – Efeitos padronizados que indicam a magnitude do impacto dos parâmetros fermentativos sobre acidez fixa no terceiro ciclo para SC1.

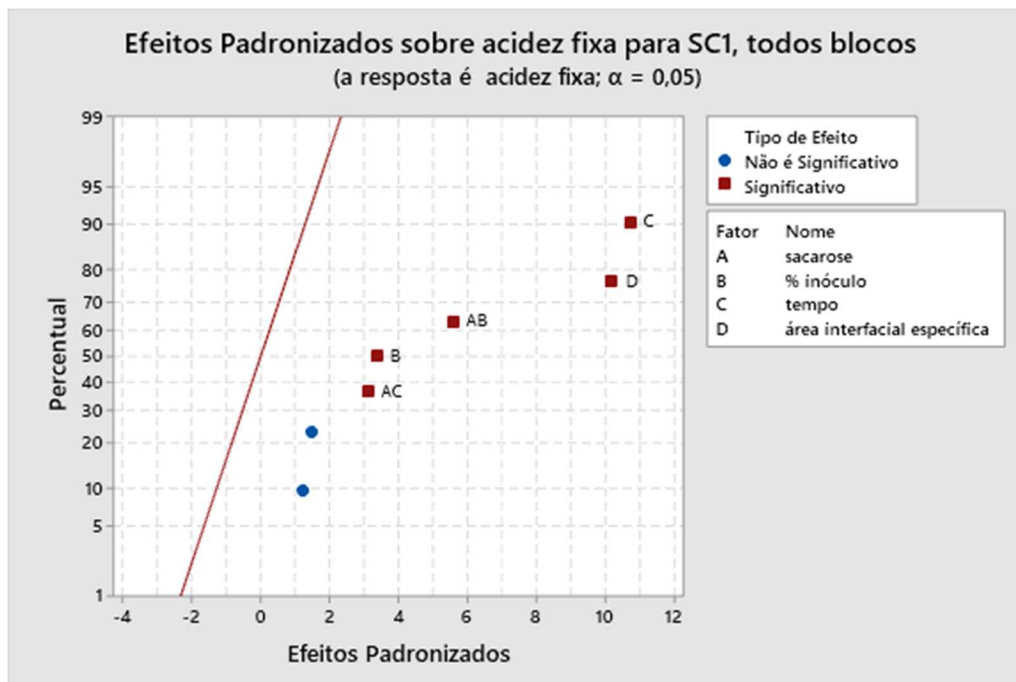


Figura 32 – Efeitos padronizados que indicam a magnitude do impacto dos parâmetros fermentativos sobre acidez fixa na média dos três ciclos para SC1.

Embora a acidez fixa não seja um parâmetro legislado para a kombucha, é de grande relevância para a compreensão da fermentação uma vez que dá um indicativo

dos ácidos orgânicos não voláteis que estão sendo produzidos pelo metabolismo dos diversos microrganismos presentes na kombucha.

Os resultados para SC1 indicam uma correlação com aqueles obtidos para o pH, o que é de se esperar já que o pH é a medida de íons  $H^+$  presentes em solução provenientes dos ácidos. O tempo e a área interfacial específica são também as variáveis de maior impacto, enquanto que a porcentagem de inóculo aparece também como significativa para explicar a variação da acidez fixa. As interações entre a concentração de sacarose com o tempo e com a porcentagem de inóculo podem ser entendidas como um excesso de sacarose no início da fermentação que pode impactar a acidez desde que exista também um aumento no tamanho do inóculo utilizado ou mesmo no tempo de fermentação que também proporciona a oportunidade da comunidade microbiana se desenvolver e se tornar apta a metabolizar maior quantidade de sacarose.

O tempo é esperado como um fator significativo sobre a produção de ácidos orgânicos uma vez que eles são parte dos processos metabólicos dos microrganismos, a área interfacial específica poderia ser entendida com uma maior disponibilidade de oxigênio ao crescimento da comunidade microbiana e conseqüentemente à uma maior produção de ácidos.

#### Efeitos Padronizados - Acidez Volátil

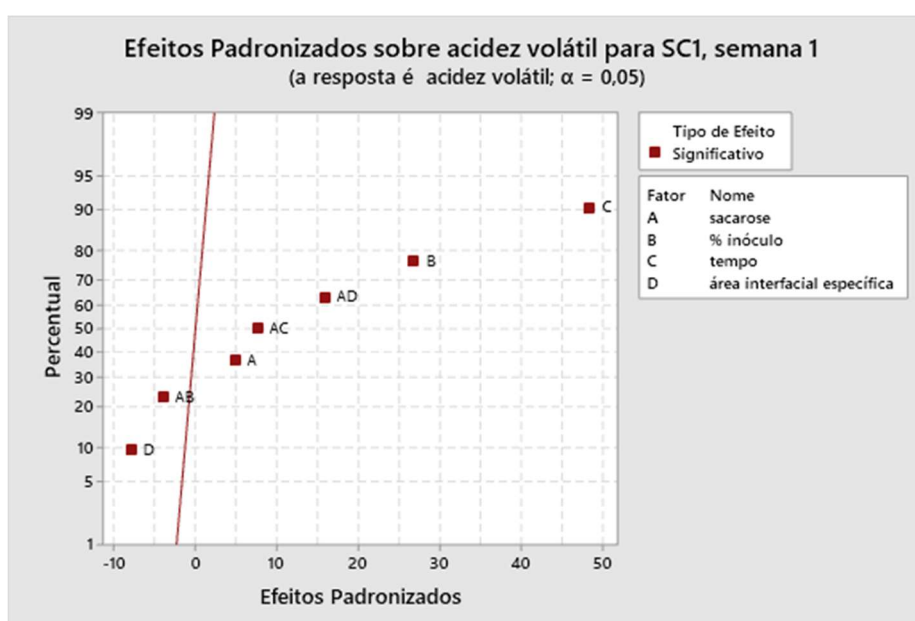


Figura 33 – Efeitos padronizados que indicam a magnitude do impacto dos parâmetros fermentativos sobre acidez volátil no primeiro ciclo para SC1.

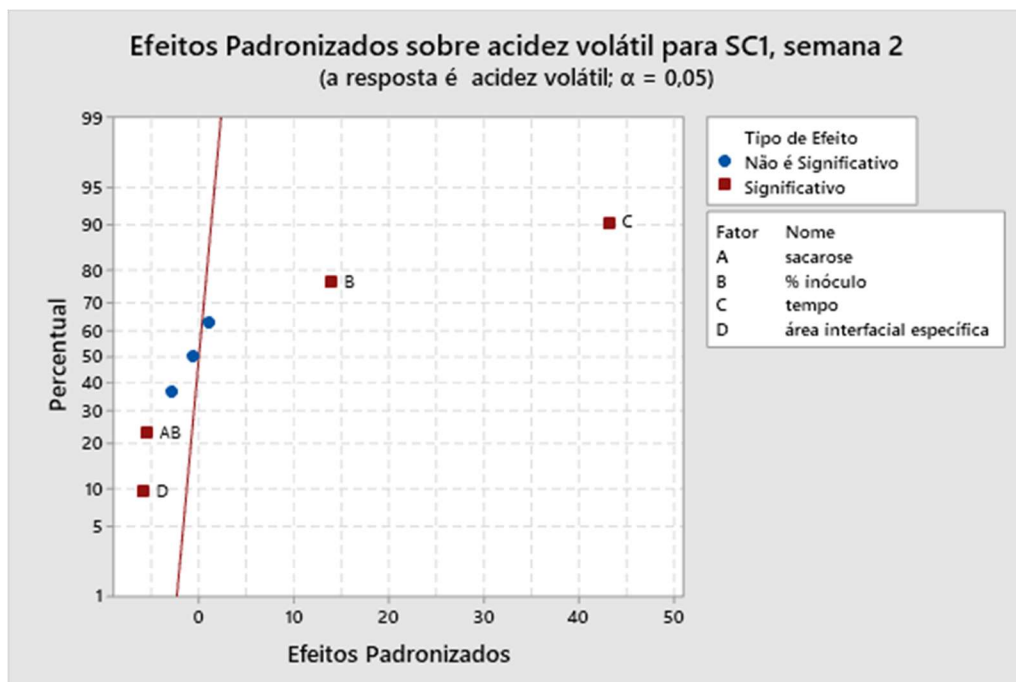


Figura 34 – Efeitos padronizados que indicam a magnitude do impacto dos parâmetros fermentativos sobre acidez volátil no segundo ciclo para SC1.

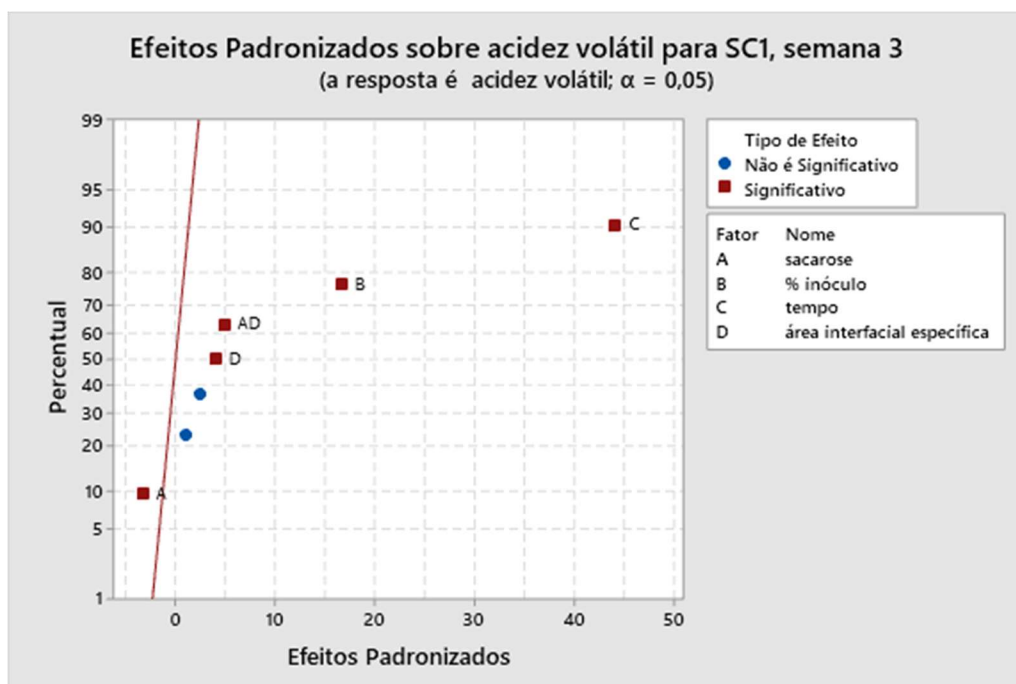


Figura 35 – Efeitos padronizados que indicam a magnitude do impacto dos parâmetros fermentativos sobre acidez volátil no terceiro ciclo para SC1.

