

POTENCIAL ANTIOXIDANTE E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO KOMBUCHÁ

Cláudia Zubiolo Perieto
claudia.perieto@ifs.edu.br

Érika Cristina Teixeira dos Anjos Brandao
erika.brandao@ifs.edu.br

Johnata de Matos Moreira
johnatadematos@hotmail.com

Resumo – Kombuchá é 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 (BRASIL, 2019). Seu consumo está relacionado a hábitos de vida saudáveis e controle e prevenção de doenças. O objetivo do presente trabalho foi produzir a bebida e realizar a caracterização físico-química e microbiológica. Os parâmetros analisados foram o pH, acidez, compostos fenólicos, açúcares redutores e açúcares redutores totais, em diferentes tempos de fermentação. Além disso, realizou-se o isolamento e a identificação das principais leveduras envolvidas no processo. A bebida foi preparada em laboratório e realizou-se o acompanhamento cinético a cada sete dias, totalizando 35 dias de fermentação. Como resultado do estudo observou-se um decréscimo do pH e aumento da acidez ao longo da fermentação, a conversão do açúcar não redutor à açúcar redutor, bem como um aumento do teor de compostos fenólicos ao longo do processo. Foram obtidos 23 isolados de leveduras, sendo as que exibiram maior nível de confiança no método, as pertencentes a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, e gêneros como, por exemplo, *Dekkera*, *Zygosaccharomyces*. Desse modo, se concluiu que a bebida passa a ter melhores propriedades funcionais após a atividade aeróbia e fermentativa dos microrganismos.

Palavras-Chave: Açúcares, fermentação, leveduras, Kombuchá.

INTRODUÇÃO

A kombuchá é uma bebida que vem sendo popularizada, devido a suas propriedades nutricionais. É produzida a partir da fermentação e atividade aeróbia realizada por culturas complexas de bactérias e leveduras em um substrato açucarado a base de chá obtido da planta *Camellia sinensis*. Em sua composição estão presentes alguns probióticos, como bactérias acéticas, compostos fenólicos presentes no chá, açúcares, ácidos orgânicos, etanol, vitaminas hidrossolúveis e uma variedade de micronutrientes produzidos durante a fermentação. (CHEN; LIU, 2000).

As bactérias produtoras de ácido acético (BAA) e leveduras osmofílicas são os microrganismos dominantes durante a fermentação do Kombuchá. Eles desenvolvem uma película celulósica (biofilme), que fica flutuando no líquido fermentado, onde permanecem embebidos e podem ser transferidos para propagar o inóculo (JAYABALAN, *et al.*, 2008).

Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, possuindo ação antioxidante (ANGELO; JORGE, 2007). O pH da kombucha decresce ao longo do processo fermentativo devido à produção de ácidos orgânicos. A cor do líquido vai ficando mais clara, em relação à cor original do chá, devido às alterações que ocorrem na conformação dos complexos fenólicos resultantes da ação de enzimas microbianas sobre os polifenóis (LIU *et al.*, 1996). O presente trabalho teve como objetivo analisar parâmetros físico-químicos,

microbiológicos e verificar o potencial antioxidante da bebida ao longo do processo fermentativo.

MATERIAL E MÉTODOS

A bebida fermentada foi preparada utilizando-se chá preto como substrato, juntamente com açúcar cristal, nas seguintes proporções: 1,5 % de chá preto, 10 % de açúcar cristal e um litro de água filtrada. A mistura foi aquecida, até fervura, e após 5 minutos, foi deixada sob infusão, até atingir temperatura ambiente. Em seguida, Acrescentou-se a cultura simbiótica de bactérias e leveduras (SCOBY), usando 10 % da película. Além disso, foi adicionado 50ml de chá de arranque (bebida anteriormente fermentada contendo os microrganismos). O produto foi fermentado por 35 dias e a cada 7 dias foram retiradas alíquotas para realização das análises. Desse modo, foi possível acompanhar e caracterizar todo o processo fermentativo da bebida. No preparo do kombuchá foram usados os preceitos das boas práticas de fabricação (BPF). Foram realizadas as análises de pH, acidez, açúcares redutores (AR), açúcares redutores totais (ART) e compostos fenólicos, bem como o isolamento e identificação das leveduras para cada intervalo de fermentação (7 dias). O isolamento das leveduras, foi feito segundo técnicas padrão de diluição da amostra e plaqueamento em meio de cultura Ágar extrato de malte (YM) (glicose 1%, peptona 0,5%, extrato de malte 0,3%, extrato de levedura 0,3%, ágar 2% pH 5), suplementado com antibiótico para evitar crescimento de bactérias. As colônias características de leveduras foram contadas pelo método de contagem padrão em placas, determinando-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). A cultura pura destes isolados foi preservada no meio de isolamento original em

tubos inclinados e armazenados à 4°C com óleo mineral. Na figura 1, observa-se a visão geral do experimento após montagem e incubação, além das placas referentes ao processo de isolamento das leveduras.

