



Análise microbiológica de chá kombucha

Luiza Vettorazzi Lopez

Projeto de Final de Curso

Orientadores:

Prof^a. Karen Signori Pereira, D.Sc.

Thaís Fernandes Justo, Eng. Alimentos.

Agosto/2017

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE CHÁ KOMBUCHA

Luiza Vettorazzi Lopez

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheira de Alimentos.

Aprovado por:

Camilla Pires de Souza, M.Sc.

Carlos André Vaz Junior, D.Sc.

Lauro Luís Martins Medeiros de Melo, D.Sc.

Orientado por:

Prof^a. Karen Signori Pereira, D.Sc.

Thaís Fernandes Justo.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Agosto de 2017

Lopez, Luiza Vettorazzi.

Análise microbiológica de chá kombucha/ Luiza Vettorazzi Lopez. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2017.

vii, 35 p.;il.

(Projeto Final) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2017.

Orientadores: Karen Signori Pereira e Thaís Fernandes Justo.

1. Kombucha. 2. Chá fermentado. 3. Probióticos. 4. Projeto Final. (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Karen Signori Pereira, D.Sc.,Thaís Fernandes Justo, Eng. Alimentos.

Dedico este trabalho aos meus pais, Nanci e Emílio,
que tornaram possível cada conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, por todo apoio e dedicação, que me ajudaram a traçar a minha trajetória.

Agradeço a minha irmã, Sandra, que sempre cuidou de mim, me ajudou e me ensinou muito ao longo da minha vida.

Agradeço à minha sobrinha e afilhada, Júlia, pelos momentos preciosos que me fortalecem.

Agradeço ao meu namorado, Thiago, pelo carinho, pelo apoio, e por estar sempre ao meu lado durante toda a graduação, nos momentos de conquista e de preocupação.

Agradeço à minha orientadora, Karen Signori, pelos conhecimentos transmitidos ao longo curso e por ter contribuído positivamente pelo meu interesse pela microbiologia. Agradeço também pela oportunidade de me envolver nesse projeto, que foi prazeroso de trabalhar e me trouxe muito aprendizado.

Agradeço à minha co-orientadora e colega querida de faculdade, Thaís Justo, pelo carinho e pela dedicação e paciência durante o projeto.

Agradeço aos meus amigos da faculdade, que tornaram a graduação mais divertida e proveitosa. Em especial, agradeço à Mariana, Andrezza e Louíse, pela amizade, pelos estudos em grupo e pelos momentos de diversão, dentro e fora da faculdade.

Resumo do Projeto de Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenharia de Alimentos.

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE CHÁ KOMBUCHA

Luiza Vettorazzi Lopez

Agosto, 2017

Orientadores: Prof^a. Karen Signori Pereira, D.Sc.

Thaís Fernandes Justo.

Atualmente, consumidores do Brasil e do mundo têm buscado hábitos saudáveis. Com isso, a procura por alimentos que tenham propriedades funcionais tem aumentado. Um exemplo de bebida que pode estar relacionada com benefícios à saúde é o kombucha, uma bebida oriental produzida a partir da fermentação de chá adoçado por uma simbiose entre bactérias e leveduras. Estes micro-organismos presentes no chá fermentado agem como probióticos, uma vez que são capazes de agir benéficamente no trato intestinal. As bactérias mais encontradas no kombucha são as acéticas e as lácticas, já as leveduras são variadas. A análise microbiológica desse produto é importante para avaliar a viabilidade dos micro-organismos do fermento no chá já fermentado e verificar se há presença de contaminantes microbianos. O presente estudo teve como objetivo avaliar a estabilidade microbiológica de chá kombucha comercial de cinco sabores distintos (maçã com canela, manga, gengibre com limão siciliano e mel, maracujá e melancia com gengibre) durante o tempo de estocagem de 90 dias, bem como verificar a sua inocuidade. As amostras foram analisadas quanto à presença de *Salmonella* spp. seguindo a metodologia da ISO 6579:2007 e de coliformes termotolerantes seguindo a metodologia preconizada pela APHA utilizando o método do número mais provável. Além disso, foi feita a contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos, utilizando dois meios com composição e valores de pH distintos, *Plate Count Agar* (PCA) e *Orange Serum Agar* (OSA), e foi medido o valor de pH das cinco amostras. As análises foram feitas nos tempos zero, 15, 45, 60 e 90 dias. Não foi verificada presença de *Salmonella* spp. em 25 ml para todas as amostras e coliformes termotolerantes foi menor que 3,0 NMP/ml. O valor de pH nas cinco amostras reduziu ao longo dos 90 dias. A contagem total no meio OSA foi maior que o PCA para quatro amostras, devido ao pH ser próximo ao do chá fermentado, e apresentaram a contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos estável entre 15 e 90 dias, sendo os primeiros 15 dias os mais críticos. Conclui-se então, que houve a viabilidade dos micro-organismos do fermento ao longo do tempo de estocagem de 90 dias, apesar da instabilidade nos primeiros 15 dias, bem como que as amostras estavam de acordo com a legislação vigente para chá e produtos similares.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Produção mundial de chá, em 2010.....	5
Figura 2: Produção de chá dos cinco países maiores produtores, em 2013.....	5
Figura 3 Consumo per capita e produção de chá pronto para consumo no Brasil, entre 2010 e 2015.	6
Figura 4: Estruturas das principais catequinas encontradas no chá.	7
Figura 5: Recipiente contendo o chá e o inóculo do kombucha (SCOBY).	9
Figura 6: Diagrama proposto para a preparação do kombucha.	10
Figura 7: Foto das amostras de chá kombucha comerciais utilizadas no trabalho...	17
Figura 8: Esquema geral da análise para contagem total dos micro-organismos aeróbios mesófilos em placa.....	18
Figura 9: Contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos no PCA (<i>Plate Count Agar</i>) e no OSA (<i>Orange Serum Agar</i>) das cinco amostras ao longo do tempo de estocagem (90 dias).....	22
Figura 10: Foto da garrafa de kombucha ao abrir.	24
Figura 11: Bactérias B1, B2, B3 e B4 presentes no chá kombucha.....	25
Figura 12: Leveduras isoladas do chá kombucha.	27
Figura 13: Película formada na superfície da amostra com sabor maracujá.....	27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. Alimentos funcionais	2
2.2. Chás.....	4
2.3. Kombucha	7
2.3.1. A Bebida	7
2.3.2. Os micro-organismos do kombucha	11
2.3.3. O processo de fermentação.....	14
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivo geral	16
3.2. Objetivos específicos	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1. Amostras de chá kombucha.....	17
4.2. Análise microbiológica.....	17
4.3. Medição de pH	19
4.4. Análise estatística	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
6. CONCLUSÃO	28
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
ANEXOS	35

1. INTRODUÇÃO

A procura por alimentos funcionais tem aumentado de maneira expressiva nos últimos anos, devido à busca por hábitos alimentares mais saudáveis. A demanda por esses alimentos vem estimulando novas pesquisas sobre a caracterização desses produtos.

Existem diversos tipos de alimentos funcionais, podendo se destacar os que contêm probióticos. Os probióticos são micro-organismos vivos com capacidade de atuar de forma benéfica no trato intestinal (Brasil, 2002). Esses micro-organismos também podem exercer funções positivas nos produtos alimentícios conferindo sabor e aroma, entre outras características (Bourdichon et al., 2012).

O kombucha é um chá fermentado, originário da Ásia, que surgiu em 220 a.C e é amplamente consumido até os dias atuais. É caracterizado por utilizar um fermento composto por bactérias e leveduras (Kumar; Joshi, 2016). Os micro-organismos presentes nesse chá se relacionam através de uma simbiose complexa, resultando em metabólitos importantes para conferir os atributos sensoriais característicos. O kombucha é uma bebida gaseificada que apresenta gosto levemente ácido e adocicado. O gosto ácido fica mais acentuado de acordo com a duração da fermentação (Jayabalan et al., 2014).

A caracterização microbiana do kombucha é bastante variável, contendo, principalmente, bactérias acéticas e leveduras de espécies diversas (Teoh et al., 2004). A associação desses micro-organismos em aerobiose resulta na redução do pH, devido à produção de ácidos orgânicos (Jayabalan et al., 2010). Esse pH baixo atua como uma barreira para o crescimento de micro-organismos deterioradores e patógenos (Battikh et al., 2012), colaborando para garantir a segurança microbiológica do produto.

O kombucha não possui um padrão de qualidade e identidade estabelecido no Brasil, ou seja, os micro-organismos usados na sua preparação não são regulamentados. Deste modo, a análise microbiológica do kombucha é importante para avaliar a viabilidade dos micro-organismos desejáveis (fermento) e verificar se há presença de contaminantes microbianos, sendo estes os principais objetivos do presente trabalho.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Alimentos funcionais

A Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 18, de 30 de abril 1999 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define que alegação de propriedade funcional “é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano”. Com isso, o alimento funcional é aquele que possui alguma substância com alegação de propriedade funcional, ou seja, que apresenta alguma função metabólica ou fisiológica, além da nutrição básica (Brasil, 1999a).

Cada alimento funcional novo no mercado precisa ser registrado pela empresa que deseja comercializá-lo. Para que o produto seja rotulado como alimento funcional, é necessário que haja evidência científica à comprovação de alegação de propriedade funcional (Brasil, 1999b). No Japão, foi implementado em 1991 o “Alimentos para uso específico de saúde” (*Foods for Specified Health Use - FOSHU*) para regulamentar os alimentos denominados funcionais (Vidal et al., 2012).

De acordo com a RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002 da ANVISA, as substâncias com alegação de propriedade funcional são classificadas em carotenoides, fitoesteróis, flavonoides, fosfolípidos, organosulfurados, polifenóis, probióticos (Brasil, 2002). Há diversos produtos que contêm naturalmente essas substâncias, tais como ervas, leguminosas, frutas, verduras e legumes. Outros alimentos recebem adição dessas substâncias com o objetivo de aumentar o valor agregado do produto.

Estudos indicam que os alimentos funcionais podem estar relacionados com diversos efeitos benéficos ao organismo. O Quadro 1 mostra alguns exemplos desses efeitos relacionados a alimentos e aditivos.

Quadro 1: Ingredientes alimentares comuns e seus atributos funcionais.