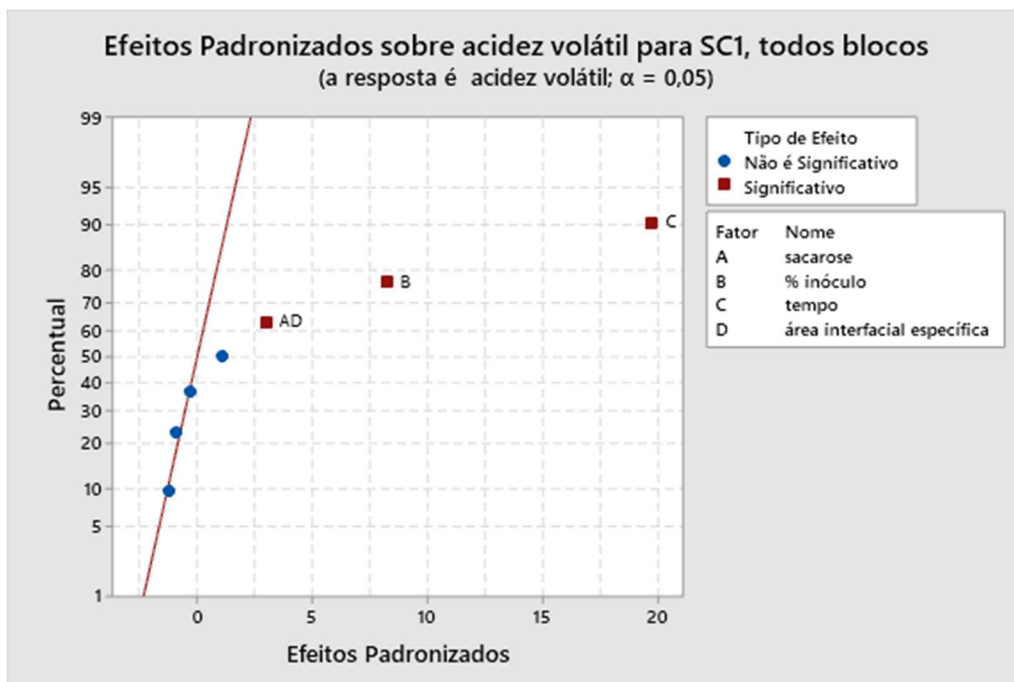


Figura 36 – Efeitos padronizados que indicam a magnitude do impacto dos parâmetros fermentativos sobre acidez volátil na média dos três ciclos para SC1.

A acidez volátil é diretamente relacionada à concentração de ácido acético e mostrou uma variação entre os fatores de maior impacto ao longo dos ciclos estudados. Enquanto o tempo e a porcentagem de inóculo foram sempre fatores de impacto positivo na acidez volátil, foi observado nas semanas um e dois um impacto negativo da área interfacial específica que depois passou a ser positivo na terceira semana ficando na média fora dos fatores estatisticamente relevantes. Havia uma expectativa que a acidez volátil seria fortemente dependente da área interfacial específica pela maior oferta de oxigênio que é a espécie determinante para a oxidação do etanol ao ácido acético.

É importante notar que embora a área interfacial específica não foi significativa como fator de impacto sobre a acidez volátil quando isolada, a interação dela com a concentração inicial de sacarose teve impacto positivo na média dos blocos, esse resultado junto do fato da porcentagem de inóculo ter sido significativo sobre a acidez volátil pode ser explicado por um *starter* de SC1 relativamente pequeno diante da quantidade de sacarose inicial e que dessa forma não seria também influenciado pela maior oferta de oxigênio quando numa área interfacial específica maior a não ser quando acompanhado do aumento da sacarose.

## Efeitos Padronizados – Etanol

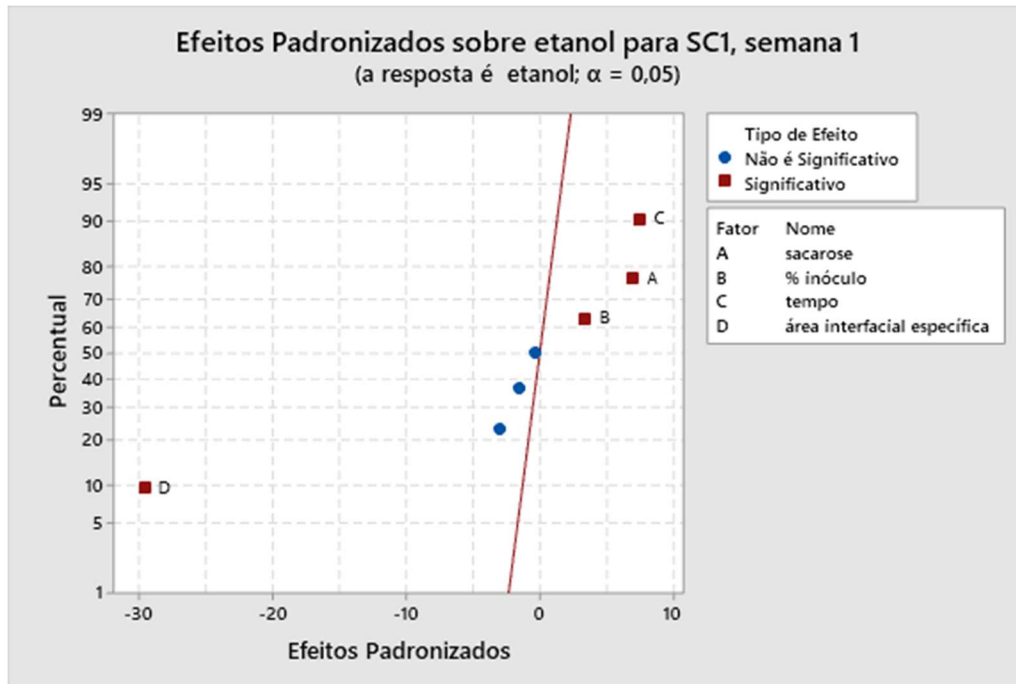


Figura 37 – Efeitos padronizados que indicam a magnitude do impacto dos parâmetros fermentativos sobre etanol no primeiro ciclo para SC1.

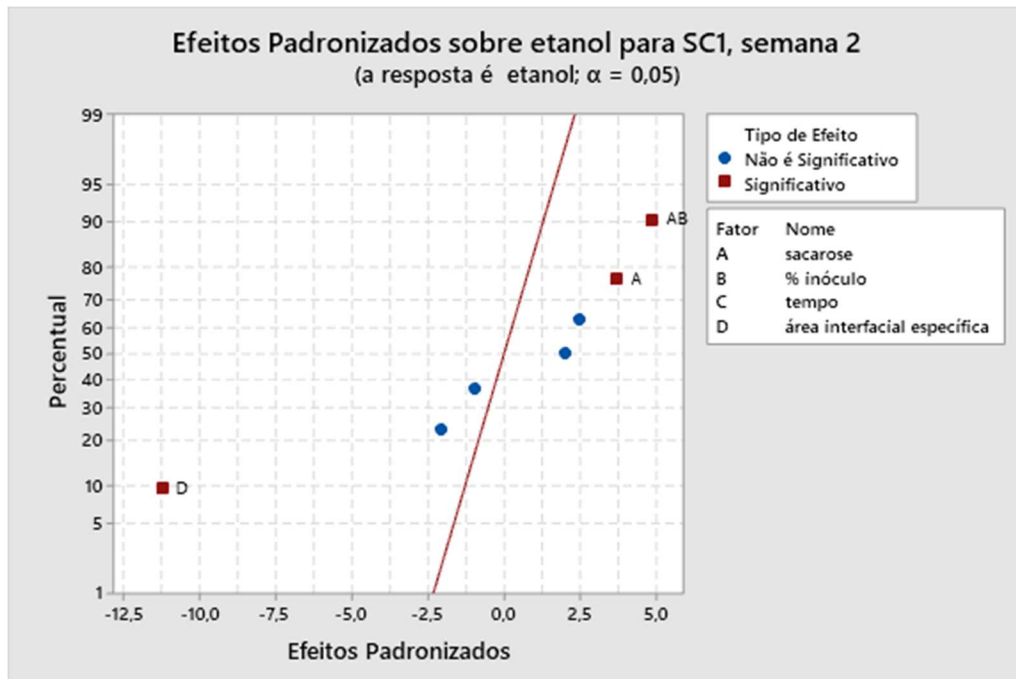


Figura 38 – Efeitos padronizados que indicam a magnitude do impacto dos parâmetros fermentativos sobre etanol no segundo ciclo para SC1.



