

KOMBUCHA: ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA E CRESCIMENTO MICROBIOLÓGICO

Data de aceite: 01/03/2023

Vinícius Azrael Sinésio Alexandre da Silva

Graduando de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG/CDSA

Yasmine Valadares de Oliveira

Graduanda de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG/CDSA

Carla de Fátima de Oliveira Barbosa

Graduanda de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG/CDSA

Igor Pereira da Silva

Graduando de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG/CDSA

Graciele Silva Santana

Graduanda de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG/CDSA

Thayres Mirely Aires de Araújo

Graduanda de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG/CDSA

Jean César Farias de Queiroz

Orientador, Dr., Professor da disciplina Enzimologia e Tecnologia da Fermentação da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG/CDSA

RESUMO: Dentre os métodos mais antigos da preservação de alimentos está a fermentação, um processo químico que ocorre na ausência do gás oxigênio, ou seja, uma via de produção anaeróbica. Contudo, o processo fermentativo que ocorre na produção do Kombucha envolve uma combinação de fermentação alcoólica, láctica e acética. Nesse sentido essa pesquisa busca demonstrar as análises físico-químicas e de crescimento microbiológico, realizado através de um processo de fermentação *in vitro* em laboratório acadêmico. O crescimento microbiológico das células produtoras de ácido acético, foi medida durante o período de 06 à 18 de dezembro de 2022, através da pesagem da

massa seca do *Scoby*, cálculo da densidade e pesagem após o procedimento de secagem do filtro utilizado na filtração do produto formado. Por meio dessa pesquisa, pode-se concluir que o Kombucha se desenvolveu em escala laboratorial, sendo possível realizar análises de crescimento microbiológico e físico-químico. No período de tempo da pesquisa, houve uma variação nos valores de crescimento microbiológico devido a acidificação do meio. No entanto, observou-se que ocorreu uma competição no meio gerando enzimas produtoras de etanol inviabilizando o crescimento de bactérias.

PALAVRAS-CHAVE: Kombucha. Fermentação. *Scoby*.

1 | INTRODUÇÃO

Dentre os métodos mais antigos da preservação de alimentos está a fermentação, um processo químico que ocorre na ausência do gás oxigênio, ou seja, uma via de produção anaeróbica. Contudo, o processo fermentativo que ocorre na produção do Kombucha envolve uma combinação de fermentação alcoólica, láctica e acética, visto que

[...] É tradicionalmente preparado pela fermentação do chá preto açucarado com uma cultura simbiótica de leveduras e bactérias. Acredita-se que esta bebida tenha se originado na China há mais de 2.000 anos, embora haja muitos relatos históricos de que esta bebida foi consumida em países como Rússia, Alemanha e Oriente Médio também. Em muitos países esta bebida é produzida em larga escala para uso comercial, bem como em condições domésticas. Apesar de ser uma bebida fermentada, o sabor do chá Kombucha é considerado satisfatório e não acrimonioso, embora levemente ácido e levemente alcoólico, semelhante ao sabor da cidra de maçã. À medida que a fermentação progride, o sabor do chá de Kombucha muda de um sabor agradavelmente frutado, azedo, levemente e espumante para um sabor suave de vinagre, aumentando assim a aceitabilidade do consumidor do sabor e outros aspectos sensoriais da bebida pelo consumidor [...] (WATAWANA et al, 2015, p. 1, tradução nossa)¹.

Segundo o Ministério da Agricultura e Abastecimento do Brasil (BRASIL, 2019, p.13) o Kombucha é definido como uma “bebida fermentada obtida através da respiração aeróbia e fermentação anaeróbia do mosto obtido pela infusão ou extrato de *Camellia sinensis* e açúcares por cultura simbiótica de bactérias e leveduras microbiologicamente ativas (*SCOBY*)”. Durante o processo de fermentação ocorrem várias mudanças bioquímicas que afetam tanto os compostos nutricionais como as propriedades do produto final, como o tempo de fermentação, o substrato, a temperatura e o pH.