Ingredientes com potencial funcional	Função
Ácido graxo Ômega-3, Extrato de gengibre, colágeno	Prevenção artrite
Ácido g-aminobutírico, pectina	Anti-hipertensivo
Cálcio, boro e fosfolípido de caseína	Prevenção de osteoporose
β -caroteno, extratos de alho, esteróides, compostos fenólicos, "psyllium"	Combate a problemas cardíacos
Fibra de soja, bactérias probióticas, pectina	Redução do colesterol
Alho, chá verde, bactérias probióticas, "psyllium"	Anti-carcinógenos
Licopeno, frutas e verduras contendo anti-oxidantes	Alteração do dano oxidativo
Bactérias probióticas, zinco ionizado, extrato de "elderberry"	Agentes anti-infecciosos

FONTE: Adaptado de Sanders, 1998.

Tais alimentos benéficos à saúde só foram definidos como "alimentos funcionais" em meados dos anos 1980 no Japão. O consumo desses alimentos existe antes mesmo de receberem essa definição (Dufresne; Farnworth, 2001, Morais et al., 2009).

Os alimentos probióticos pertencem a um grupo de alimentos funcionais bastante estudado nos últimos anos. Os probióticos são "micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo" (Brasil, 2002). De acordo com a RDC nº 2/2002, é necessário que haja uma quantidade de micro-organismos viáveis até o prazo de validade para garantir que o produto tenha a ação da alegação.

Alguns produtos fermentados como iogurte com adição de bifidobactérias, leite fermentado, kefir e kombucha são exemplos de alimentos probióticos. Os micro-organismos presentes nesses alimentos resultam em características sensoriais favoráveis, além de promover possíveis benefícios à saúde. Alguns desses benefícios podem ser: efeito anticarcinogênico, melhor absorção de nutrientes, alívio da constipação intestinal, redução dos níveis de colesterol, alívio dos sintomas da intolerância à lactose e melhora do sistema imunológico, devido ao estímulo de

produção de anticorpos além da exclusão competitiva de patógenos e produção de substâncias antimicrobianas (Oliveira et al., 2002; Saad, 2006).

2.2. Chás

A palavra “chá” refere-se, internacionalmente, à infusão de folhas de *Camelia sinensis*, anteriormente denominada *Thea sinensis* (Lima, 2008). No Brasil, a Portaria nº 544, de dezembro de 1998 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), define o chá pronto para o consumo como:

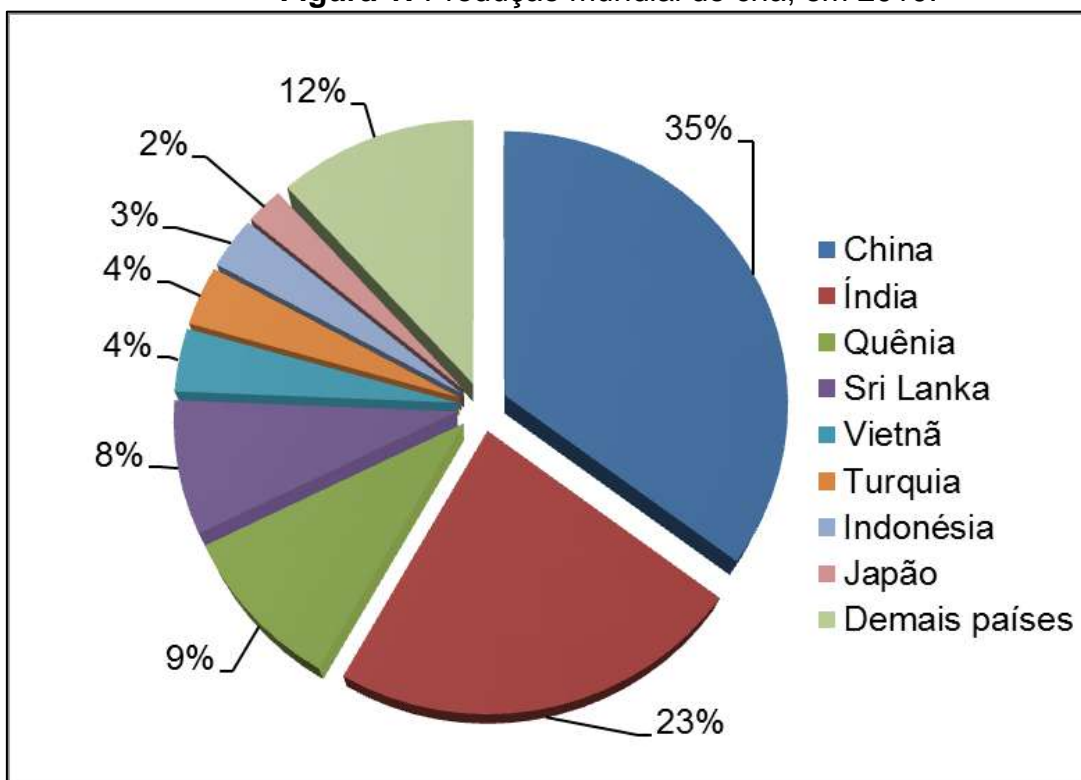
“bebida obtida pela maceração, infusão ou percolação de folhas e brotos de várias espécies de chá do gênero *Thea* (*Thea sinensis* e outros) ou de folhas, hastes, pecíolos e pedúnculos de erva-mate da espécie *Ilex paraquariensis*, ou de outros vegetais, podendo ser adicionados de outras substâncias de origem vegetal e de açúcares” (Brasil, 1998)

O consumo de chás é milenar, há cerca de 5000 anos, na China e na Índia. O seu uso era tradicionalmente para melhorar o fluxo sanguíneo, aumentar a resistência a doenças e eliminar toxinas (Dufresne; Farnworth, 2001). O chá foi levado para a Europa como uma erva com propriedades medicinais durante a exploração portuguesa e holandesa na China no período das grandes navegações (Tsuru, 2016).

O consumo de chá ao longo dos anos tem sido associado aos hábitos alimentares e culturais, como o café e refrigerantes. Porém, o interesse pelo consumo dessa bebida vem aumentando devido aos estudos científicos que atribuem ao seu consumo alguns benefícios a saúde (Vuong, 2014).

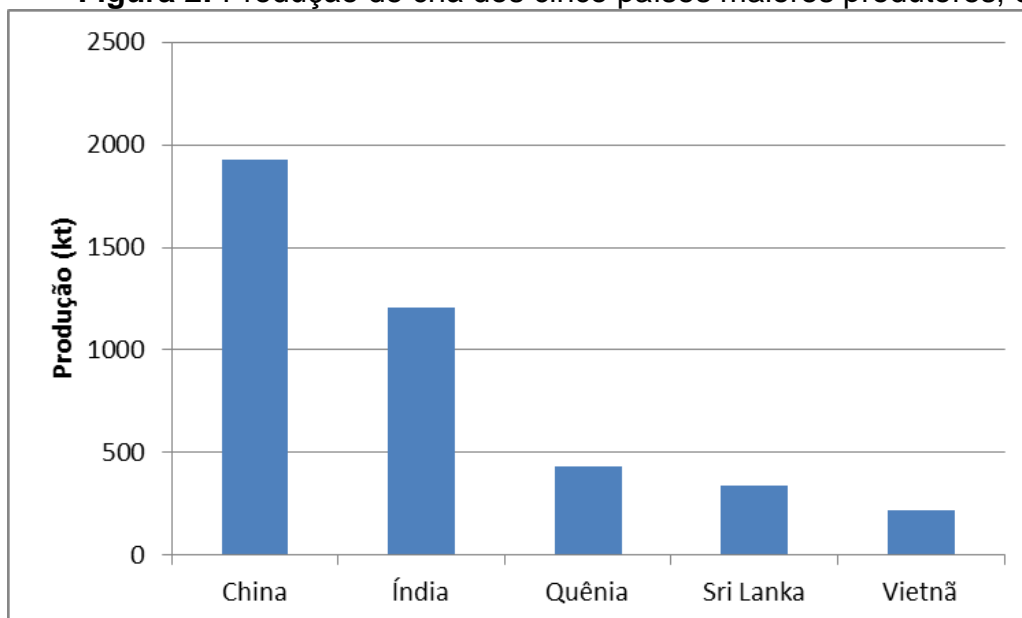
O continente que mais produz chá é a Ásia, onde os países que se destacam são China e Índia (FAOSTAT, 2017), como mostram as Figuras 1 e 2. No Brasil, a produção e o consumo de chá pronto para beber aumentaram consideravelmente no período de 2010 a 2015 (ABIR, 2016), conforme apresentado na Figura 3.

Figura 1: Produção mundial de chá, em 2010.



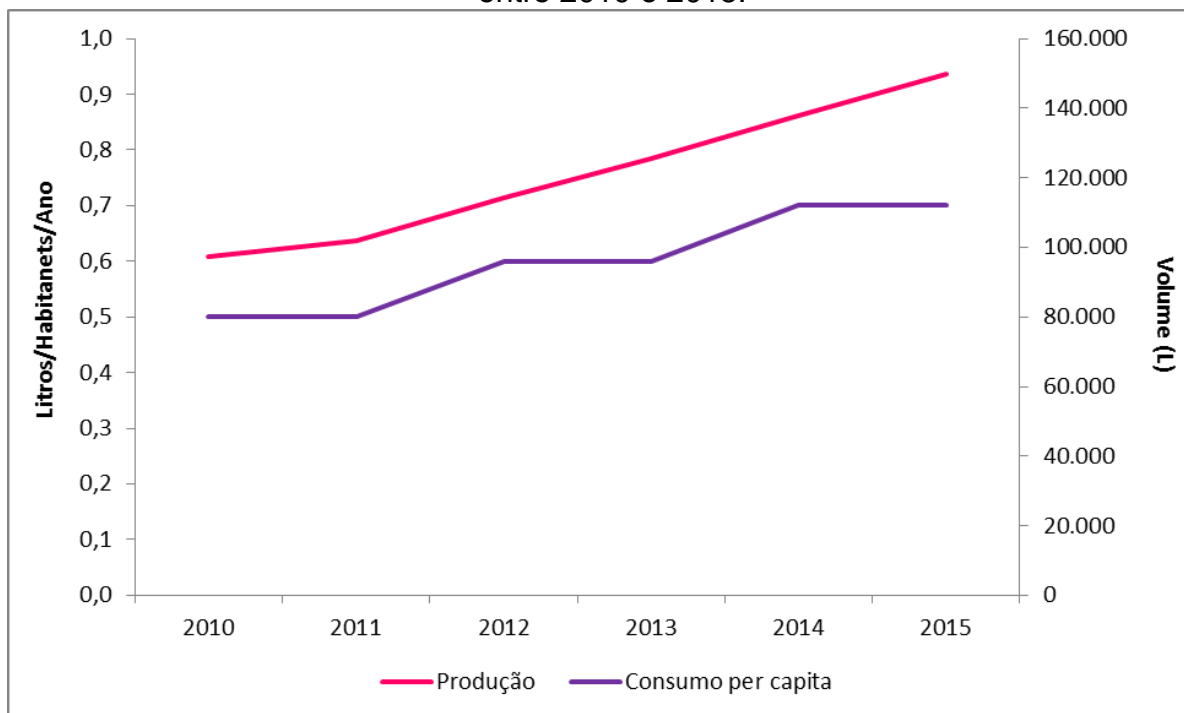
FONTE: adaptado FAOSTAT (2017).