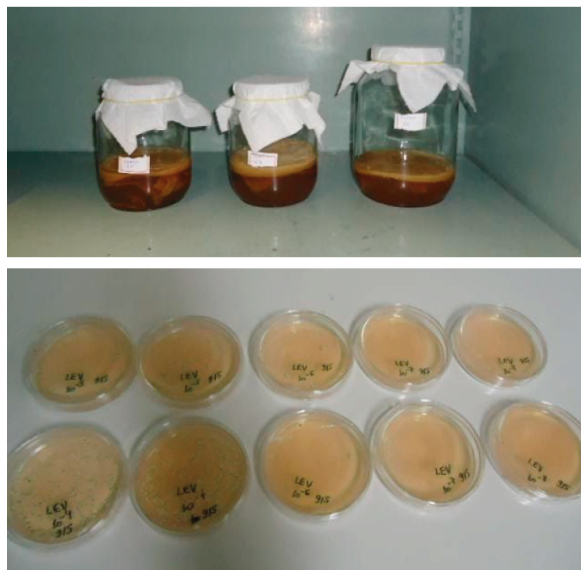


Figura 1. Visão geral do experimento e isolamento das leveduras em placas de Petri.

A análise de (pH) foi realizada através de leitura direta, usando pHmetro de bancada e o índice de acidez foi determinado através de titulação com NaOH, 0,1 mol/L. O teor de AR e ART e compostos fenólicos foram quantificados por espectrofotometria, sendo respectivamente pelos métodos do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e de Folin-Ciocalteu. A identificação das leveduras foi realizada pela técnica de cromatografia com espectrometria de massa (MALDI-TOF). Os parâmetros pH, acidez e o isolamento das leveduras foram analisados em tempo real, a cada sete dias de fermentação, armazenando em congelamento as outras alíquotas, de cada tempo de fermentação, para realização das demais análises físico-químicas em um único momento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores obtidos para os parâmetros pH e índice de acidez estão representados na figura 2:

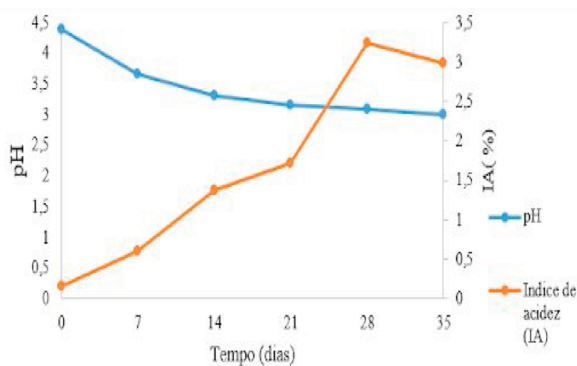


Figura 2. Valores de pH e índice de acidez ao longo da fermentação do kombuchá.

Em relação ao pH, observou-se um decréscimo ao longo do tempo, apresentando no início da fermentação (tempo 0 ou controle) o pH de 4,39 e após 35 dias, o valor de 3,0. Kallel *et al.* (2012) apresentou valores de pH abaixo do encontrado neste trabalho para os tempos zero e quinze dias, sendo respectivamente, 3,8 e 3,03, utilizando o mesmo substrato para produção do kombuchá. Os valores de pH aqui encontrados, encontram-se dentro da faixa permitida, conforme a instrução normativa que regulamenta a bebida (IN. n° 41, MAPA, 2019), a partir do sétimo dia de fermentação, onde a norma estabelece valores de pH entre 2,5 e 4,2. Observou-se um aumento no índice de acidez (%) ao longo da fermentação, estando em acordo com Chakravorty (2016). A acidez elevada ocorre devido à produção de vários ácidos orgânicos durante a fermentação, sendo os principais o ácido acético e o ácido glucônico.

O aumento da quantidade de açúcar redutor (AR) observada na figura 3, indica que, durante o processo fermentativo, as leveduras e bactérias acéticas, hidrolisaram os açúcares não-redutores presente no chá base, convertendo-os em glicose e frutose. Observou-se também que até o sétimo dia, a hidrólise dos açúcares totais (ART) aconteceu de forma lenta. Após esse período, até o décimo quarto dia, houve um período de hidrólise significativo, demonstrando uma grande atividade das leveduras e bactérias acéticas nesse período da fermentação, conforme apresentados na figura 03.