Nesse contexto é possível salientar que, devido as variadas propriedades funcionais,

1 [...] It is traditionally prepared by fermenting sugared black tea with a symbiotic culture of yeast and bacteria. This beverage is thought to have originated in China over 2000 years ago, while there are many historical reports of this beverage being consumed in countries such as Russia, Germany, and the Middle East as well. In many countries this beverage is produced in large-scale for commercial use as well as in domestic conditions. Despite being a fermented beverage, the flavor of Kombucha tea is considered to be satisfactory and nonacrimonious, though mildly acidic and mildly alcoholic, similar in taste to apple cider. As the fermentation progresses, the taste of Kombucha tea changes from a pleasantly fruity, sour, lightly, and sparkling flavor to a mild vinegar-like taste, thus increasing the consumer acceptability of the flavor and other sensory aspects of the beverage [...] (WATAWANA et al, 2015, p. 1).

antioxidantes e antibacterianas, o Kombucha vem se popularizando e ganhando espaço devido a sua multiplicidade de benefícios relacionados à saúde. “Sabe-se que os efeitos benéficos desta bebida são atribuídos à presença de produtos metabólicos liberados no caldo durante a fermentação, embora a maior parte dos benefícios à saúde seja devido ao seu potencial de eliminação de radicais” (WATAWANA et al, 2015, p. 4, tradução nossa)².

Apesar de existirem muitos relatos baseados em experiências sobre o Kombucha, observa-se que nos últimos tempos houve uma crescente produção científica baseada em evidências que demonstram os efeitos terapêuticos desse chá tanto em análises *in vivo* quanto *in vitro*. Nesse sentido essa pesquisa busca demonstrar as análises físico-químicas e de crescimento microbiológico, realizado através de um processo de fermentação *in vitro* em laboratório acadêmico.

2 | METODOLOGIA

A produção do material analisado teve início no Laboratório de Biologia Molecular e Celular em conjunto com o Laboratório de Hidráulica localizados no campos do CDSA, UFCG – PB. Para a preparação do mosto, foram pesados 30g de sacarose e 3g de chá verde a Granel em uma balança de precisão. O chá verde foi submerso em 125 ml de água mineral a uma temperatura de 80°C e deixado infundir por 5 minutos.

Ao término do tempo, a mistura foi filtrada e transferida para um balão Erlenmeyer de 500 ml. Com o material em temperatura ambiente adicionamos 30g de sacarose. O *Scoby* utilizado para o processo fermentativo foi dividido em 24 partes e cada uma delas foi pesada. A fermentação aconteceu em tubos de ensaio de plástico de 15 ml esterilizados, onde foram adicionados 5 ml do chá, 5 ml do líquido de chá start e 1 pedaço do *Scoby*.

Os tubos de ensaio foram dispostos em duas estantes, na qual cada uma continha 12 tubos. As análises foram feitas em duplicata. O pH foi medido utilizando um pHmetro de bancada calibrado com solução tampão pH 7,0. O número de Brix foi determinado utilizando um refratômetro. A densidade foi determinada utilizando microtubos *ependorf* de 1,5 ml, na qual eram pesados, introduzidos 1ml do produto formado, retirada a diferença do peso do *ependorf* e calculada da densidade.

A pesquisa teve duração de 12 dias, iniciando-se no dia 06 e terminando no dia 18 de dezembro de 2022, tendo suas observações diárias sempre nos horários de 16 horas. Todos os dias os materiais para análise tinham seus volumes contabilizados, passavam por um processo de filtragem e os filtros contendo massa seca e o *Scoby* formado eram levados para uma estufa a 60°C durante um período de 24 horas.

2 [...] The beneficial effects of this beverage are known to be attributed to the presence of the metabolic products released into the broth during the fermentation, although most of the health benefits are hypothesized to be due to its radical scavenging potential [...] (WATAWANA et al, 2015, p. 4).

3 | RESULTADO E DISCUSSÕES

Um dos parâmetros fundamentais para a produção de alimentos é a ausência de microrganismos patogênicos. Segundo Hur (2014) e Leonarski (2020) um dos fatores que inibem o crescimento desses microrganismos é o $\text{pH} < 4,2$. O pH do experimento proposto estabeleceu-se em 3,495 como demonstrado na Tabela 01 e na Figura 01, estando dentro dos parâmetros trazidos nas literaturas.