Figura 2: Produção de chá dos cinco países maiores produtores, em 2013.



FONTE: adaptado de FAOSTAT (2017).

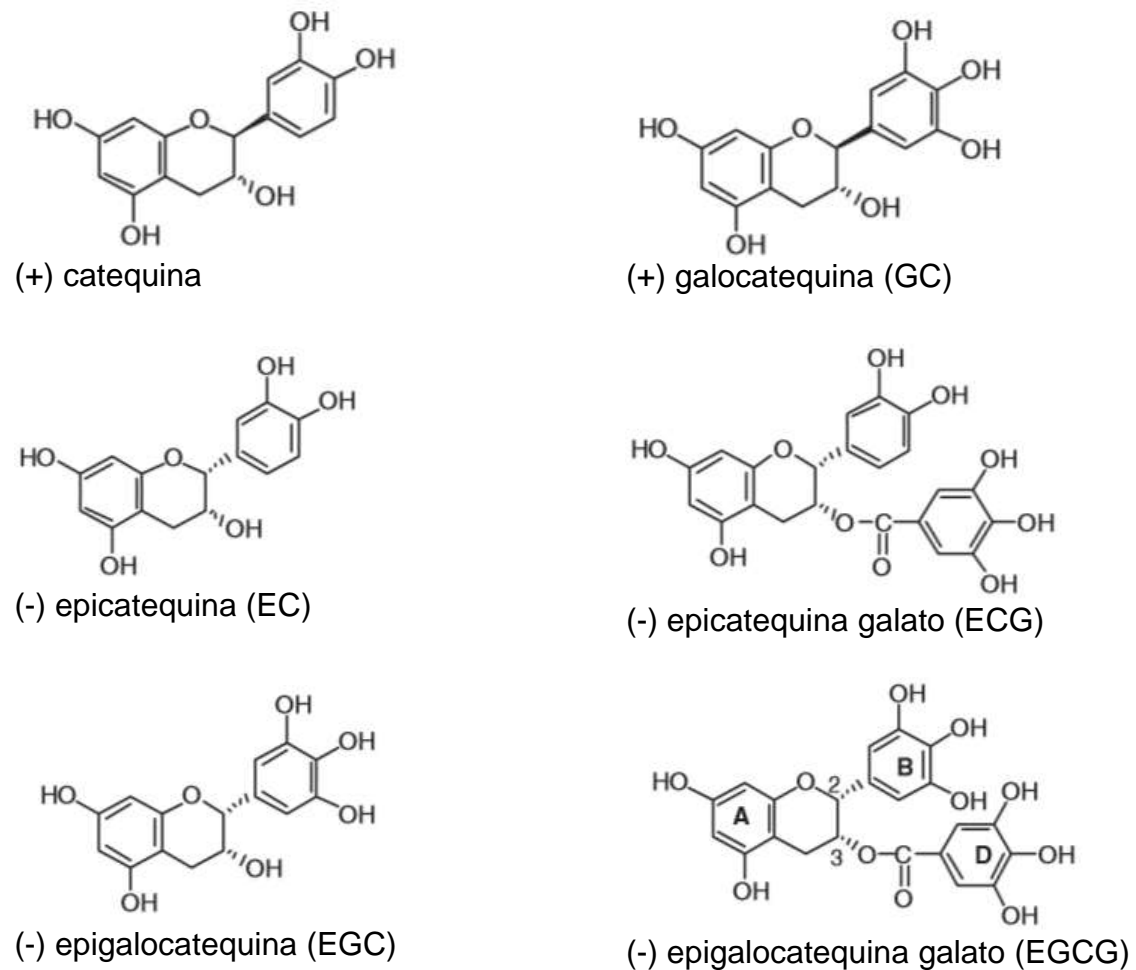
Figura 3 Consumo per capita e produção de chá pronto para consumo no Brasil, entre 2010 e 2015.



FONTE: adaptado de ABIR (2016).

O chá é um dos exemplos mais antigos do uso de produtos naturais com o objetivo de promover algum benefício à saúde, além da nutrição básica. As substâncias mais abundantes no chá são as catequinas, que são polifenóis do grupo dos flavonoides. Os estudos sugerem que os efeitos benéficos à saúde estão relacionados à atividade antioxidante das catequinas (Morais et al., 2009, Dufresne; Farnworth, 2001). Essas substâncias antioxidantes reduzem a formação de radicais livres e estão sendo relacionadas com a prevenção de danos causados pelo estresse oxidativo (Droge, 2002). A Figura 4 mostra a estrutura das principais catequinas encontradas no chá.

Figura 4: Estruturas das principais catequinas encontradas no chá.



FONTE: Adaptado de Zaveri, 2006.

Bunkova et al. (2005) testaram o efeito anticarcinogênico de amostras de chá verde e compararam com um padrão de catequinas. Os autores observaram que as amostras de chá verde apresentaram maior efeito anticarcinogênico que o padrão de catequinas. Além disso, as catequinas também apresentam atividade antimicrobiana, evitando a contaminação de micro-organismos patogênicos e deterioradores durante a estocagem (Chou; Lin, 1999).

2.3. Kombucha

2.3.1. A Bebida

O kombucha é uma bebida originada na China em 220 a.C., durante a dinastia Tsin na Manchúria, que era procurada devido às suspeitas de apresentar propriedades mágicas (Greenwalt et al., 2000). Um médico chamado Kombu usou a

bebida no Japão com a intenção de curar os problemas digestivos do imperador (Dufresne; Farnworth, 2000). A bebida se tornou tradicional na Ásia, sendo consumida também na Rússia, como tratamento de distúrbios metabólicos entre outras doenças. Durante a Segunda Guerra Mundial, a bebida se espalhou pela Europa e hoje em dia é mundialmente consumida (Jayabalan et al., 2014).

O chá kombucha é uma bebida fermentada e apresenta um gosto levemente ácido e adocicado. A bebida é obtida a partir de um chá adoçado e a adição de um inóculo que contém leveduras e bactérias, conhecido como “fungo do chá” ou SCOBY, do inglês *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts* (Nummer, 2013). A associação desses micro-organismos em condições aeróbicas resulta em uma simbiose produzindo os metabólitos que dão origem às características sensoriais do produto.

A matéria-prima mais usada na preparação do kombucha é o chá-preto, pois possui maior aceitabilidade devido ao sabor mais suave. Porém, na literatura existem estudos utilizando outras matérias-primas como erva-cidreira (Četojević-Simin et al., 2012), chá verde (Reiss, 1994) e suco de uva (Khánh, 2013). Apesar de a sacarose ser o açúcar mais utilizado, outros açúcares podem ser usados na preparação do kombucha, tais como glicose, frutose e lactose (Reiss, 1994).

A formulação usada na preparação do kombucha pode variar, porém na maioria dos casos utiliza-se uma infusão de chá preto por aproximadamente 10 minutos, adoçado com sacarose em concentrações de 5 a 15% (m/v) (Kumar; Joshi, 2016). O chá adoçado fica em repouso em um recipiente até atingir a temperatura ambiente (20-25°C) e em seguida é adicionada uma película de celulose contendo os micro-organismos do kombucha (Greenwalt et al., 2000). Essa “cultura mãe” é chamada de “fungo do chá” e vai dar origem a uma nova película durante a fermentação. O “fungo do chá” é adicionado junto com chá kombucha previamente fermentado ou vinagre (Dufresne; Farnworth, 2000), na proporção de 10 a 20% do volume do chá preparado, para reduzir o pH, mantendo abaixo de 4,2, e assim evitar a contaminação por micro-organismos indesejáveis (Nummer, 2013). Então, o recipiente que contém a bebida é coberto com um tecido que permita a permeabilidade de oxigênio para que haja uma condição aeróbia (Jayabalan et al., 2014), como mostra a Figura 5.