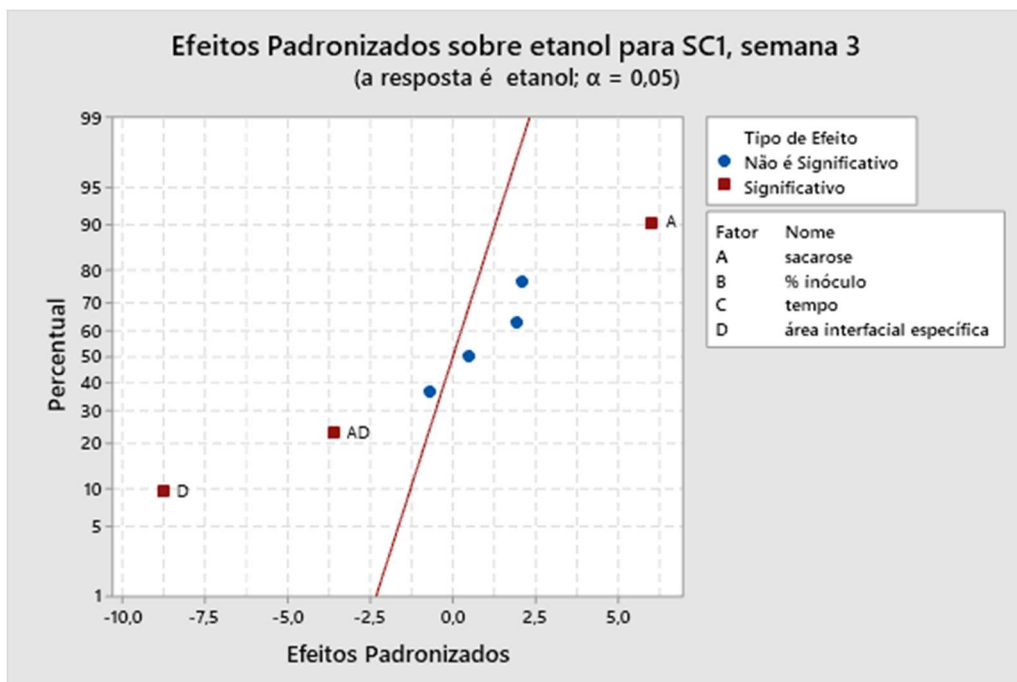


Figura 39 – Efeitos padronizados que indicam a magnitude do impacto dos parâmetros fermentativos sobre etanol no terceiro ciclo para SC1.

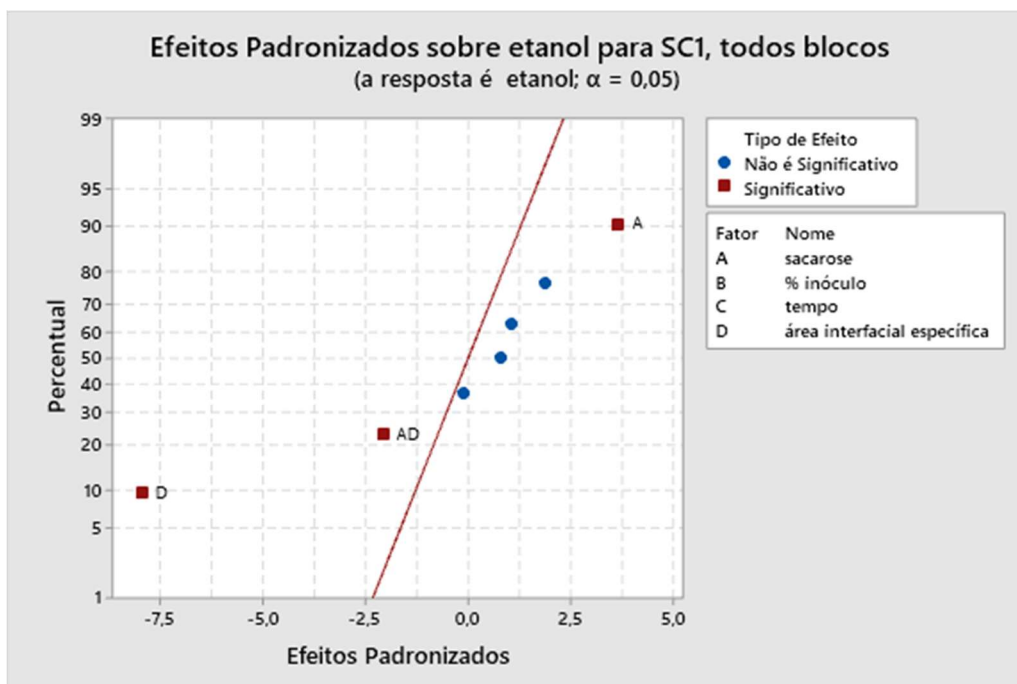


Figura 40 – Efeitos padronizados que indicam a magnitude do impacto dos parâmetros fermentativos sobre etanol na média dos três ciclos para SC1.

Os fatores que apresentaram impacto significativo sobre a variação negativa do etanol na kombucha SC1 foram a área interfacial específica e a interação dela com a quantidade inicial de sacarose o que era de se esperar diante da maior oferta de

oxigênio relativa com uma área interfacial específica maior. Já como fator de impacto positivo sobre a variação de etanol, a quantidade inicial de sacarose foi significativa.

Quanto ao impacto na variação do etanol pode-se considerar também que um aumento da área interfacial específica além aumentar o oxigênio disponível às bactérias para a oxidação do mesmo a ácido acético, existe a possibilidade de um aumento do metabolismo de respiração das leveduras em detrimento da fermentação, já a diminuição do etanol formado quando se reduz a quantidade inicial de sacarose e aumenta-se a área interfacial específica poderia resultar da diminuição do efeito Crabtree nas leveduras, que é um mecanismo preferencial pelo metabolismo da fermentação alcoólica em condições aeróbicas quando há altas concentrações de glicose e frutose disponíveis (DE DEKEN, 1966).

#### Resultados da triagem de variáveis para SC2.

Os resultados dos experimentos de triagem de variáveis de maior impacto para SC2 podem ser verificados na tabela 9 abaixo, cada ciclo fermentativo semanal está indicado como blocos.

Tabela 9 - Resultados das Variáveis Resposta nos experimentos de triagem de variáveis para a kombucha **SC2**.  
Acidez fixa está expressa em ácido glucônico e acidez volátil está expressa em ácido acético.

	ensaio	sacarose	% inóculo	tempo	área interfacial específica	pH	acidez fixa mEq/100ml	acidez volátil mEq/100ml	etanol g/L
Bloco 1 semana 1	1	-1	-1	-1	-1	3,56	4,75	18,45	0,35
	2	1	-1	-1	1	3,61	5,30	14,00	0,31
	3	-1	1	-1	1	3,57	5,00	15,30	0,17
	4	1	1	-1	-1	3,46	6,25	24,25	0,40
	5	-1	-1	1	1	3,16	10,45	37,25	0,47
	6	1	-1	1	-1	3,14	10,30	42,90	0,90
	7	-1	1	1	-1	3,12	10,75	51,25	0,80
	8	1	1	1	1	3,07	12,50	30,40	0,61
	9	0	0	0	0	3,29	7,75	32,25	0,54
	10	0	0	0	0	3,25	10,00	34,50	0,49
	11	0	0	0	0	3,29	8,60	30,40	0,58
	12	0	0	0	0	3,27	8,20	31,80	0,50
Bloco 2 semana 2	1	-1	-1	-1	-1	3,70	4,50	37,00	0,28
	2	1	-1	-1	1	3,68	5,60	36,80	0,19
	3	-1	1	-1	1	3,56	5,35	35,60	0,24
	4	1	1	-1	-1	3,49	6,65	34,90	0,43
	5	-1	-1	1	1	3,82	5,50	38,20	0,20
	6	1	-1	1	-1	3,31	7,95	33,10	0,56
	7	-1	1	1	-1	3,24	8,00	32,40	0,51
	8	1	1	1	1	3,29	9,70	32,90	0,36
	9	0	0	0	0	3,49	5,80	34,90	0,32
	10	0	0	0	0	3,47	6,20	34,70	0,36
	11	0	0	0	0	3,46	5,55	34,60	0,30
	12	0	0	0	0	3,46	5,35	34,60	0,29
Bloco 3 semana 3	1	-1	-1	-1	-1	3,95	2,90	8,10	0,09
	2	1	-1	-1	1	3,82	3,80	9,60	0,03
	3	-1	1	-1	1	3,76	3,85	10,15	0,03
	4	1	1	-1	-1	3,69	4,50	13,00	0,03
	5	-1	-1	1	1	3,94	3,50	5,50	0,03
	6	1	-1	1	-1	3,58	4,80	15,20	0,19
	7	-1	1	1	-1	3,58	4,75	14,55	0,19
	8	1	1	1	1	4,28	3,85	0,85	0,03
	9	0	0	0	0	3,71	4,00	11,40	0,13
	10	0	0	0	0	3,72	4,50	10,50	0,17
	11	0	0	0	0	3,70	4,45	11,85	0,14
	12	0	0	0	0	3,74	4,50	11,70	0,10

No caso de SC2, o terceiro ciclo foi descartado pois os resultados indicaram uma desestabilização da cultura com valores muito baixos de acidez e etanol.

## Efeitos Padronizados - pH

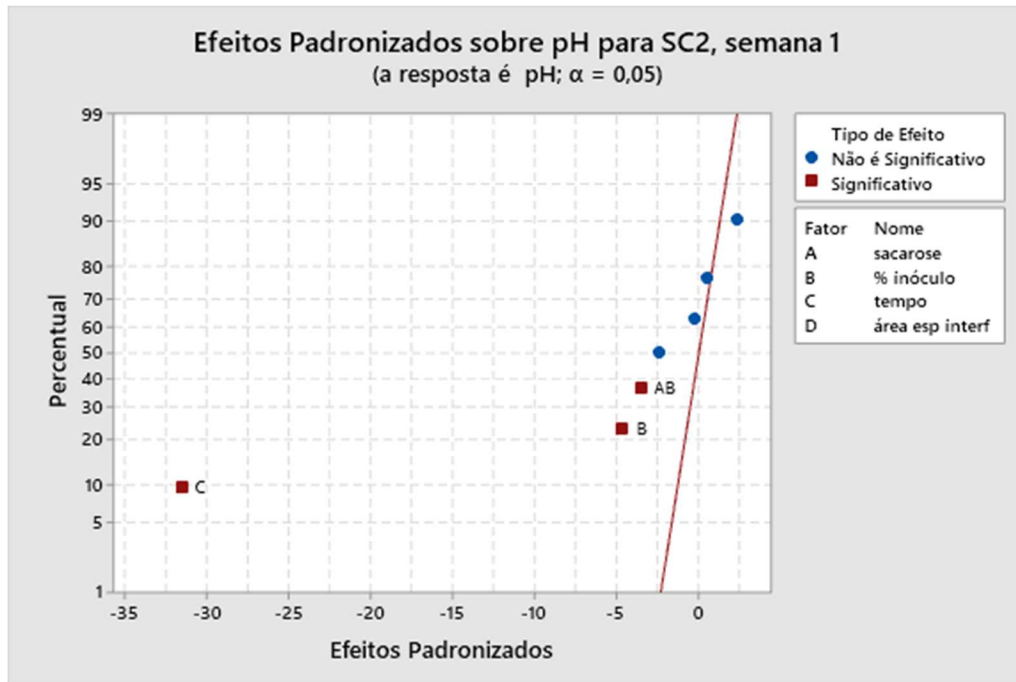


Figura 41 – Efeitos padronizados que indicam a magnitude do impacto dos parâmetros fermentativos sobre pH no primeiro ciclo para SC2.