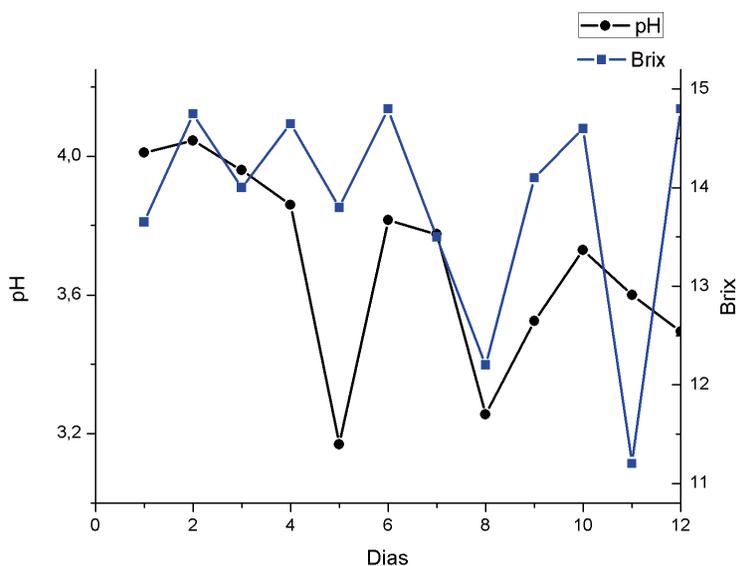


Figura 01 – Variação do ph com consumo da sacarose ao longo de 12 dias

O crescimento microbiológico das células produtoras de ácido acético, foi medida durante o período de 06 à 18 de dezembro de 2022, através da pesagem da massa seca do *Scoby*, cálculo da densidade e pesagem após o procedimento de secagem do filtro utilizado na filtração do produto formado.

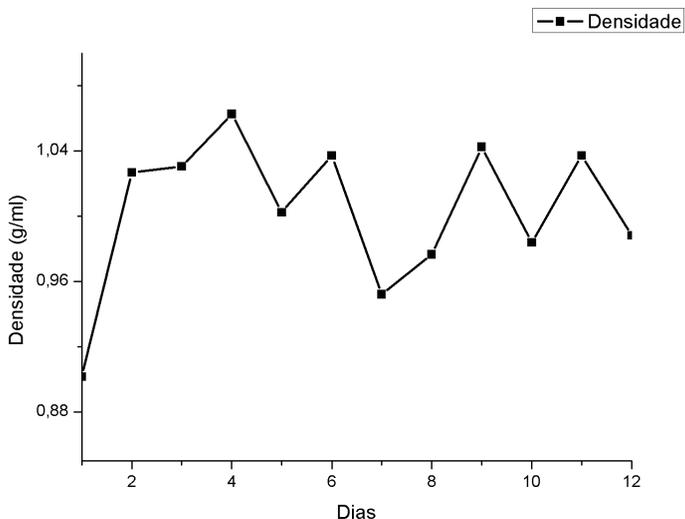


Figura 02 – Variação da densidade durante o período de fermentação da Kombucha

A mediação da densidade demonstra a quantidade de células em gramas para cada ml do produto formado. Podemos observar que ao longo do tempo de fermentação ocorrem flutuações nos valores, entre 0,9015 g/ml e 1,0627 g/ml como demonstrado na Figura 02.

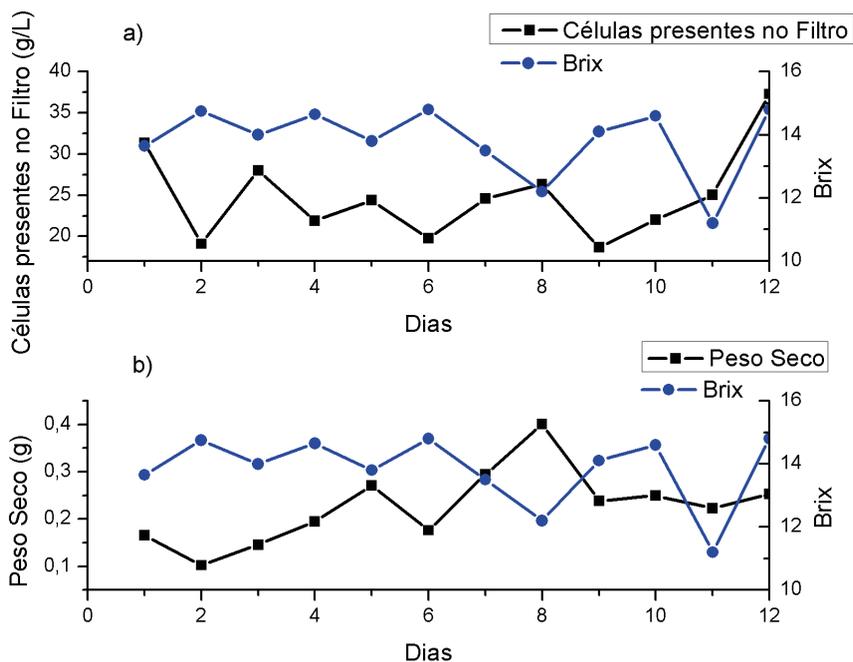


Figura 03 – Comparação do crescimento microbológico do peso seco do *S. cerevisiae* e da massa seca presente no filtro

A Figura 03, demonstra que o processo fermentativo ocorre com êxito. O *Scoby* é um conjunto de diversos microrganismos, na qual dependendo dos fatores do meio, alguns podem se desenvolver de forma mais eficientes que os demais. May (*et al.*, 2019) demonstra que quando adicionamos o chá *start*, o processo de degradação da sacarose acontece de forma cooperativa e competitiva, gerando ácido acético, glutamato, etanol, dióxido de carbono (CO₂) e celulose.