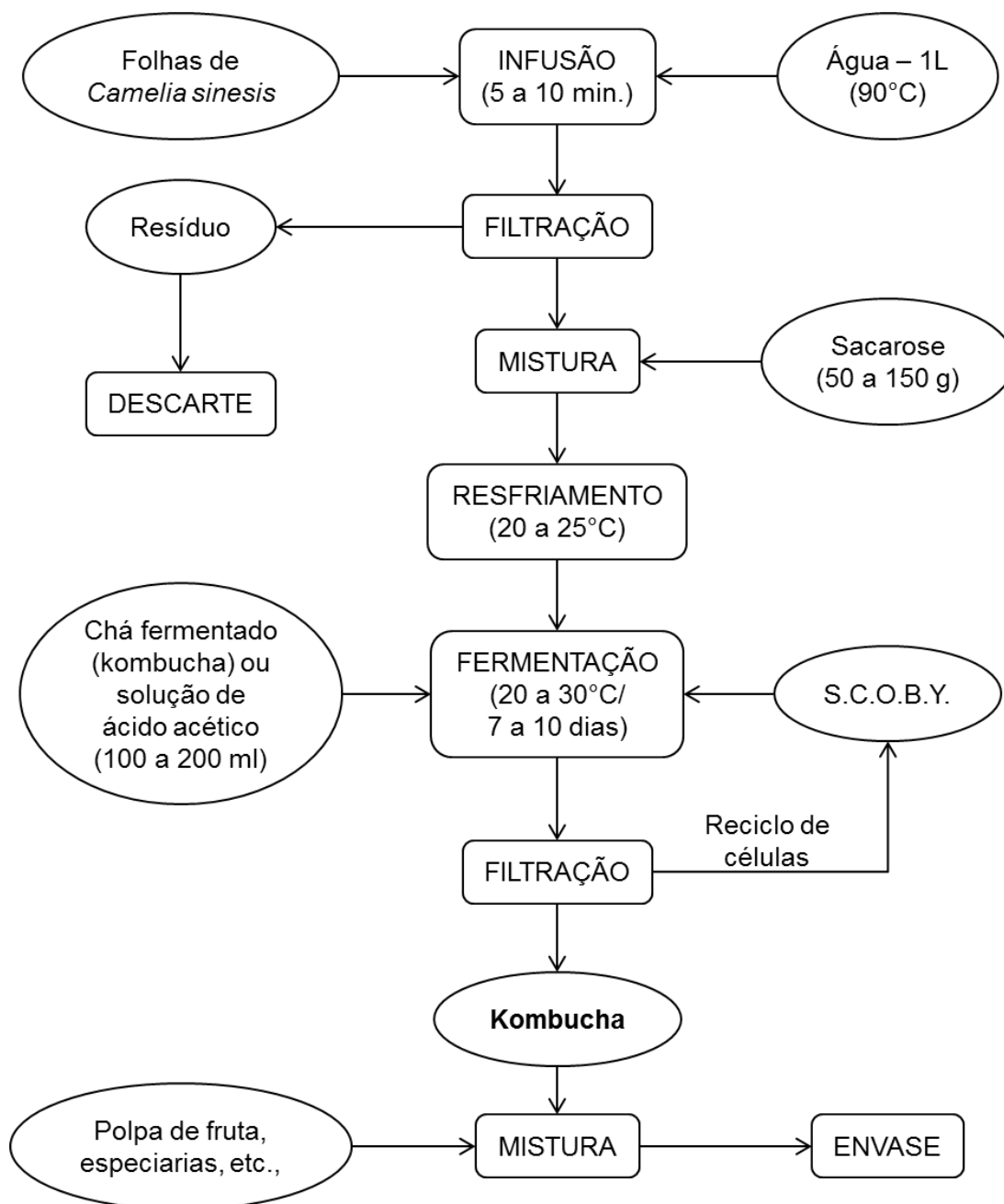
Figura 5: Recipiente contendo o chá e o inóculo do kombucha (SCOBY).



FONTE: adaptado de Jayabalan et al (2014).

A temperatura durante a fermentação deve ser mantida entre 20 e 30°C e o tempo de fermentação pode variar de 7 a 10 dias (Kumar; Joshi, 2016). Esse tempo é variável devido ao sabor desejado, pois quanto mais tempo de fermentação maior o gosto ácido e menor o adocicado (Jayabalan et al 2014). Ao final do tempo determinado, o “fungo do chá” é retirado e armazenado em uma parte do chá fermentado. A bebida é filtrada, envasada em uma garrafa com tampa e armazenada a 4°C (Dufresne; Farnworth, 2000). Durante os primeiros dias de estocagem, ocorre produção de gás carbônico pelos micro-organismos, tornando o produto final uma bebida gaseificada (Greenwalt et al., 2000). Após a fermentação do kombucha, podem ser adicionadas polpas de frutas, especiarias e outros ingredientes para conferir aroma e sabor à bebida. O processo de produção do kombucha está representado na forma de diagrama na Figura 6.

Figura 6: Diagrama proposto para a preparação do kombucha.



FONTE: Adaptado de Kumar e Joshi (2016)

Estudos mostram que o consumo do kombucha pode prevenir algumas patologias, tais como doenças cardiovasculares, problemas no fígado, níveis elevados de colesterol, artrite, inflamações, aterosclerose e câncer (Dipti et al., 2003; Semjonovs et al., 2014; Suhartatik et al., 2011; Chu; Chen, 2006). Os benefícios associados ao consumo do kombucha podem estar relacionados principalmente com a presença do ácido glicurônico, produzido durante a fermentação.

2.3.2. Os micro-organismos do kombucha

A caracterização microbiológica do kombucha é bastante variável, pois depende da origem da matéria-prima e do inóculo utilizado. Porém, os estudos indicam que os grupos de micro-organismos mais encontrados em chás kombucha são bactérias acéticas (gêneros *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* e/ou *Gluconobacter*), láticas (gênero *Lactobacillus*) e leveduras (classe Saccharomycetes) (Marsh et al., 2014, Teoh et al., 2004, Liu et al., 1996, Mayser et al., 1995). O Quadro 2 mostra alguns micro-organismos presentes no kombucha relatados na literatura.

Quadro 2: Bactérias e leveduras isoladas de kombucha.

Micro-organismo	Referência
Bactérias	
<i>Acetobacter</i>	Marsh et al., 2014
<i>A. pasteurianus</i>	Liu et al., 1996
<i>A. aceti</i>	Liu et al., 1996
<i>Gluconoacetobacter</i>	Marsh et al., 2014
<i>Lactobacillus</i>	Marsh et al., 2014
<i>Lactococcus</i>	Marsh et al., 2014
Leveduras	
<i>Saccharomyces</i>	Mayser et al., 1995
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Liu et al., 1996; Hitokoto et al., 1978
<i>Saccharomyces inoconspicus</i>	Hitokoto et al., 1978
<i>Saccharomyces pombe</i>	Teoh et al., 2004
<i>Brettanomyces</i>	Mayser et al., 1995
<i>Brettanomyces bruxellensis</i> (<i>Dekkera bruxellensis</i>)	Liu et al., 1996; Marsh et al., 2014; Teoh et al., 2004
<i>Zygosaccharomyces</i>	Mayser et al., 1995
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Liu et al., 1996; Marsh et al., 2014; Teoh et al., 2004
<i>Candida</i>	Mayser et al., 1995
<i>Candida tropicalis</i>	Hitokoto et al., 1978
<i>Candida stellata</i>	Teoh et al., 2004
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Hitokoto et al., 1978
<i>Shizosaccharomyces pombe</i>	Teoh et al., 2004
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	Teoh et al., 2004
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Teoh et al., 2004

O grupo de micro-organismos que mais varia no kombucha é o das leveduras, já foram relatados na literatura diversos gêneros diferentes. As leveduras são micro-organismos eucariotos e pertencem ao reino Fungi. Esses micro-organismos são geralmente caracterizados por terem brotamento ou fissão como principal meio de reprodução assexuada e não formarem seus estados sexuais dentro ou sobre um corpo frutífero (Kreger-van Ri, 1987). A maioria das leveduras possui metabolismo fermentativo, utilizando açúcares como substratos (Kurtzman et al., 2011).

Esse grupo é conhecido pela a sua vasta aplicação em produtos como pão, cerveja, vinho e outras bebidas alcólicas (Fleet, 2006). Porém, algumas espécies de leveduras podem atuar de forma negativa em certos produtos, sendo consideradas contaminantes. Essa variação na funcionalidade desses micro-organismos pode ser exemplificada pela espécie *Brettanomyces bruxellensis* que pode estar presente no kombucha como fermento, como mostra no Quadro 2, e é motivo de grande preocupação para a indústria vinícola (Daniels-Treffandier et al., 2017). No Quadro 3 estão sendo mostradas a origem nos alimentos e a função de algumas espécies de leveduras.

Quadro 3: Distribuição e principais atividades de espécies de leveduras em alimentos fermentados e bebidas.

Espécie de levedura mais frequente	Origem (alimento ou bebida)	Principal função
<i>Saccharomyces</i> spp.	Vinho, cerveja, <i>sourdough</i> , cidra, xerez, queijo, alimentos fermentados indígenas e bebidas (ex: kombucha)	Fermentação de açúcar Produção de metabólitos secundários Atividades da pectinase e da glicosidase Inibição do crescimento de bolores produtores de micotoxinas Degradação de algumas frações de caseína Atividades lipolítica, proteolítica e de urease
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Queijo, salame e kombucha	Aumento do pH Produção de fatores de crescimento importantes para bactérias

Quadro 3: continuação - Distribuição e principais atividades de espécies de leveduras em alimentos fermentados e bebidas.

Espécie de levedura mais frequente	Origem (alimento ou bebida)	Principal função
<i>Hanseniaspora</i> (Kloeckera) spp.	Vinho, cidra, alimentos fermentados indígenas e bebidas	Atividade proteolítica, de glicosidases e pectinases Produção de metabólitos secundários
<i>Candida</i> - espécies fermentadoras	Vinho, <i>sourdough</i> , alimentos fermentados indígenas e bebidas (ex: kombucha)	Atividade proteolítica, de glicosidases e pectinases Produção de compostos secundários Inibição do crescimento de bolores produtores de micotoxinas
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Queijo e salame	Atividades lipolítica, proteolítica e de urease Redução da oxidação de gordura (ranço)

FONTE: Adaptado de Romano et al. (2006).

Os dois grupos de bactérias presentes no kombucha são as bactérias acéticas e as lácticas. As bactérias acéticas pertencem à família Acetobacteraceae e são Gram negativas ou Gram variáveis, catalase positiva e oxidase negativa. Esses micro-organismos são bastonetes, podendo apresentar uma forma elipsoidal ou mais alongada (Martins, 2012). Essa família é constituída atualmente por 30 gêneros (Martins, 2012), sendo *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Gluconacetobacter* os principais gêneros usados para produção de ácido acético industrial (Raspor; Goranovič, 2008).

O metabolismo desse grupo de bactérias é aeróbio obrigatório sendo o oxigênio o acceptor final de elétrons. Com isso, as bactérias acéticas realizam respiração aeróbia (Oliveira et al., 2010; Kersters et al., 2006), e é incorreto denominar este processo de fermentação acética (Martins, 2012). Esses micro-organismos são capazes de crescer em meios alcóolicos, ácidos e com alto teor de açúcar e podem exercer papel positivo, neutro ou deteriorador em alimentos e bebidas (Kersters et al., 2006). As bactérias acéticas podem ser importantes na produção de alguns alimentos, como vinagre e kombucha, e na fermentação do cacau, ou indesejáveis em outros produtos, tais como vinho, cerveja, refrigerantes e frutas (Raspor; Goranovič, 2008). Além disso, podem ser utilizadas na área

biotecnológica sintetizando compostos como celulose bacteriana, sorbose, que é uma substância intermediária para a produção de ácido L-ascórbico (vitamina C), entre outros (Raspor; Goranovič, 2008; Mas et al., 2007).