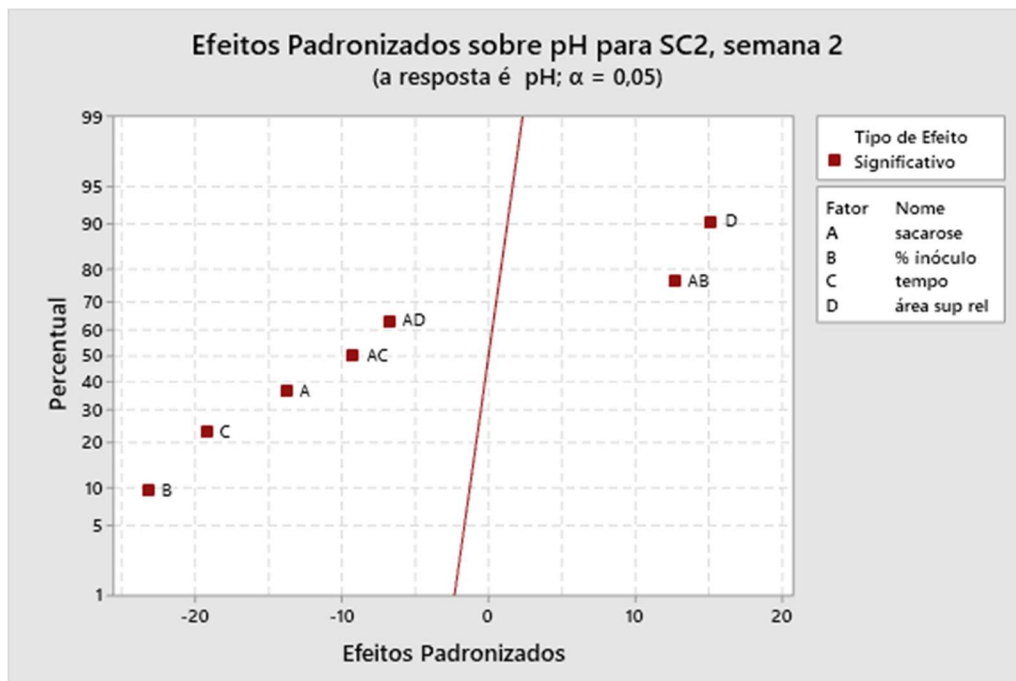


Figura 42 – Efeitos padronizados que indicam a magnitude do impacto dos parâmetros fermentativos sobre pH no segundo ciclo para SC2.

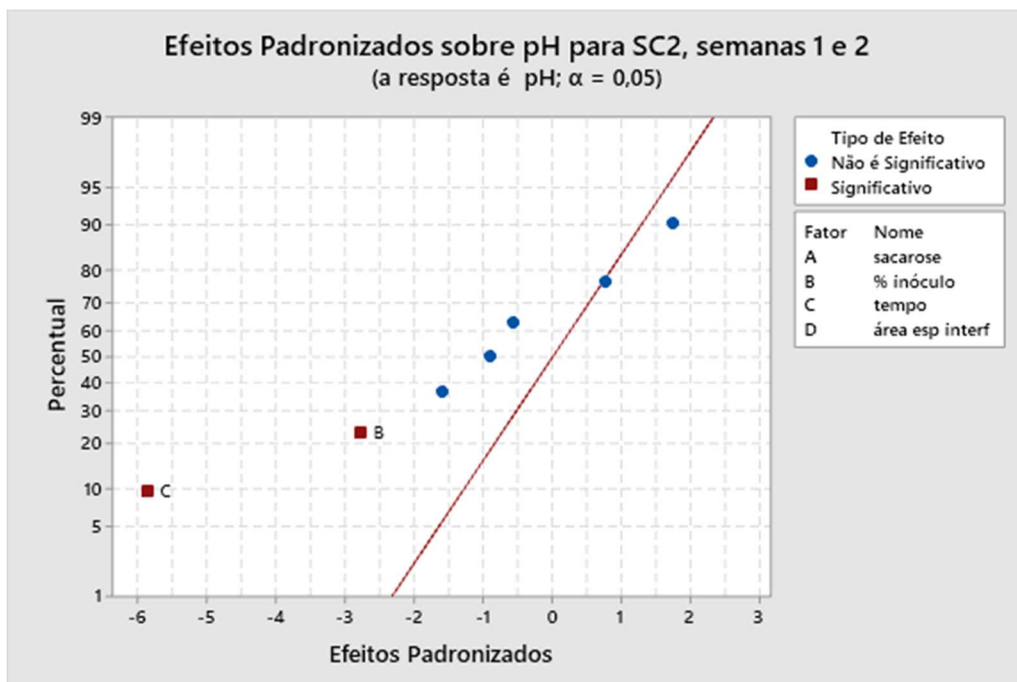


Figura 43 – Efeitos padronizados que indicam a magnitude do impacto dos parâmetros fermentativos sobre pH na média dos blocos para SC2.

No caso do SCOBY SC2, o pH se mostrou sensível apenas ao tempo e a porcentagem de inóculo, o que pode indicar um *starter* com uma viabilidade baixa, não obstante, as concentrações de etanol obtidas para SC2 (tabela 9) foram menores que as concentrações de etanol obtidas para SC1 (tabela 8), resultado oposto ao obtido na etapa de seleção dos SCOBY a serem estudados, indicando alguma alteração na dinâmica fermentativa de SC2.

## Efeitos Padronizados - Acidez Fixa

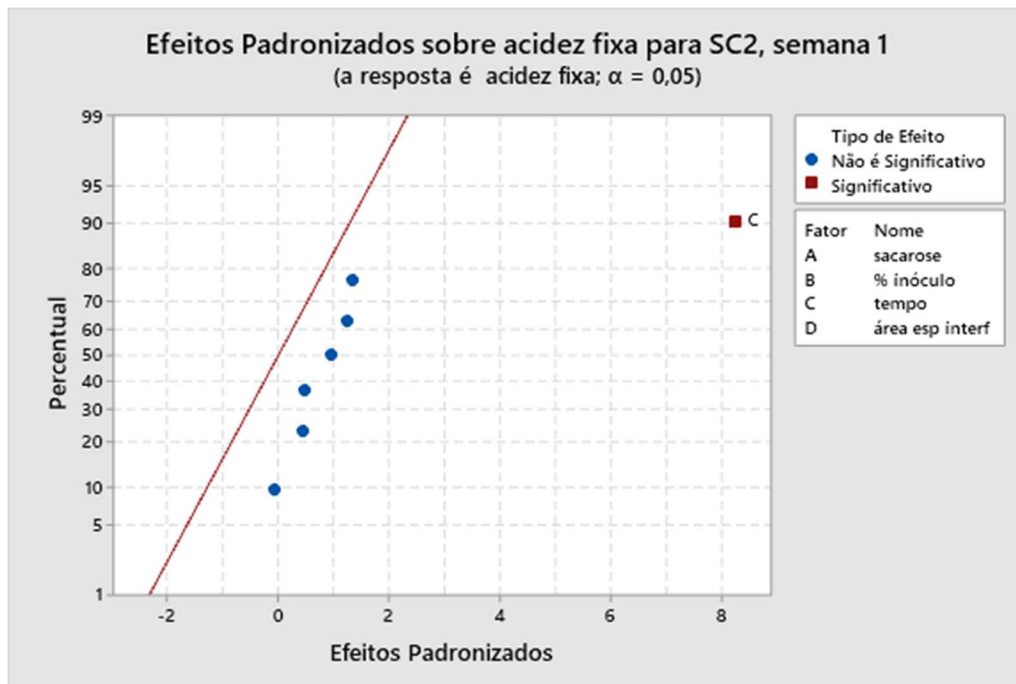


Figura 44 – Efeitos padronizados que indicam a magnitude do impacto dos parâmetros fermentativos sobre acidez fixa no primeiro ciclo para SC2.