Uma das hipóteses para a variação dos valores apresentados na Figura 03; gráfico a, diz respeito a acidificação do meio, ocorrendo uma competição entre os microrganismos presentes, na qual a medida que é formado ácido acético, glutamato e etanol o pH tende a diminuir e inviabiliza o crescimento de outros microrganismos, facilitando o desenvolvimento da levedura.

A segunda hipótese é que a medida que ocorre uma competição no meio, a sacarose adicionada é quebrada pelas enzimas invertases geradas por leveduras, nas quais gera um biofilme dificultando a respiração celular, acidificando o meio e formando metabólitos antimicrobianos (MAY *et al.*, 2019).

A terceira hipótese corrobora com May (*et al.*, 2019) e Leonarski (2020) a qual afirma que o dimensionamento do meio interfere na formação do produto e em recipientes de pequenas proporções é possível observar que na falta de fontes de carbono as leveduras metabolizam etanol e o utilizam como alimento, inviabilizando o crescimento celular de outros microrganismos.

Uma quarta hipótese para essa variação é que em dez dias os microrganismos ainda estavam se adaptando ao meio e posteriormente entraram em fase logarítmica de crescimento como demonstrado no Figura 03; gráfico a. Nos dias 11 e 12, isso demonstra que talvez a cultura necessite de mais tempo para fermentação.

A Figura 03; gráfico b, demonstra que o crescimento do *Scoby* se iniciou no 3º dia, onde atingiu seu ápice no dia 8 pesando 0,4008g com a diminuição do seu peso e se manteve constante até o dia 12 no qual apresentou o peso de 0,2527g como demonstrado na Tabela 01.

Dias	pH	Brix	Células do Filtro	Densidade	Peso do <i>Scoby</i>
0	4,01	13,65	31,35	0,9015	0,16525
4	3,86	14,65	21,9	1,0627	0,19495
7	3,525	14,1	18,7	0,9521	0,23845
12	3,495	14,8	37,3	0,9883	0,2527

Nota: A tabela acima apresenta valores médios obtidos após análise em duplicata.

Tabela 01 – Resultados do processo fermentativo da Kombucha ao longo de 12 dias

4 | CONCLUSÃO

Por meio dessa pesquisa, pode-se concluir que o Kombucha se desenvolveu em escala laboratorial, sendo possível realizar análises de crescimento microbiológico e físico-químico. No período de tempo da pesquisa, houve uma variação nos valores de crescimento microbiológico devido a acidificação do meio. No entanto, observou-se que ocorreu uma competição no meio gerando enzimas produtoras de etanol inviabilizando o crescimento de bactérias.

De acordo com a literatura, não foi realizado uma análise sensorial sistemática do chá de Kombucha, bem como pesquisas relativas aos benefícios à saúde e aos aspectos relativos a segurança, podendo auxiliar na produção de uma bebida consumível que possa substituir outras bebidas carbonatadas. Estas são áreas relevantes para pesquisas futuras.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 41, DE 17 DE SETEMBRO DE 2019. Diário Oficial [da] União, Nº 181, quarta-feira, 18 de setembro de 2019.

HUR, S.J., LEE, S.Y., KIM, Y.C., CHOI, I., KIM, G.B. **Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods.** *Food Chem.* v. 160, 2014, p. 346–356. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814614005159>>. Acesso em: 16 jan. 2023.

LEONARSKI, Eduardo. **Produção de Bebida Tipo Kombucha e Celulose Bacteriana Utilizando Subproduto da Acerola como Matéria-Prima.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2020, p. 83.

MAY, A.; NARAYANAN, S.; ALCOCK, J.; VARSANI, A.; MALEY, C.; AKTIPIS, A. **Kombucha: a novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem.** 2019. Disponível em: **PeerJ 7:e7565 DOI 10.7717/peerj.7565.** Acesso em: 16 jan. 2023.

WATAWANA, Mindani I. *et al.* Health, Wellness, and Safety Aspects of the Consumption of Kombucha”. **Journal of Chemistry**, v. 2015. Article ID 591869, p. 1-11.