As bactérias lácticas são Gram positivas, não esporuladas, catalase negativa, aeróbias facultativas e ácido-tolerantes (Mayo et al., 2010). Esse grupo de bactérias possui um metabolismo estritamente fermentativo, podendo ser pela via homofermentativa, onde apenas é produzido o ácido láctico, ou heterofermentativa, que, além do ácido láctico, é produzido ácido acético, etanol, dióxido de carbono, entre outros (Hoppe; Larsen, 2009). Podem apresentar morfologia em cocos ou bastonete, dependendo do gênero.

As espécies típicas de bactérias lácticas pertencem aos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc*. Esses micro-organismos podem ser encontrados em diversos alimentos, como leite e produtos lácteos, vegetais, cereais, carnes e produtos cárneos. Diversas espécies desses gêneros são usadas na produção e conservação de alimentos fermentados, podendo estar presentes como contaminantes ou como culturas *starter*, sendo adicionadas ao alimento (Mayo et al., 2010). As bactérias lácticas podem contribuir positivamente para o produto alimentício, conferindo propriedades sensoriais, tecnológicas e nutricionais desejáveis (Leroy; Vuyst, 2004).

2.3.3. O processo de fermentação

O processo de produção do kombucha combina a fermentação alcoólica, conduzida pelas leveduras, e a produção de ácidos orgânicos, resultantes do metabolismo das bactérias acéticas (Neffe-Skocińska et al., 2017). A simbiose estabelecida entre esses micro-organismos é devido ao ácido acético estimular a produção de etanol pelas leveduras e o etanol estimular a produção de ácido acético pelas bactérias (Dufrense; Farnworth, 2000; Reiss, 1994).

Além disso, durante o processo de fermentação, uma nova película de celulose é formada por cima da “colônia mãe” adicionada no início do processo (Jayabalan et al., 2014). Liu et al. (1996) relatam que o micro-organismo responsável pela produção dessa película de celulose, característica do kombucha, possivelmente é *Acetobacter pasteurianus*. Essa película formada mantém os micro-

organismos na superfície, favorecendo a condição aeróbica, devido ao contato com o oxigênio.

Na fermentação aeróbica, diversas reações bioquímicas ocorrem e o controle dos parâmetros desse processo no kombucha é importante para determinar a qualidade da bebida. Os metabólitos gerados na fermentação do kombucha são ácidos orgânicos, tais como ácido glucônico, glicurônico, acético e lático, e etanol. Reiss (1994) observou que a produção de etanol atingiu o máximo de concentração após seis dias de fermentação e logo depois reduziu. Liu et al. (1996) identificaram o ácido glicurônico como metabólito principal da fermentação do kombucha. Neffe-Skocińska et al (2017) avaliaram três temperaturas distintas (20, 25 e 30°C) durante a fermentação do kombucha e concluíram que a 25°C/10 dias é a condição que resulta melhores qualidades sensoriais e estabilidade microbiológica.

O processo de fermentação é capaz de aumentar a preservação e a segurança do alimento (Steinkraus, 2002). Isso ocorre, devido à redução do pH e a produção de metabólitos antimicrobianos no processo de fermentação do kombucha que evitam a contaminação por outras bactérias, leveduras e fungos filamentosos (Teoh et al., 2004, Mo et al., 2008). Além disso, a fermentação é capaz de proporcionar uma maior qualidade sensorial e biológica do alimento (Bourdichon et al., 2012). Alguns autores observaram o efeito antimicrobiano contra *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Erwinia carotovora* (Battikh et al., 2012, Četojević-Simin et al., 2012, Sreeramulu et al., 2000, Steinkraus et al., 1996).

Mo et al. (2008) observaram que a atividade antimicrobiana era maior conforme o tempo de fermentação aumentava, sugerindo que essa atividade possa estar relacionada com os produtos gerados durante o processo metabólico envolvido na produção do chá fermentado e não com os compostos presentes originalmente no chá, já que observaram que o processo de oxidação das folhas reduz essa capacidade antimicrobiana. Essa atividade antimicrobiana do kombucha é atribuída principalmente ao ácido acético produzido no processo de fermentação (Sreeramulu et al., 2000, Steinkraus et al., 1996).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a estabilidade microbiológica do chá fermentado kombucha comercial de cinco sabores distintos ao longo do tempo de estocagem de 90 dias.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a inocuidade do chá kombucha;
- Acompanhar a viabilidade dos micro-organismos durante um período de estocagem de 90 dias, com armazenamento dos produtos a 5°C;
- Fazer a análise microbiológica para identificar os grupos de micro-organismos presentes no produto;
- Acompanhar o pH das amostras durante o tempo de estocagem de 90 dias.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostras de chá kombucha

As amostras de chá kombucha comercial de cinco sabores distintos (maçã com canela, manga, gengibre com limão siciliano e mel, maracujá e melancia com gengibre) foram fornecidas por um fabricante do Rio de Janeiro (Figura 7). Segundo o fabricante, o chá fermentado foi preparado em uma mesma batelada e somente após a fermentação foi adicionado polpa de frutas e demais ingredientes. Foi informado também que a fruta *in natura* utilizada passou pelo processo de sanitização antes de ser adicionada ao kombucha. O chá foi armazenado em garrafas translúcidas de vidro rotuladas com os sabores e ficaram armazenadas a 5°C, conforme instruções do fabricante.

Figura 7: Foto das amostras de chá kombucha comerciais utilizadas no trabalho.

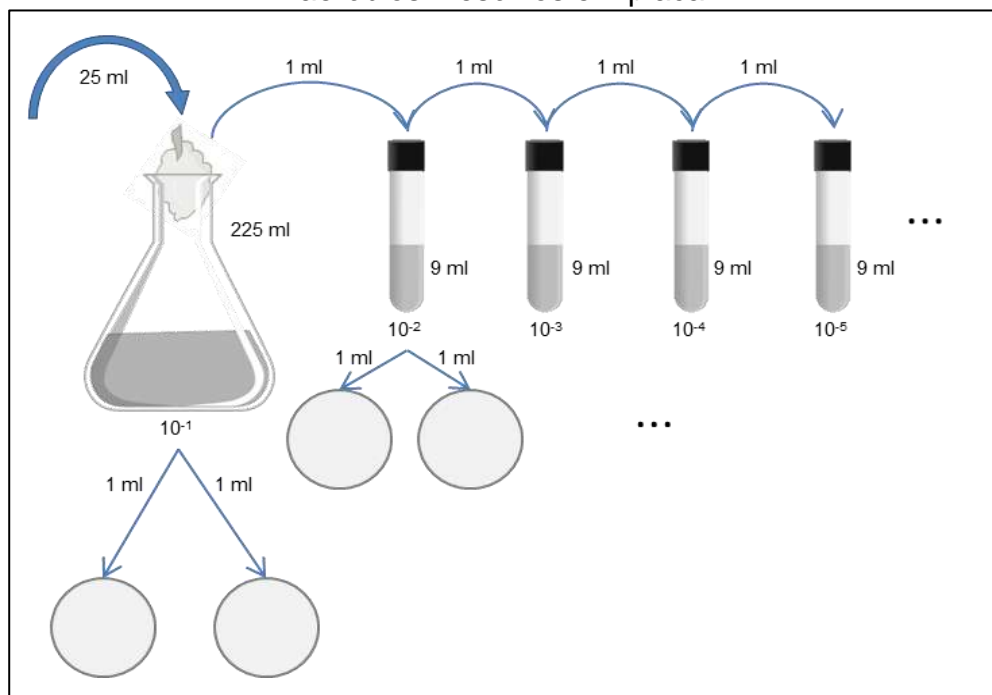


FONTE: Autoria própria.

4.2. Análise microbiológica

As amostras (25 ml) foram diluídas e homogeneizadas em 225 ml de água peptonada 0,1% (m/v) (Himedia, Índia) e, após isto, foram realizadas diluições seriadas conforme Midura e Bryant (2001), até que a contagem em placas fosse possível, como mostra a Figura 8.

Figura 8: Esquema geral da análise para contagem total dos micro-organismos aeróbios mesófilos em placa.



FONTE: Adaptado de Morton (2001)

A metodologia usada para a contagem total dos micro-organismos aeróbios mesófilos em placas foi descrita por Morton (2001) e os meios de cultura comerciais usados foram o *Plate Count Agar* (PCA) (BD, Difco, EUA) com pH 7,0 e o *Orange Serum Agar* (OSA) (BD, BBL, EUA) com pH 5,5, que permite recuperar bactérias lácticas e acéticas por ser um meio nutricionalmente mais rico que o PCA (Hatcher et al., 2001). A composição dos meios comerciais está descrita no Anexo A.

O plaqueamento das amostras foi feito em profundidade, utilizando 1 ml de cada diluição em duplicada (Figura 8), para ambos os meios. As amostras foram inoculadas em cinco tempos distintos, sendo zero, 15, 45, 60 e 90 dias, após serem adquiridas. As placas preparadas com o OSA foram incubadas a 30°C e as com o PCA, a 35°C. Ambos os meios ficaram incubados por cinco dias.

Após o crescimento na placa de Petri, foi feita a contagem total e algumas colônias foram selecionadas de ambos os meios para coloração de Gram, teste de catalase e coloração de esporo bacteriano.

As amostras também foram avaliadas quanto a presença de *Salmonella* spp. e coliformes termotolerantes no tempo zero, para verificar a inocuidade do produto. A análise de *Salmonella* spp. foi feita seguindo a metodologia da *International Organization for Standardization* (ISO) 6579:2007 e os meios usados foram o Ágar

Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) e o *Ágar Hektoen Enteric* (HE). A análise de coliformes termotolerantes foi feita seguindo a metodologia preconizada pela *American Public Health Association* (APHA) utilizando o método do número mais provável (NMP) descrita por Kornacki e Johnson (2001).

4.3. Medição de pH

A medição do pH das amostras foi feita em duplicatas em pHmetro (mPA210, MS Tecnopon) nos tempos que as amostras foram analisadas (zero, 15, 45, 60 e 90 dias).