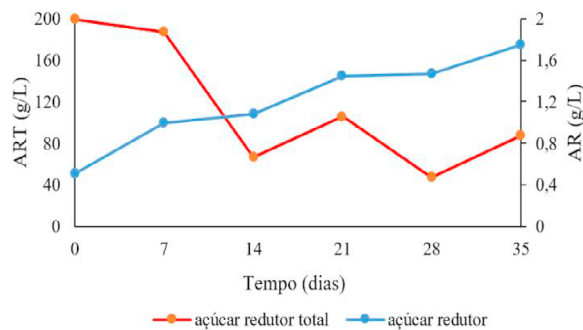


Figura 3. Teor de açúcar redutor (AR) e açúcar total (ART) em g/L, ao longo da fermentação.

Segundo Dufresne e Farnworth (2000), durante o processo de fermentação da kombucha, os dissacarídeos sofrem decomposição em monossacarídeos sob influência de enzimas e ácidos, isto é, açúcares simples. As moléculas de sacarose se ligam ao sítio ativo da enzima em que são transformados em glicose e frutose, que continuam a se converter em outros produtos por meio de uma série de reações consecutivas e paralelas. Portanto, a mistura de reação altera sua composição (qualitativa e quantitativa) durante a fermentação. Essa hidrólise inicial da sacarose é atribuída à ação das leveduras. Com a progressão da fermentação, as leveduras utilizam o açúcar de modo anaeróbico para produzir etanol, enquanto as bactérias acéticas utilizam o açúcar e o etanol para produzir ácido glucônico e ácido acético, respectivamente.

No tempo zero (controle), a concentração de fenólicos totais, expressos em equivalente de ácido gálico, foi de 0,341 g/l, conforme a tabela 1:

Tempo (dias)	CONCENTRAÇÃO (G/L)
TEMPO ZERO (CONTROLE)	0,341
7	0,361
21	0,373
35	0,374

Tabela 01. Teor de fenólicos totais, em g/L, ao longo da fermentação

A maior concentração de compostos fenólicos foi detectada no tempo de 35 dias, com concentração de 0,374 g/l, representando um aumento de 9,6%.

Kallel et al. (2012), apresentaram uma concentração de fenólicos totais de 1,01 g/L no tempo zero (controle) e após 15 dias a concentração foi de 1,12 g/L, sendo superior ao encontrado no presente estudo.

A contagem de células viáveis de leveduras está de acordo com a literatura. Na bibliografia pesquisada, registraram-se contagem de leveduras em torno de 106 - 107. Neste trabalho, foram obtidas contagens de células viáveis de leveduras por volta de 107 – 108 UFC/mL. Na figura 4, observa-se o crescimento das leveduras em $\log(\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1})$. Também registramos resultados semelhantes ao da literatura, quanto ao número de cepas diferentes de cada tipo de levedura.



Figura 4. Média da contagem total ($\log_{10} \text{UFC mL}^{-1}$) de leveduras da película celulósica de kombuchá, sob fermentação em cinco diferentes tempos de cultivo.

Podemos observar, pela figura 4, duas fases do crescimento das leveduras no meio fermentado: a fase exponencial e a fase estacionária. A fase lag, de adaptação ao meio, não foi observada porque geralmente ocorre entre 6 a 24 horas e não realizamos isolamento nesse período. A fase exponencial durou cerca de 7 dias, conforme a literatura prediz e a fase estacionária foi observada no restante do período do experimento, até o 35º dia. Nessa fase os açúcares já estão escassos, por isso há pouca divisão celular. Não foi observada a fase de declínio neste experimento, pois um tempo maior de incubação seria necessário. Nesse experimento, foram obtidos 23 isolados de leveduras. Os isolados de leveduras foram identificados seguramente até nível de espécie (isolados com score > 2,000) pela técnica de cromatografia com espectrometria de massa (MALDI-TOF). Aqueles com score entre 1,700 – 1,999 apresentam identificação

mais confiável (>95%) em nível de gênero e os isolados com score < 1,700 não apresentaram identificação confiável (Tabela 2), portanto apenas seis isolados foram identificados a nível de espécie com confiança > 95% e todos pertencem à espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Outros quatro isolados apresentaram identificação do gênero a um nível confiável, estes pertencendo aos gêneros *Dekkera*, *Zygosaccharomyces* e *Saccharomyces* (Tabela 2). Isso geralmente acontece quando a biblioteca de dados do equipamento MALDI-TOF não é vasta o suficiente para a identificação daquele grupo de microrganismo específico, por isso outro método complementar deve ser utilizado futuramente para maior precisão na identificação dos isolados de leveduras obtidos neste trabalho.