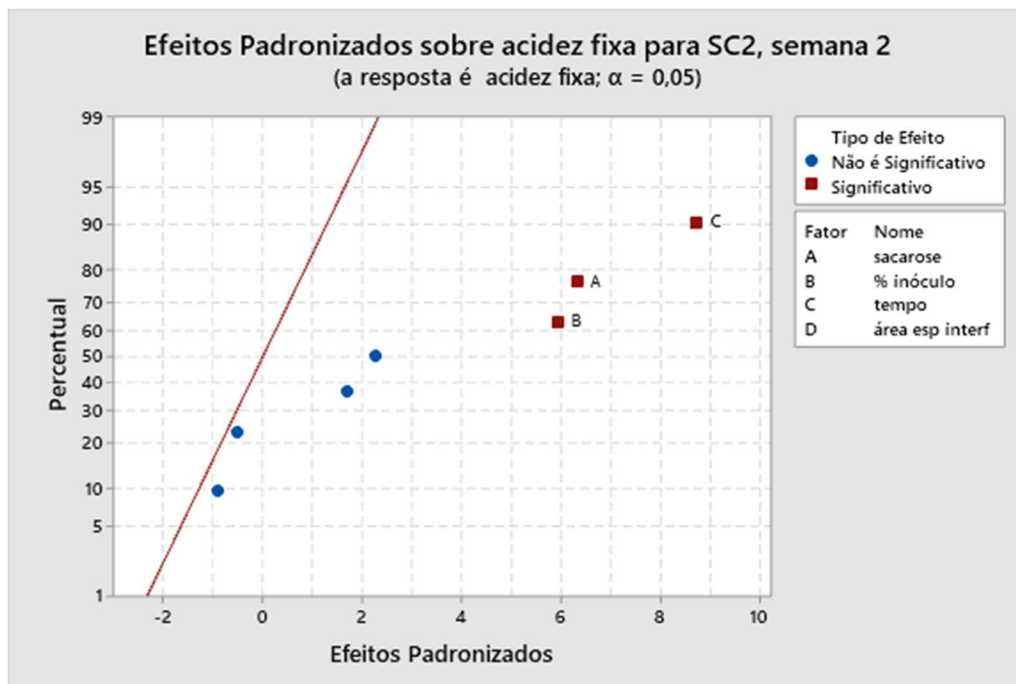


Figura 45 – Efeitos padronizados que indicam a magnitude do impacto dos parâmetros fermentativos sobre acidez fixa no segundo ciclo para SC2.

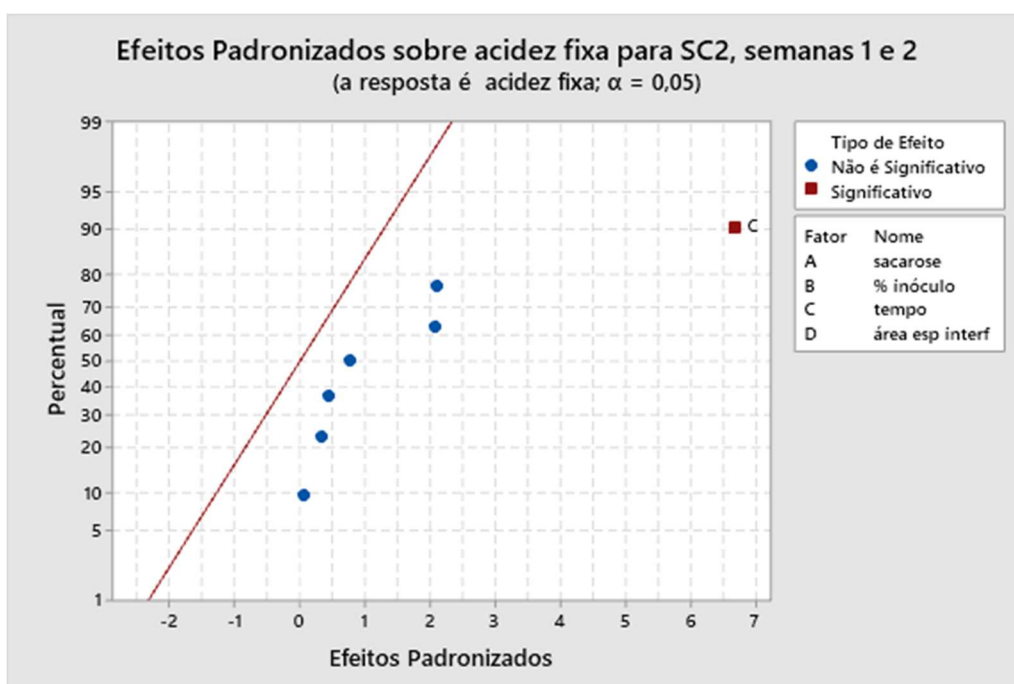


Figura 46 – Efeitos padronizados que indicam a magnitude do impacto dos parâmetros fermentativos sobre acidez fixa na média dos blocos para SC2.

A acidez fixa em SC2 sofre impacto significativo apenas da variável tempo quando computada a média dos blocos, no entanto, no primeiro ciclo, tanto o tempo quanto a quantidade inicial de sacarose e a porcentagem do inóculo utilizada foram significativos na variação da acidez fixa. Essa variação entre os ciclos possivelmente indica uma instabilidade na comunidade microbiana ao longo do tempo, que também foi vista em SC1 bem como relatada na produção comercial por Mas et al. (2022).

## Efeitos Padronizados - Acidez volátil

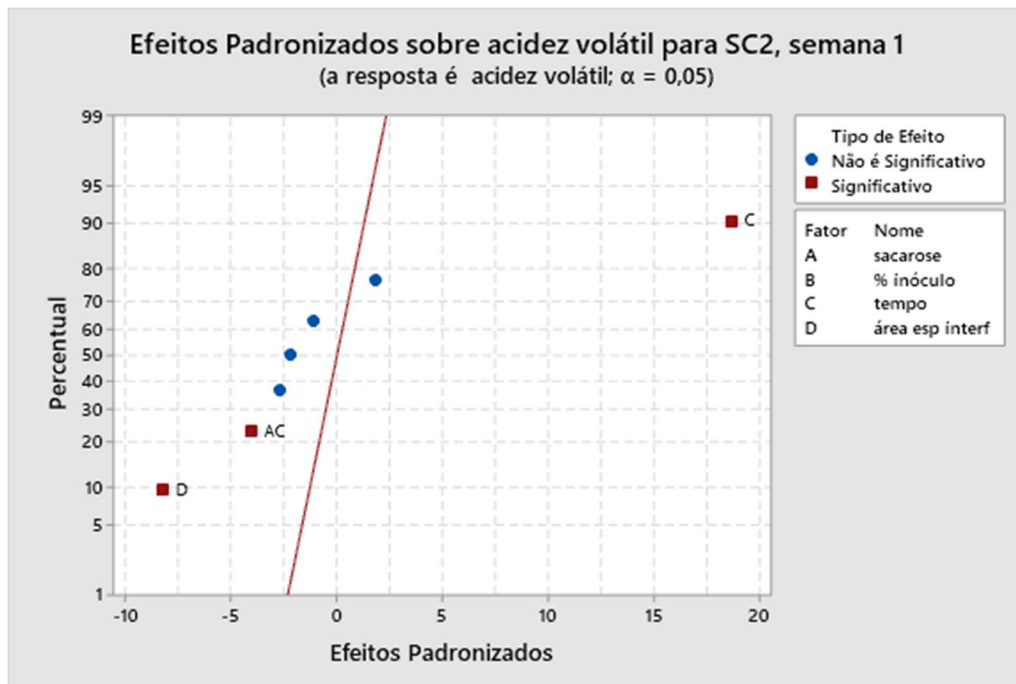


Figura 47 – Efeitos padronizados que indicam a magnitude do impacto dos parâmetros fermentativos sobre acidez volátil no primeiro ciclo para SC2.

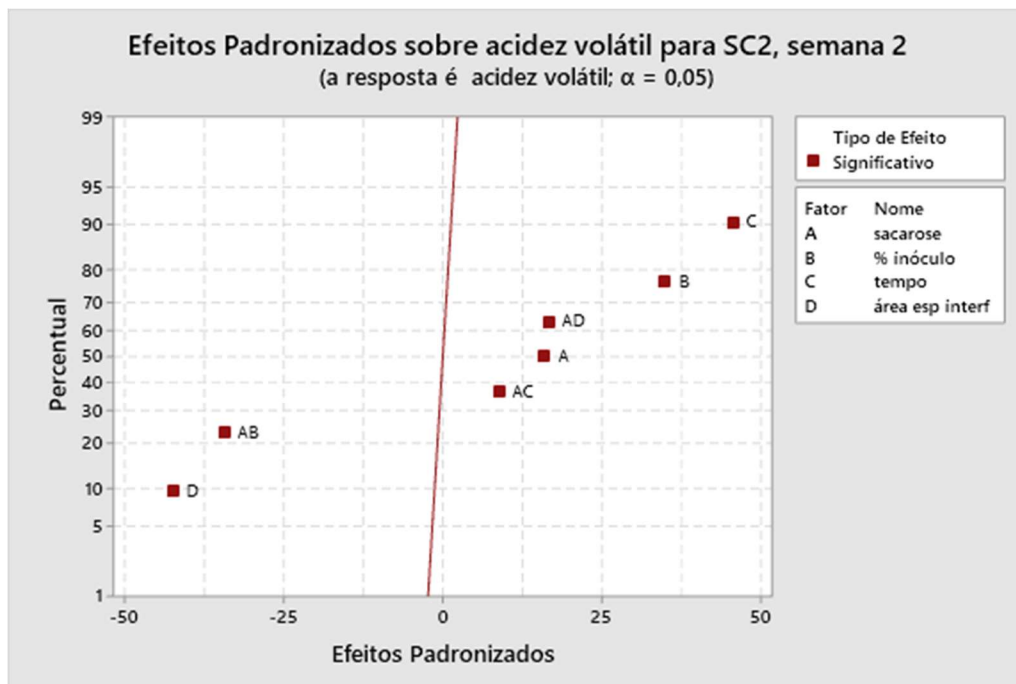


Figura 48 – Efeitos padronizados que indicam a magnitude do impacto dos parâmetros fermentativos sobre acidez volátil no segundo ciclo para SC2.