4.4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism, versão 5.03 (2009). Para avaliar a diferença da contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos, entre os meios de cultura utilizados e o tempo de armazenamento, os resultados foram transformados em valores de \log_{10}/ml e avaliados através da análise de variância (ANOVA) *two-way*, seguida de pós-teste de Bonferroni. Foi realizada também uma ANOVA *one-way*, seguida de pós-teste de Tukey, para avaliar a diferença em cada amostra entre os valores de pH medidos. Foram consideradas diferenças significativas para valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado da análise de *Salmonella* spp. foi ausência em 25 ml e da análise de coliformes termotolerantes foi menor que 3,0 NMP/ml para todas as amostras. A RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001 da ANVISA, determina que chás e produtos similares devem apresentar ausência de *Salmonella* spp. e que a contagem total de coliformes termotolerantes seja menor que 10^3 UFC/ml (Brasil, 2001). Dessa forma, foi possível verificar a inocuidade das amostras no tempo zero.

As polpas de fruta e demais ingredientes adicionados ao produto não passaram por processamento térmico, foi feita apenas a sanitização. Por isso, é importante utilizar um meio de cultura genérico, como o PCA, para obter uma contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos, recuperando uma gama maior de micro-organismos do que meios mais específicos.

Como o kombucha é um produto fermentado, esperava-se que a contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos fosse acima de 10^5 UFC/ml. Por isso, as diluições escolhidas inicialmente para o plaqueamento de todas as amostras foram maiores. Porém, não foi possível detectar o crescimento de micro-organismos em dois sabores e assim, foram plaqueadas diluições menores nos tempos seguintes e, com isso, foi possível detectar o crescimento de micro-organismos nas placas.

Para cada uma das amostras, os valores de pH, medidos nos tempos zero, 15, 45, 60 e 90 dias, estão representados na Tabela 1.

Tabela 1: Valor de pH dos cinco sabores de kombucha ao longo do tempo de estocagem de 90 dias.

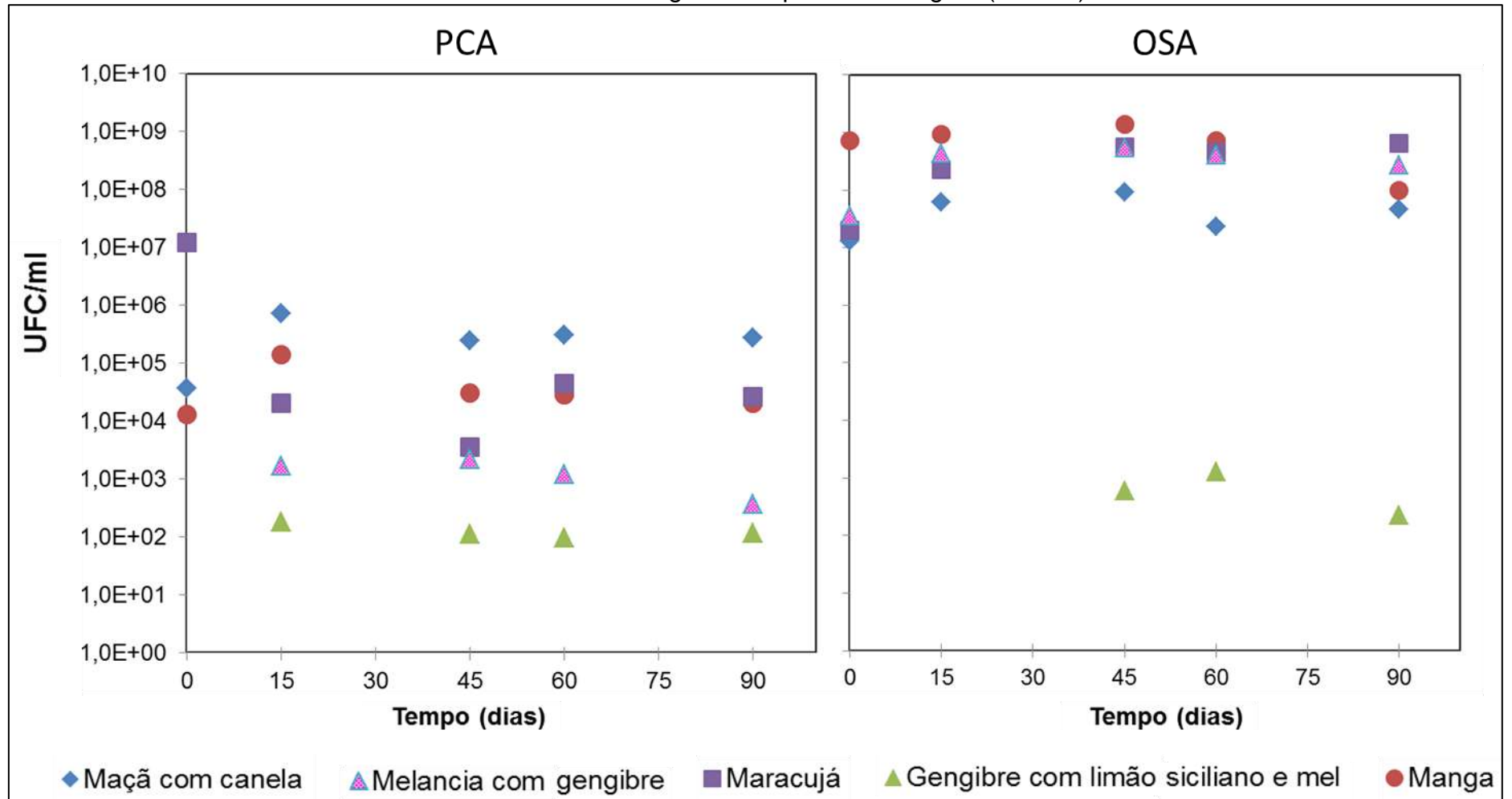
Amostra	Tempo (dias)					Valor de p (ANOVA)
	0	15	45	60	90	
Maçã com canela	3,97 ^{a,b}	4,08 ^a	3,96 ^b	3,37 ^c	3,36 ^c	< 0,001
Manga	3,83 ^a	3,86 ^a	3,74 ^b	3,55 ^c	2,96 ^c	< 0,001
Gengibre com limão siciliano e mel	3,86 ^a	3,84 ^a	3,83 ^a	3,65 ^b	2,99 ^c	< 0,001
Maracujá	3,84 ^a	3,88 ^{a,b}	3,79 ^{a,b}	3,60 ^{a,b}	3,19 ^b	0,0491
Melancia com gengibre	3,76 ^a	3,77 ^a	3,71 ^b	3,56 ^c	2,98 ^d	< 0,001

Médias seguidas por letras sobrescritas diferentes na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$, ANOVA com pós-teste de Tukey).

Em todas as amostras, foi possível observar a redução do pH ao longo do tempo de estocagem. Isso pode ser provavelmente devido à produção de ácidos orgânicos pelos micro-organismos presentes no kombucha (Neffe-Skocińska et al, 2017). O valor de pH observado ficou aproximadamente entre 3,0 e 4,0. Velicanski et al (2012) avaliaram a variação de pH durante o processo de fermentação de kombucha e observaram que o valor de pH final foi de aproximadamente 3,0, após nove dias de fermentação, sendo coerente ao valor observado no tempo zero neste trabalho.

Os resultados da contagem total dos micro-organismos aeróbios mesófilos de cada amostra, em ambos os meios, estão representadas na Figura 9.

Figura 9: Contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos no PCA (*Plate Count Agar*) e no OSA (*Orange Serum Agar*) das cinco amostras ao longo do tempo de estocagem (90 dias).



A contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos apresentou diferença significativa ao longo do tempo e entre os meios utilizados. O resultado da análise de variância *two-way* está apresentado no Anexo A. Foi observado, em todas as amostras, que a contagem foi maior nas placas contendo o meio OSA. Isso ocorre devido à diferença dos meios quanto à composição e o pH, permitindo que micro-organismos distintos cresçam em cada meio. O PCA possui um valor de pH neutro e o OSA mais ácido, sendo em torno de 5,5. Possivelmente, o crescimento de micro-organismos no OSA foi maior devido ao pH do meio ser mais próximo do pH das amostras, favorecendo a recuperação dos micro-organismos acidófilos presentes no kombucha.

Nos primeiros 15 dias, algumas amostras apresentam instabilidade na contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos, sendo o período crítico da estocagem. Fu et al. (2014) avaliaram a estabilidade de amostras de kombucha durante 14 dias de estocagem e observaram a contagem de leveduras, bactérias acéticas, lácticas e totais reduziram durante esse período. No presente estudo, as amostras se mantiveram estáveis, após esse período de 15 dias, até 90 dias em ambos os meios. No PCA, as amostras apresentaram contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos entre 10^2 e 10^5 UFC/ml. Já no meio OSA, a maioria das amostras apresentou uma contagem total entre 10^7 e 10^9 UFC/ml, com exceção apenas da amostra com sabor gengibre com limão siciliano e mel que a contagem ficou em 10^2 e 10^3 UFC/ml. Provavelmente, a diferença dessa amostra pode ser devido aos ingredientes adicionados ao chá fermentado como o gengibre e o mel, que possuem ação antimicrobiana (Patel et al., 2011), reduzindo a população de micro-organismos presentes no produto.

Fu et al (2014) encontraram uma contagem de bactérias totais de $2,5 \times 10^7$ UFC/ml no tempo inicial de estocagem e observaram queda de 2 ciclos logarítmicos. Jayabalan et al. (2008) observou uma contagem de bactérias de $1,5 \times 10^4$ UFC/ml e de leveduras de 7×10^6 UFC/ml, logo após o término da fermentação. Velicanski et al (2012) também observaram contagem de leveduras na ordem de 10^6 UFC/ml, porém a contagem de bactérias foi feita para bactérias acéticas e encontraram um resultado na ordem de 10^5 UFC/ml.

A maioria das amostras analisada neste trabalho apresentou bastante gás, resultando no extravasamento do conteúdo da garrafa ao abrir, como mostra a Figura 10. Apenas a amostra sabor gengibre com limão siciliano e mel, que não

apresentou produção de gás. Isso pode ser devido à contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos dessa amostra no OSA ter sido menor que as demais, em torno de quatro a cinco ciclos logarítmicos. Como as amostras apresentaram estabilidade microbiológica ao longo do tempo de estocagem, sugere-se que o gás formado deve ter sido produzido por micro-organismos presentes no fermento do kombucha e não por micro-organismos deterioradores.

Figura 10: Foto da garrafa de kombucha ao abrir.



FONTE: Autoria própria.

Na coloração de Gram foram identificadas apenas bactérias bastonetes, Gram positivas e leveduras em ambos os meios de cultura. Foi possível observar quatro bactérias com características distintas (denominadas B1, B2, B3 e B4), sendo descritas na Tabela 2 e ilustradas na Figura 11.