As leveduras que já foram isoladas de kombucha, em outros trabalhos da literatura, pertencem a várias espécies e majoritariamente aos seguintes gêneros: *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida*, *Torulospira*, *Kloeckera/Hanseniaspora*, *Pichia*, *Torula*, *Torulopsis*, *Mycotorula* e *Mycoderma* (JAYABALAN et al. 2014).

Vários autores têm estudado a diversidade de leveduras encontradas no kombucha, Watawana et al. (2016) registraram *Zygosaccharomyces* como a levedura predominante (84%), mas também encontraram *Dekkera* (6%) e *Pichia* (5%). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é uma das mais importantes, pois é utilizada como cultura inicial devido a sua alta eficiência. No entanto, o consórcio entre *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* tem sido utilizado nas indústrias em processos de fermentação mista (vinho, tequila, dentre outros) a fim de aumentar o perfil aromático e reduzindo os parâmetros indesejados (VILARREAL SOTO et al., 2018).

Salientamos que a maioria das leveduras citadas na literatura da área foram encontradas nesse experimento e estas se encontram armazenadas no laboratório, sendo parte do banco inicial de microrganismos do IFS/campus Aracaju, podendo ser utilizadas em trabalhos futuros.

Cód. do isolado	Identificação	Score
Lev1	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	1,581
Lev2	<i>Dekkera bruxellensis</i>	1,376
Lev3	<i>Dekkera bruxellensis</i>	1,674
Lev4	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,435
Lev5	<i>Lactobacillus casei</i>	1,316
Lev6	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	1,432
Lev7	<i>Dekkera bruxellensis</i>	1,665
Lev8	<i>Dekkera bruxellensis</i>	1,619
Lev9	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,082
Lev10	<i>Dekkera bruxellensis</i>	1,566
Lev11	<i>Zygosaccharomyces bailli</i>	1,846
Lev12	<i>Dekkera bruxellensis</i>	1,744
Lev13	<i>Zygosaccharomyces bailli</i>	1,846
Lev14	<i>Zygosaccharomyces bailli</i>	1,887
Lev15	<i>Lactobacillus ruminis</i>	1,321
Lev16	<i>Arthrobacter pyridinolis</i>	1,355
Lev17	Não identificada	-
Lev18	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,221
Lev18	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,965
Lev20	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,052
Lev21	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,03
Lev22	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,029
Lev23	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,28

Tabela 2. Identificação das leveduras obtidas nos cinco tempos de fermentação do Kombucha.

CONCLUSÕES

A caracterização do kombuchá produzido mostra que a bebida possui potencial antioxidante e valores compatíveis com a literatura para os demais parâmetros, demonstrando características nutricionais satisfatórias, para os pontos em estudo. A atividade dos microrganismos é observada ao longo da cinética fermentativa e demonstra a complexidade destas interações, sendo estes os responsáveis pela variação benéfica dos parâmetros analisados. Os principais gêneros de leveduras identificados foram *Dekkera*, *Zygosaccharomyces* e *Saccharomyces*, sendo bastante evidente a espécie *Saccharomyces cerevisiae*.

REFERÊNCIAS

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n.1, 2007.

BRASIL. Instrução normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 14 set. de 2019, Seção 1, nº 181, p.13.

CHAKRAVORTY, S.; BHATTACHARYA, S.; CHATZINOTAS, A.; CHAKRABORTY, W.; BHATTACHARYA, D.; GACHHUI R. KOMBUCHA Tea fermentation: microbial and biochemical dynamics. **Int. J. food microbiol** v. 220, p. 63–72, 2016.

CHEN, C.; LIU, B.Y. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, 89, 834–839, 2000.

DUFRESNE, C.; FARNWORTH, E. Tea, Kombucha, and health: a review. **Food Research International**, [s. l.], v. 33, n. 6, p. 409-421, 2000.

JAYABALAN, R. et al. Changes in free radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. **Food Chemistry**, v. 109, n. 1, p. 227-234, 2008.

KALLEL, L. et al. Insights into the fermentation biochemistry of kombucha teas and potential impacts of kombucha drinking on starch digestion. **Food research international**, v. 49, n. 1, p. 226-232, 2012.

LIU, C. -H. et al. The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 13, n.6, p. 407-415, 1996.

VILLARREAL-SOTO, S.A.; BEAUFORT, S.; BOU AJILA, J. ; SOUCHARD, J. ; TAILLANDIER, P. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review **Journal of Food Science**, v. 83, n.3, 2018.