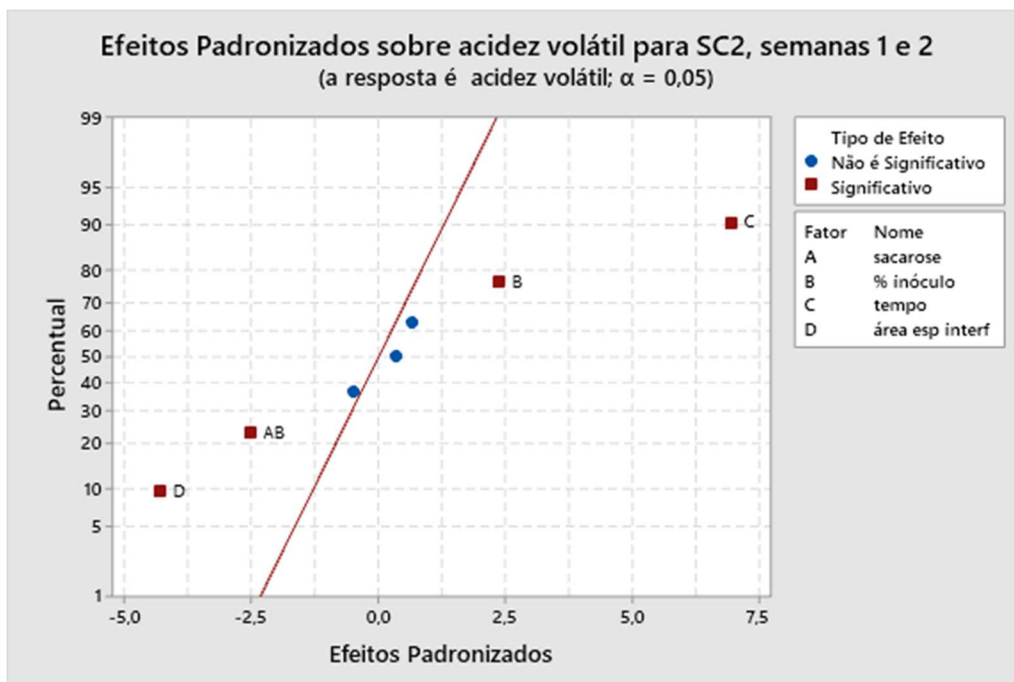


Figura 49 – Efeitos padronizados que indicam a magnitude do impacto dos parâmetros fermentativos sobre acidez volátil na média dos blocos para SC2.

Os resultados das variáveis de maior impacto sobre a acidez volátil em SC2 foram congruentes com aqueles obtidos para SC1 quando verificamos a contribuição à variação positiva da resposta e temos o tempo e a porcentagem do inóculo utilizado, no entanto, para SC2, a área interfacial específica contribuiu de maneira negativa à acidez volátil medida.

Esse resultado é contrário ao esperado pelo aumento da disponibilidade de oxigênio diante da maior área interfacial específica que deveria aumentar a taxa de oxidação de etanol a ácido acético. Vale notar que o impacto da área interfacial específica no primeiro ciclo é bem menor que no segundo ciclo, o que pode estar relacionado à instabilidade da comunidade microbiana de SC2, de fato observou-se a formação de uma película mais fina nos frascos fermentadores no segundo ciclo.

Diante disso levantou-se a hipótese de que houve maior evaporação de voláteis no segundo ciclo de SC2 pois a velocidade de formação da película possivelmente foi menor, permitindo maior troca de gases na superfície de forma que nos frascos com maior área interfacial específica poderia se ter maior escape proporcional do ácido acético formado.

## Efeitos Padronizados - Etanol

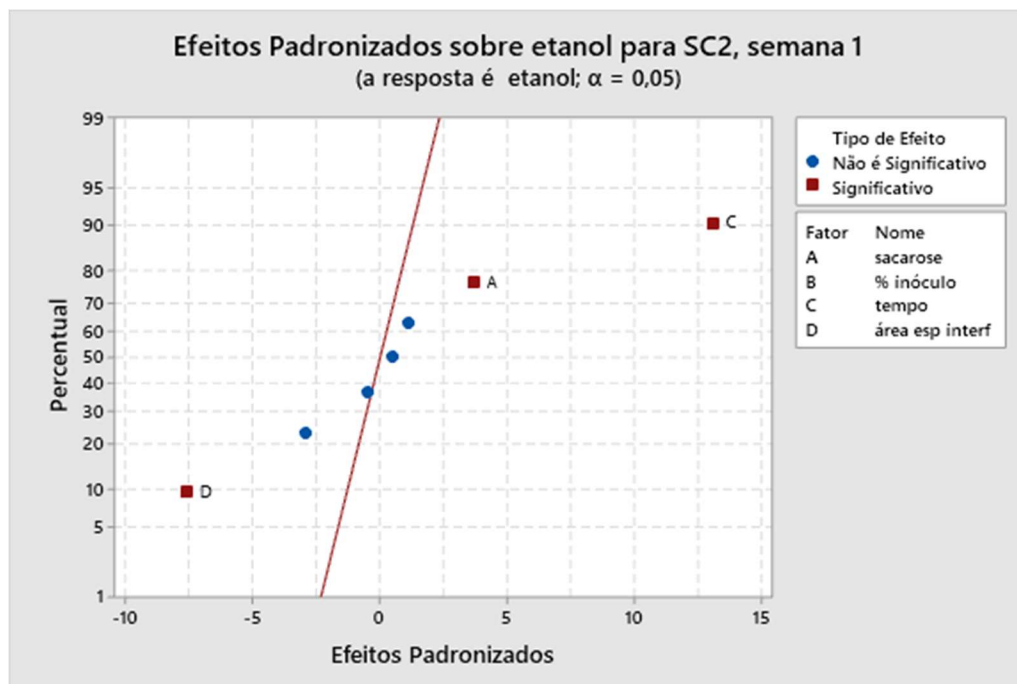


Figura 50 – Efeitos padronizados que indicam a magnitude do impacto dos parâmetros fermentativos sobre etanol no primeiro ciclo para SC2.

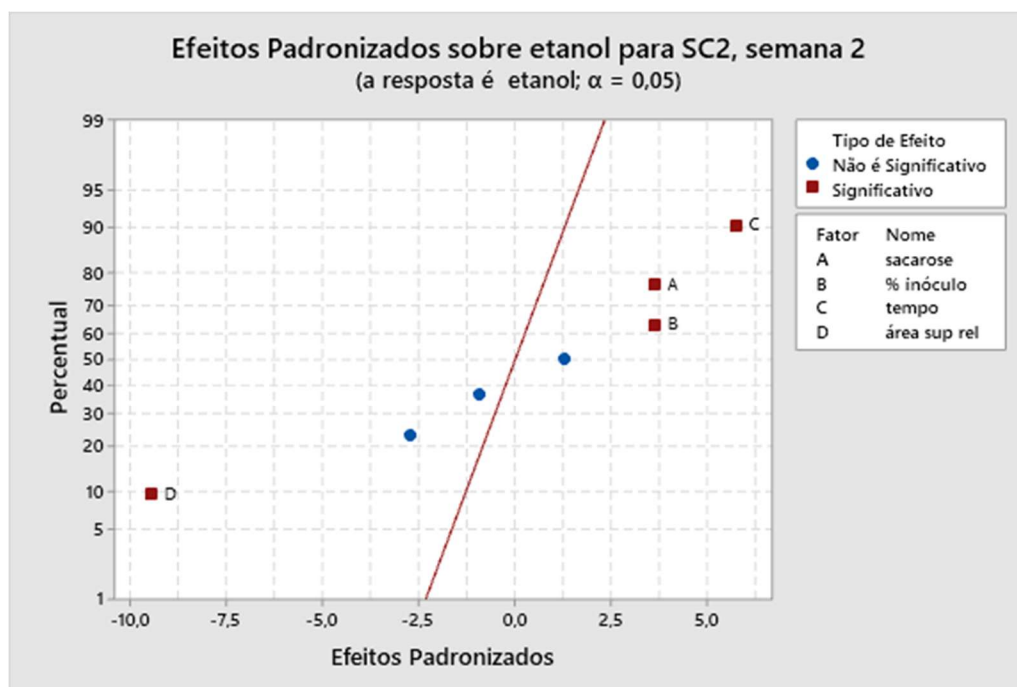


Figura 51 – Efeitos padronizados que indicam a magnitude do impacto dos parâmetros fermentativos sobre etanol no segundo ciclo para SC2.

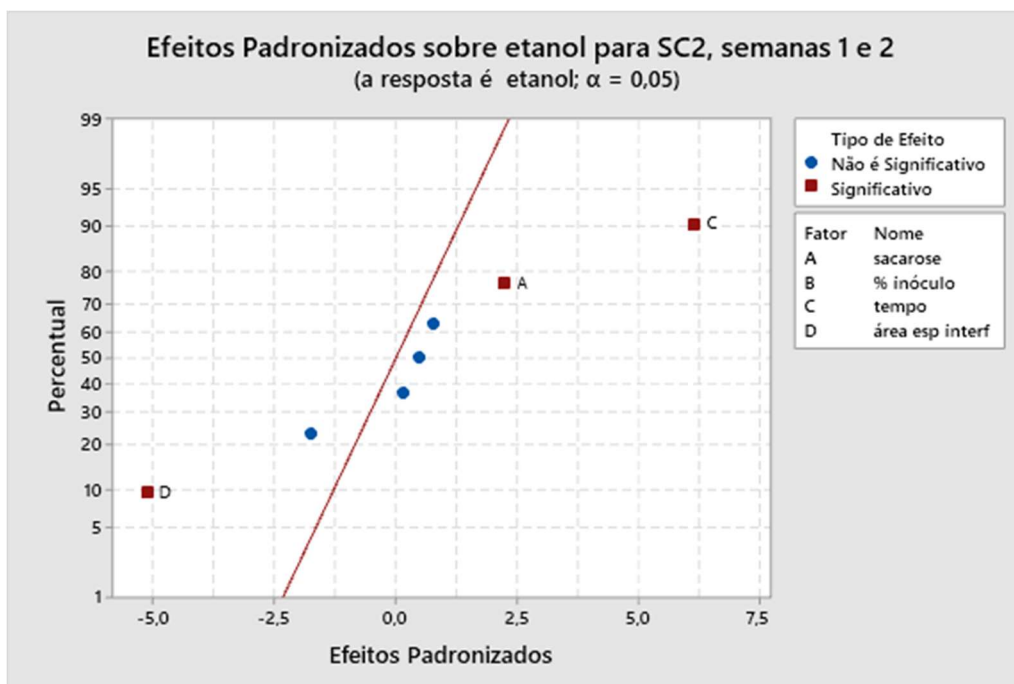


Figura 52 – Efeitos padronizados que indicam a magnitude do impacto dos parâmetros fermentativos sobre etanol na média dos blocos para SC2.