Tabela 2: Características morfológicas e bioquímicas de micro-organismos isolados do kombucha.

Características	Identificação do micro-organismo			
	B1	B2	B3	B4
Coloração de Gram	+	+	+	+
Morfologia	bastonete forma esporo em pH neutro	bastonete curto	bastonete curto	bastonete longo
Teste de catalase	+	+	-	+

Figura 11: Bactérias B1, B2, B3 e B4 presentes no chá kombucha

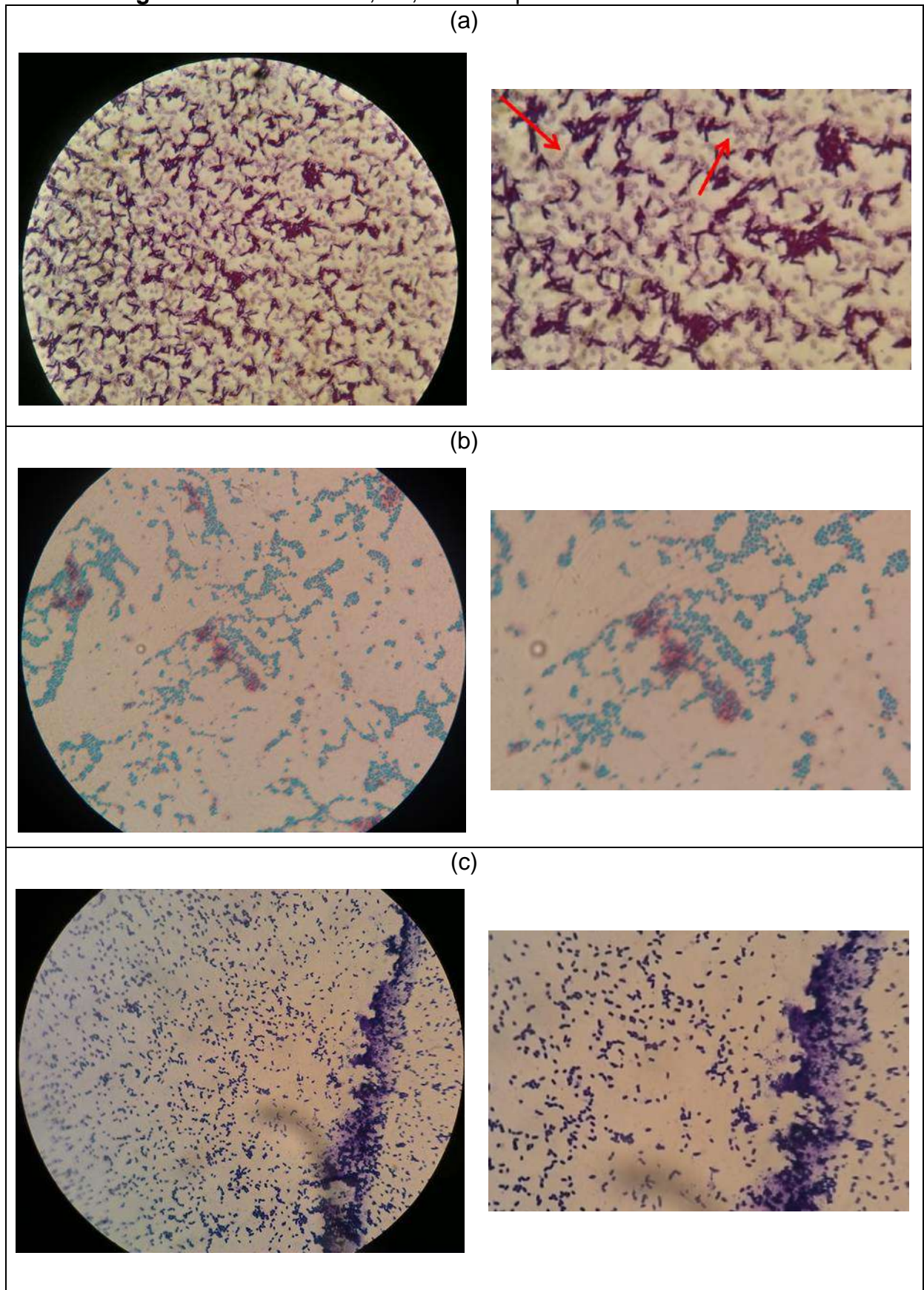
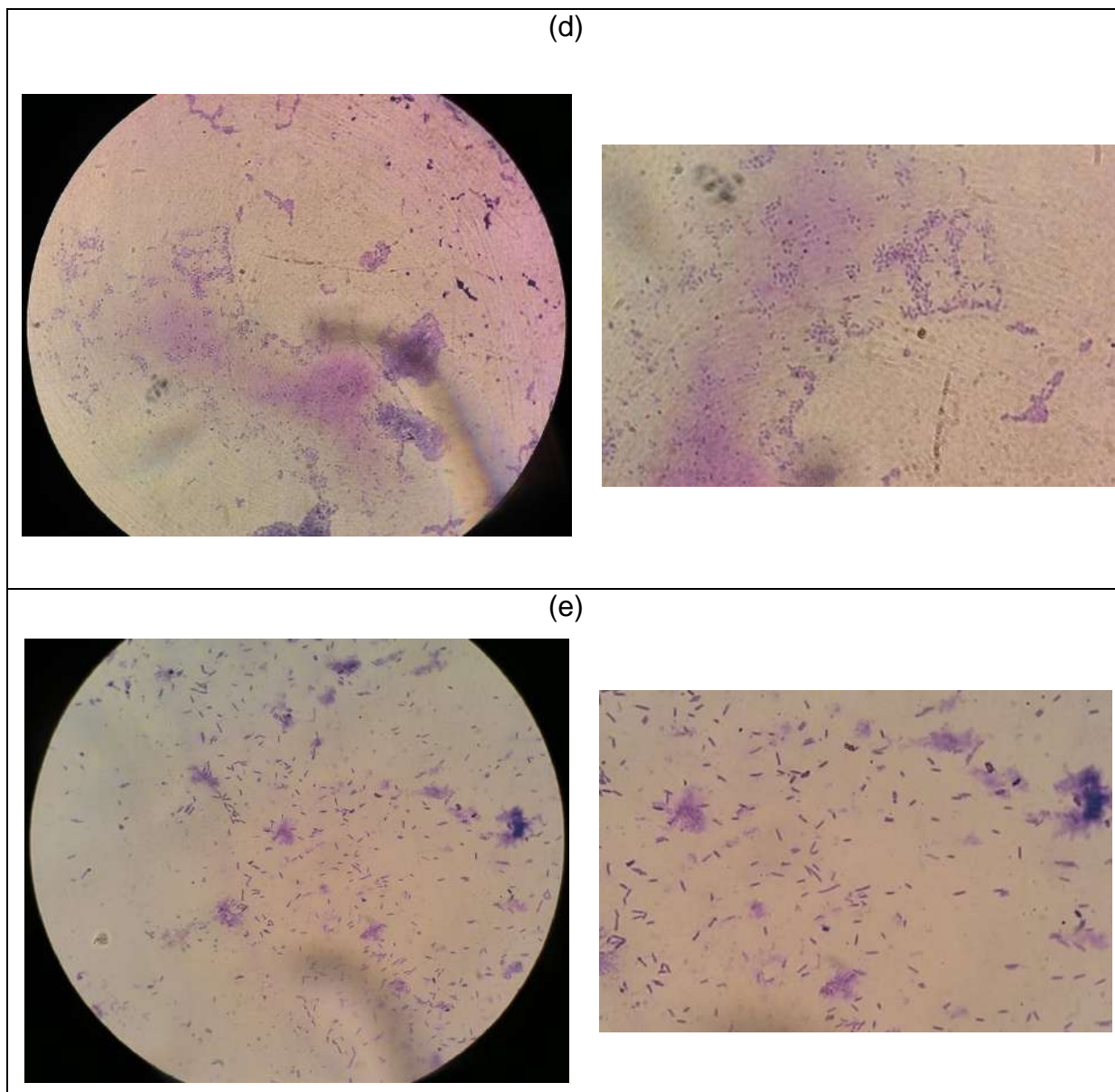


Figura 11: continuação - Bactérias B1, B2, B3 e B4 presentes no chá kombucha.



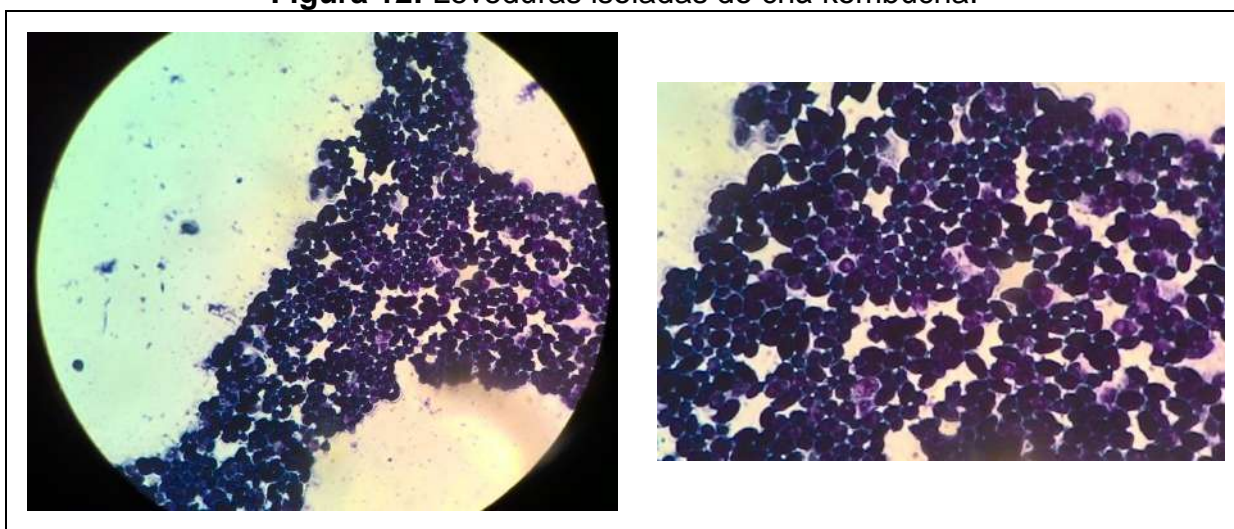
(a) Coloração de Gram da bactéria B1, (b) Coloração de esporo da bactéria B1 (c) Coloração de Gram da bactéria B2, (d) Coloração de Gram da bactéria B3 e (e) Coloração de Gram da bactéria B4. FONTE: Autoria própria.