O resultado das variáveis de maior impacto na variação de etanol para SC2 aproxima daquele para SC1, com a quantidade de sacarose inicial impactando positivamente e a área interfacial específica impactando negativamente.

Para SC2 o tempo foi significativo na variação positiva do etanol, resultado que seria esperado para SC1 também, no entanto, vale ressaltar que o experimento de triagem de variáveis possui a limitação de avaliar apenas um intervalo escolhido, que no caso do tempo foi de quatro a oito dias. Como já pudemos observar, as colônias SC1 e SC2 demonstraram certa mudança ao longo dos ciclos, inclusive nos resultados de etanol quando comparadas ao estudo anterior de seleção de SCOBY, dessa forma cada SCOBY também pode apresentar um perfil cinético, com fases de adaptação, crescimento e estabilização diferentes e, portanto, serem afetados pelo tempo de maneiras diferentes no intervalo de estudo.

Além disso, se a hipótese de maior evaporação estiver correta, o impacto da área interfacial específica na diminuição do etanol também se daria pelo escape do mesmo e não por aumento na taxa de oxidação, de fato o impacto da área interfacial específica aumentou no segundo ciclo de SC2, possivelmente pela formação mais lenta de uma película, resultado de um inóculo starter mais fraco no segundo ciclo.

Não obstante, os resultados de etanol do segundo ciclo são em média menores do que do primeiro (tabela 9).

#### 4.3.1. Comparação das variáveis de maior impacto sobre as respostas de SC1 e SC2

Diante de toda a literatura sobre kombucha revisada era de se esperar que cada SCOBY apresentasse resultados diferentes quanto às variáveis com impacto significativo sobre as respostas escolhidas. A tabela 10 dispõe os fatores significativos para cada resposta para cada SCOBY, com sua magnitude e proporcionalidade.

Tabela 10 - Comparação dos efeitos padronizados sobre as respostas de SC1 e SC2. Células em vermelho indicam impacto negativo e células em azul indicam impacto positivo sobre a resposta.

pH			acidez fixa		
fator	efeitos padronizados		fator	efeitos padronizados	
	SC1	SC2		SC1	SC2
sacarose	-	-	sacarose	-	-
% inóculo	5,6	2,8	% inóculo	3,4	-
tempo	18,0	5,9	tempo	10,7	6,7
área int	18,6	-	área int	10,2	-
interações			interações		
sacarose*tempo	2,2	-	sacarose*% inóculo	5,6	-
			sacarose*tempo	3,1	-
acidez volátil			etanol		
fator	efeitos padronizados		fator	efeitos padronizados	
	SC1	SC2		SC1	SC2
sacarose	-	-	sacarose	3,7	2,2
% inóculo	8,2	2,4	% inóculo	-	-
tempo	19,7	7,0	tempo	-	6,2
área int	-	4,3	área int	8,0	5,1
interações			interações		
sacarose*área int	3,0	-	sacarose*área int	2,1	-
sacarose*% inóculo	-	2,5			

De fato, verifica-se que cada SCOBY é sensível de maneira própria às variáveis propostas no estudo, tanto qualitativamente quanto quantitativamente. No entanto, cabe ressaltar a característica do método de triagem de variáveis, que avalia apenas um intervalo escolhido para as variáveis. Neste estudo foram escolhidas de forma a se aproximar dos valores utilizados na indústria de kombucha brasileira.

Avaliando o etanol em conjunto das outras respostas legisladas (acidez volátil e pH), o uso de menores quantidades de sacarose reduziria a formação de etanol e o aumento da área interfacial específica também poderia ajudar no controle de sua concentração, no entanto, um compromisso com um abaixamento controlado do pH teria de ser observado. De modo geral, o uso de menores quantidades de inóculo inicial poderia ser uma estratégia para limitar a diminuição excessiva do pH e o acúmulo de acidez volátil, além disso propiciando um rendimento melhor ao processo. A variável tempo não foi significativa para os dois SCOBY em relação ao etanol, mas foi impactante nas outras respostas, de modo que deve ser tratada com cautela, principalmente em fermentações conduzidas a temperaturas acima de 25°C, de modo que deve ser estudada em cada caso.

## 5. Conclusões

Observando a variação nos resultados de etanol das kombuchas comerciais e o quadro comparativo dos efeitos sobre as respostas de SC1 e SC2 pode-se concluir que existe um grande desafio para um controle industrial na produção tanto do etanol quanto dos outros metabólitos produzidos ao longo da fermentação da kombucha.

A própria triagem de variáveis deve ser considerada com cautela, uma vez que tem se observado variação na comunidade microbiana da kombucha mesmo quando mantidas condições repetidas ao longo dos ciclos de produção, havendo oscilações quantitativas entre as espécies do SCOBY. Dessa maneira, um estudo realizado num determinado momento pode não refletir as condições num outro. Para além disso, o intervalo escolhido para cada variável em estudo deve ser correspondente a fermentações que gerem produtos adequados tanto do ponto de vista legal quanto do ponto de vista sensorial.

De qualquer modo, conhecer as respostas da comunidade microbiana às variações dos parâmetros de fermentação é um instrumento básico de controle nas produções e os planejamentos experimentais podem ajudar nesse objetivo com custos reduzidos.

A utilização de comunidades sintéticas pode resolver questões de controle na produção de etanol e perfil sensorial, mas podem ser vistas como uma deformação da prática tradicional e afastar parte dos consumidores. De qualquer maneira é uma alternativa para a indústria que visa ganhar controle e escala, o que poderia reduzir os custos de produção e popularizar a kombucha nas prateleiras dos mercados, além de permitir o uso de microrganismos que produzam compostos de interesse à saúde com alegações já comprovadas, facilitando a regularização da kombucha como produto benéfico à saúde.

Ainda que a produção de kombucha tradicional não atinja um patamar de controle suficiente para uma padronização entre os lotes de fermentação e dessa forma a solução passe por padronizações posteriores como a retirada do etanol formado e a correção de sabor com açúcares e ácidos, práticas já comuns na indústria de bebidas estabelecida.

## 6. Referências Bibliográficas

Andreson, M., Kazantseva, J., Kuldjäv, R., Malv, E., Vaikma, H., Kaleda, A., Kütt, M. L., & Vilu, R. (2022). Characterisation of chemical, microbial and sensory profiles of commercial kombuchas. *International journal of food microbiology*, 373, 109715. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109715>

Antolak, H., Piechota, D., & Kucharska, A. (2021). Kombucha Tea-A Double Power of Bioactive Compounds from Tea and Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts (SCOBY). *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(10), 1541. <https://doi.org/10.3390/antiox10101541>

Aung, Thinzar & Lee, Won-Heong & Eun, Jong-Bang. (2022). Metabolite profiling and pathway prediction of laver (*Porphyra dentata*) kombucha during fermentation at different temperatures. *Food Chemistry*. 397. 133636. 10.1016/j.foodchem.2022.133636.

Bauer-Petrovska, Biljana & Tozi, Lidija. (2001). Mineral and water soluble vitamin content in the Kombucha drink. *International Journal of Food Science & Technology*. 35. 201 - 205. 10.1046/j.1365-2621.2000.00342.x.

BCIT. Kombucha – A Reference Page for Manufactures and Stakeholders. 2020. Disponível em: <https://www.bcit.ca/applied-research/natural-health-food-products/our-projects/kombucha/>. Acesso em: 07 jun. 2022.

Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-977.

Bishop, P.; Pitts, E.R.; Budner, D.; Thompson-Witrick, K.A. Chemical Composition of Kombucha. *Beverages* 2022, 8, 45. <https://doi.org/10.3390/beverages8030045>

Blanc, Philippe. (1996). Characterization of the tea fungus metabolites. *Biotechnology Letters*. 18. 139-142. 10.1007/BF00128667.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento / Gabinete da Ministra. Instrução Normativa nº 41, de 17 de Setembro de 2019. Estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha em todo o território nacional. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 de Setembro de 2019. Seção 1.

Cardoso, R. R., Neto, R. O., Dos Santos D'Almeida, C. T., do Nascimento, T. P., Pressete, C. G., Azevedo, L., Martino, H. S. D., Cameron, L. C., Ferreira, M. S. L., & Barros, F. A. R. (2020). Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 128, 108782. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108782>

Ceccato-Antonini, S. R. Microbiologia da fermentação alcoólica: a importância do monitoramento microbiológico em destilarias. EdUFSCar, 2010.

Chen, Chinshuh & Liu, B. (2000). Changes in major component of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *Journal of applied microbiology*. 89. 834-9. 10.1046/j.1365-2672.2000.01188.x.

Coton, Monika & Pawtowski, Audrey & Taminiau, Bernard & Burgaud, Gaëtan & Déniel, Franck & Coulloume-Labarthe, L & Fall, Papa & Daube, Georges & Coton, Emmanuel. (2017). Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS microbiology ecology*. 93. 10.1093/femsec/fix048.

Cvetković, Dragoljub & Sinisa, Markov & Djurić, Mirjana & Savic, Dragisa & Velićanski, Aleksandra. (2008). Specific interfacial area as a key variable in scaling-up Kombucha fermentation. *Journal of Food Engineering*. 85. 387-392. 10.1016/j.jfoodeng.2007.07.021.

De Deken, R. H. (1966). The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *J. Gen. Microbiol.* 44, 149–156. doi: 10.1099/00221287-44-2-149

De Filippis, Francesca & Troise, Antonio & Vitaglione, Paola & Ercolini, Danilo. (2018). Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. *Food Microbiology*. 73. 10.1016/j.fm.2018.01.008.

Diez-Ozaeta, I., & Astiazaran, O. J. (2022). Recent advances in Kombucha tea: Microbial consortium, chemical parameters, health implications and biocellulose production. *International journal of food microbiology*, 377, 109783. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109783>

Ferremi Leali, N., Binati, R. L., Martelli, F., Gatto, V., Luzzini, G., Salini, A., Slaghenaufi, D., Fusco, S., Ugliano, M., Torriani, S., & Salvetti, E. (2022). Reconstruction of Simplified Microbial Consortia to Modulate Sensory Quality of Kombucha Tea. *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(19), 3045. <https://doi.org/10.3390/foods11193045>

Fukuda, I. M., Pinto, C. F. F., Moreira, C. D. S., Saviano, A. M., & Lourenço, F. R. (2018). Design of experiments (DoE) applied to pharmaceutical and analytical quality by design (QbD). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54.

Gaggia, F., Baffoni, L., Galiano, M., Nielsen, D. S., Jakobsen, R. R., Castro-Mejía, J. L., Bosi, S., Truzzi, F., Musumeci, F., Dinelli, G., & Di Gioia, D. (2018). Kombucha Beverage from Green, Black and Rooibos Teas: A Comparative Study Looking at



Microbiology, Chemistry and Antioxidant Activity. *Nutrients*, 11(1), 1. <https://doi.org/10.3390/nu11010001>

Harrison, K., & Curtin, C. (2021). Microbial Composition of SCOBY Starter Cultures Used by Commercial Kombucha Brewers in North America. *Microorganisms*, 9(5), 1060. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051060>

Hur, Sun & Lee, Seung & Kim, Young-Chan & Choi, Inwook & Kim, Geun-Bae. (2014). Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food chemistry*. 160C. 346-356. 10.1016/j.foodchem.2014.03.112.

Jayabalan, Rasu & Malbaša, Radomir & Lončar, Eva & Vitas, Jasmina & M., Sathishkumar. (2014). A Review on Kombucha Tea—Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 13. 10.1111/1541-4337.12073.

Kim, D. H., Chon, J. W., Kim, H., & Seo, K. H. (2019). Development of a novel selective medium for the isolation and enumeration of acetic acid Bacteria from various foods. *Food Control*, 106, 106717.

Laureys, David; Britton, Scott; De Clippeleer, Jessika. (2020). Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 78. 10.1080/03610470.2020.1734150.

Li, Ruyi & Xu, Yong-Quan & Chen, Jianxin & Wang, Fang & Zou, Chun & Yin, Junfeng. (2021). Enhancing the proportion of gluconic acid with a microbial community reconstruction method to improve the taste quality of Kombucha. *LWT*. 155. 112937. 10.1016/j.lwt.2021.112937.

Liu, C.-H & Hsu, W.-H & Lee, Fwu-Ling & Liao, C.-C. (1996). The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation. *Food Microbiology*. 13. 407-415. 10.1006/fmic.1996.0047.

Lončar, Eva & Djurić, M. & Malbaša, Radomir & Kolarov, L.J. & Klasnja, Mile. (2006). Influence of Working Conditions Upon Kombucha Conducted Fermentation of Black Tea. *Food and Bioproducts Processing*. 84. 186-192. 10.1205/fbp.04306.

Lončar, Eva & Kanuric, Katarina & Malbaša, Radomir & Djuric, Mirjana & Milanović, Spasenija. (2014). Kinetics of saccharose fermentation by Kombucha. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*. 20. 345-352. 10.2298/CICEQ121113016L.

Lončar, S. & Malbaša, Radomir & A., Kolarov. (2001). Metabolic activity of tea fungus on molasses as a source of carbon. *Acta periodica technologica*.

Malbaša, Radomir & Lončar, Eva & Djurić, M. & Došenović, I.. (2008). Effect of sucrose concentration on the products of Kombucha fermentation on molasses. *Food Chemistry - FOOD CHEM*. 108. 926-932. 10.1016/j.foodchem.2007.11.069.

Malbaša, Radomir & Lončar, Eva & Djurić, M.. (2008). Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. *Food Chemistry - FOOD CHEM*. 106. 1039-1045. 10.1016/j.foodchem.2007.07.020.

Marsh, Alan & O'Sullivan, Orla & Hill, Colin & Ross, R & Cotter, Paul. (2014). Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food microbiology*. 38. 171-8. 10.1016/j.fm.2013.09.003.

Mas, P., Tran, T., Verdier, F., Martin, A., Alexandre, H., Grandvalet, C., & Tourdot-Maréchal, R. (2022). Evolution in Composition of Kombucha Consortia over Three Consecutive Years in Production Context. *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(4), 614. <https://doi.org/10.3390/foods11040614>

May, A., Narayanan, S., Alcock, J., Varsani, A., Maley, C., & Aktipis, A. (2019). Kombucha: a novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem. *PeerJ*, 7, e7565. <https://doi.org/10.7717/peerj.7565>

Mendelson, C., Sparkes, S., Merenstein, D. J., Christensen, C., Sharma, V., Desale, S., ... & Hutkins, R. (2023). Kombucha tea as an anti-hyperglycemic agent in humans with diabetes—a randomized controlled pilot investigation. *Frontiers in Nutrition*, 10, 1190248.

Mordor Intelligence. Kombucha market - growth, trends, and forecast (2023 - 2028). Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/kombucha-market>. Acesso em: 04 fev. 2023.

Neffe-Skocińska, Katarzyna & Sionek, Barbara & Scibisz, Iwona & Kołożyn-Krajewska, Danuta. (2017). Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. *CyTA - Journal of Food*.

Nguyen, Phuong & Nguyen, Huong & Le, Phu. (2015). 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*. 64. 1149-1155. 10.1016/j.lwt.2015.07.018.

Nummer, Brian. (2013). Kombucha Brewing Under the Food and Drug Administration Model Food Code: Risk Analysis and Processing Guidance. *Journal of environmental health*. 76. 8-11.

Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (2000), AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA, Official Method 942.15.

Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (2005), AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA, Official Method 945.08.

Reiss, Jürgen. (1994). Influence of Different Sugars on the Metabolism of the Tea Fungus. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*. 198. 258-261. 10.1007/BF01192606.

Reva, Oleg & Zaets, Iryna & Ovcharenko, Leonid & Kukharenko, Olga & Shpylova, Switlana & Podolich, Olga & de Vera, Jean-Pierre & Kozyrovska, Natalia. (2015). Metabarcoding of the kombucha microbial community grown in different microenvironments. *AMB Express* ISSN: 2191-0855.

Savary, Océane & Mounier, Jerome & Thierry, Anne & Poirier, Elisabeth & Jourden, Julie & Maillard, Marie-Bernadette & Penland, Marine & Decamps, Christophe & Coton, Emmanuel & Coton, Monika. (2021). Tailor-made microbial consortium for Kombucha fermentation: Microbiota-induced biochemical changes and biofilm

formation. *Food Research International*. 147. 110549.  
10.1016/j.foodres.2021.110549.

Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1 Suppl), 215S–217S.  
<https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.215S>

Sievers, Martin & Lanini, Cristina & Weber, Adrien & Schuler-Schmid, Ursula & Teuber, Michael. (1996). Microbiology and Fermentation Balance in a Kombucha Beverage Obtained from a Tea Fungus Fermentation. *Systematic and Applied Microbiology*. 18.  
10.1016/S0723-2020(11)80420-0.

Silvia Alejandra Villarreal Soto, Sandra Beaufort, Jalloul Bouajila, Jean-Pierre Souchard, Thierry Renard, et al.. Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. *Process Biochemistry*, 2019, 83, pp.44-54.  
(10.1016/j.procbio.2019.05.004). (hal-02292194)

Soares, Marcelo & Lima, Marieli & Schmidt, Vivian. (2021). Technological aspects of Kombucha, its applications and the symbiotic culture (SCOBY), and extraction of compounds of interest: A literature review. *Trends in Food Science & Technology*. 110.  
10.1016/j.tifs.2021.02.017.

Sreeramulu, Guttapadu & Zhu, Yang & Knol, Wieger. (2000). Kombucha Fermentation and Its Antimicrobial Activity. *Journal of agricultural and food chemistry*. 48. 2589-94.  
10.1021/jf991333m.

Talebi, Mohsen & Frink, Lillian & Patil, Rahul & Armstrong, Daniel. (2017). Examination of the Varied and Changing Ethanol Content of Commercial Kombucha Products. *Food Analytical Methods*. 10. 10.1007/s12161-017-0980-5.

Tran, Thierry & Grandvalet, Cosette & Verdier, François & Martin, Antoine & Alexandre, Hervé & Tourdot-Maréchal, Raphaëlle. (2020). Microbiological and technological parameters impacting the chemical composition and sensory quality of kombucha. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 19. 1-21.  
10.1111/1541-4337.12574.

Troitino, C. Kombucha 101: Demystifying The Past, Present And Future Of The Fermented Tea Drink. Forbes, 1 Feb. 2017. Disponível em: <https://www.forbes.com/sites/christinatroitino/2017/02/01/kombucha-101-demystifying-the-past-present-and-future-of-the-fermented-tea-drink/?sh=7d9175a84ae2>. Acesso em: 04 fev. 2023.

Villarreal Soto, Silvia & Beaufort, Sandra & Bouajila, Jalloul & Souchard, Jean-Pierre & Taillandier, Patricia. (2018). Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of Food Science*. 83. 580-588. 10.1111/1750-3841.14068.

Villarreal Soto, Silvia & Bouajila, Jalloul & Pace, Mauro & Leech, John & Cotter, Paul & Souchard, Jean-Pierre & Taillandier, Patricia & Beaufort, Sandra. (2020). Metabolome-microbiome signatures in the fermented beverage, Kombucha. *International Journal of Food Microbiology*. 333. 108778. 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108778.

Vīna, I., Semjonovs, P., Linde, R., & Deniņa, I. (2014). Current evidence on physiological activity and expected health effects of kombucha fermented beverage. *Journal of medicinal food*, 17(2), 179–188. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0031>

Vitas, Jasmina & Vukmanović, Stefan & Malbaša, Radomir & Tepić Horecki, Aleksandra. (2019). Influence of process temperature on ethanol content in kombucha products obtained by fermentation of flotated must effluent. *Acta Periodica Technologica*. 2019. 311-315. 10.2298/APT1950331V.

Wang, Shuai & Zhang, Liming & Qi, Libo & Liang, Huipeng & Lin, Xinping & Li, Shengjie & Yu, Chenxu & Ji, Chaofan. (2020). Effect of synthetic microbial community on nutraceutical and sensory qualities of kombucha. *International Journal of Food Science & Technology*. 55. 10.1111/ijfs.14596.