A bactéria B1 apresentou formação de esporo e esse fenômeno só foi observado no PCA, sugerindo que essa bactéria seja acidófila, pois formou esporo apenas em pH 7,0. Os gêneros de bactérias citados pela literatura no fermento do kombucha não apresentam formação de esporos, sugerindo que essa bactéria esporulada seja um contaminante. Isso se torna preocupante, pois o pH do kombucha é ácido, então, possivelmente, essa bactéria se encontra no produto na forma vegetativa.

Os gêneros de bactérias Gram positivos encontrados no kombucha são *Lactobacillus*, e os gêneros Gram negativos são *Acetobacter* e *Gluconobacter*, podendo ser Gram variáveis em alguns casos (Holt et al., 1994).

As leveduras encontradas no kombucha apresentaram o mesmo formato, sendo esse elipsoidal, quando vistas em microscópio e estão representadas na Figura 12.

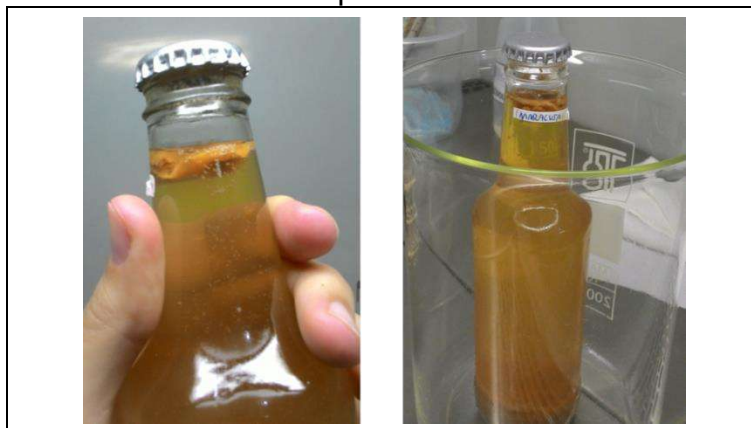
Figura 12: Leveduras isoladas do chá kombucha.



FONTE: Autoria própria.

A presença de uma película na superfície das amostras sabor manga e maracujá foi identificada no tempo de 90 dias, como mostra a Figura 13. Essa película foi colocada em Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC), meio seletivo para crescimento de fungos, com o objetivo de descartar a suspeita de contaminação por fungo filamentoso. Houve crescimento no meio DRBC e foi observado no microscópio que era levedura.

Figura 13: Película formada na superfície da amostra com sabor maracujá.



FONTE: Autoria própria.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que:

- As cinco amostras de kombucha comercial analisadas estavam dentro dos limites determinados pela ANVISA, para análise de *Salmonella* spp. e coliformes termotolerantes.
- A contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos totais nas cinco amostras de kombucha foi estável entre 15 e 90 dias de estocagem em refrigeração a 5°C.
- Houve redução dos valores de pH nas cinco amostras avaliadas durante 90 dias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIR - Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não Alcoólicas. Dados sobre Chá RTD (pronto para beber) dos anos 2010 – 2015. Disponível em: <<http://abir.org.br/o-setor/dados/chas-rtd-prontos-para-beber/>>. Acesso em: 08 jun. 2017.

Battikh, H.; Bakhrouf, A.; Ammar, E. **Antimicrobial effect of kombucha analogues**. Food Science and Technology, v. 47, n. 1, 2012. , p. 71-77

Bourdichon, F; Casaregola, S.; Farrokh, C; Frisvad, J. C.; Gerds, M. L.; Hammes, W. P.; Harnett, J.; Huys, G.; Laulund, S.; Ouwehand, A.; Powell, J. B.; Prajapati, J. B.; Seto, Y.; Schure, E. T.; Boven, A. V.; Vanlerckhoven, V; Zgoda, A.; Tuijelaars, S.; Hansen, E. B. **Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use**. International Journal of Food Microbiology, v. 154, n. 3, 2012, p. 87–97.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002. **Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional ou de Saúde**.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº12 de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº18 de 30 de abril de 1999a. **Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos**.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº19 de 30 de abril de 1999b. **Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**.

Brasil.. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 544, de 16 de novembro de 1998. **Regulamentos Técnicos para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade, para refresco, refrigerante, preparado ou concentrado líquido para refresco ou refrigerante, preparado sólido para refresco, xarope e chá pronto para o consumo**.

Bunkova, R.; Marova, I; Nemeč, M. **Antimutagenic Properties of Green Tea**. Plant Foods for Human Nutrition, v. 60, n. 1, 2005, p. 25-29.

Četojević-Simin, D. D.; Velićanski, A. S.; Cvetković, D. D.; Markov, S. L.; Mrđanović, J. Ž.; Bogdanović, V. V.; Šolajčić, S. V. **Bioactivity of lemon balm kombucha**. Food and Bioprocess Technology, v. 5, n. 5, 2012, p.1756-1765.

Chou, C-C; Lin, L-L; Chung, K-T. **Antimicrobial activity of tea as affected by the degree of fermentation and manufacturing season**. International Journal of Food Microbiology, v. 48, n. 2, 1999, p. 125-130.

Chu, S-C; Chen C. **Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha.** Food Chemistry, v. 98, n. 3, 2006, p. 502-507.

Daniels-Treffandier, H.; Campbell, C.; Kheir, J.; Salameh, D.; Lteif, R.; Brandam, C; Taillandier, P. **A new method for the detection of early contamination of red wine by *Brettanomyces bruxellensis* using *Pseudomonas putida* 4-ethylphenol methylene hydroxylase (4-EPMH).** European Food Research and Technology, v. 243, n. 7, 2017, p. 1117-1125.

Dipti, P.; Yogesh, B.; Kain, A. K.; Pauline, T.; Anju, B.; Sairam, M.; Ingh, B. S.; Mongia, S. S.; Kumar, G. I. D. **Lead induced oxidative stress: beneficial effects of kombucha tea.** Biomedical and Environmental Sciences, v. 16, n. 3, 2003, p. 276-282.

Droge, W. **Free radicals in the physiological control of cell function.** Physiological Reviews, v. 82, n. 1, 2002, p. 47-95.

Dufresne, C.; Farnworth, E. **Tea, Kombucha, and health: a review.** Food Research International, v. 33, n. 6, 2000, p. 409-421.

Dufresne, C. J.; Farnworth, E. R. **A review of latest research findings on the health promotion properties of tea.** Journal of Nutritional Biochemistry, v. 12, n. 7, 2001, p. 404-421.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization - Statistics. Country by commodity. Disponível em <http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity>. Acesso 09 de jun de 2017.

Fleet, G.H. *The Commercial and Community Significance of Yeasts in Food and Beverage Production.* In: Querol, A.; Fleet, G.H. (org.). **Yeasts in food and beverages.** Vol. 2, 2006. Cap. 1.

Fu, C.; Yan, F.; Cao, Z.; Xie, F.; Lin, J. **Antioxidant activities of kombucha prepared from three different substrates and changes in content of probiotics during storage.** Food Science and Technology, v. 34, n. 1, 2014, p. 123-126.

Greenwalt, C. J.; Steinkraus, K. H.; Ledford, R. A. **Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects.** Journal of Food Protection, v. 63, n. 7, 2000, p. 976–981.

Hatcher, W.S.; Parish, M.E.; Weihe, J.L.; Splittstoesser, D.F.; e Woodward, B.B. Fruit beverages. In: Downes, F. P.; Ito, K. (org), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4^a ed.** American Public Health Association, Washington, DC, 2001. Cap. 58, p. 565-568.

Hitokoto, .; Morozumi, S.; Wauke, T.; Sakai, S.; Ushio, F.; Doguchi, M.; Benoke, M. **Microbial flora and organic acid contents in ‘tea fungus’.** Journal of the Food Hygienic Society of Japan, v. 19, 1978, p. 279-281.

Hoppe, C.; Larsen, C.N. Commercially available human probiotic microorganisms. In: Lee, Y.K.; Salminen, S. **Handbook of probiotics and prebiotics.** 2^a ed. New Jersey, 2009, cap. 6, p. 441 –532.

Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T.; Williams, S.T. **Bergey's manual of determinative bacteriology, 9^{ed}**. USA, 1994.

ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding stuffs – **Horizontal method for detection of *Salmonella* spp., 4^{ed}**. 2002. The international Organization for Standardization, emenda 1:15/07/2007.

Jayabalan, R.; Malbaša, R. V.; Lončar, E. S.; Vitas, J. S.; Sathishkumar, M. **A review on kombucha tea: microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus**. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, v.13, n. 4, 2014, p. 538-550.

Jayabalan, R.; Malini, K.; Sathishkumar, M.; Swaminathan, K.; Yun, S-E. **Biochemical characteristics of tea fungus produced during kombucha fermentation**. Food Science Biotechnology, v. 19, n. 3, 2010, p. 843-847.

Jayalaban, R.; Marimuthu, S.; Thangaraj, P.; S; Sathishkumar, M.; Swaminathan, K.; Yun, S.E. **Preservation of Kombucha Teas Effect of Temperature on Tea Components and Free Radical Scavenging Properties**. Journal of Agriculture and Food Chemistry, v. 56, n. 18, 2008, p. 9064-9071.

Kerstens, K.; Lisdiyanti, P.; Komagata, K.; Swings, J. **The Family Acetobacteraceae: The Genera Acetobacter, Acidomonas, Asaia, Gluconacetobacter, Gluconobacter, and Kozakia**. The Prokaryotes. Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses, 2006, capítulo 3.1.8, p. 163-200.

Khánh, D. H. B. **Fermentation of grape juice drinking by kombucha layer**. Tese (Doutorado em Biotecnologia). International University – Vietnam National University, Ho Chi Minh, 2013.

Kumar, V.; Joshi, V.K. **Kombucha: Technology, Microbiology, Production, Composition and Therapeutic Value**. Journal of Food and Fermentation Technology, v. 6, n. 1, 2016, p. 13-24.

Kornacki, J.L.; Johnson, J.L. *Enterobacteriaceae*, coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: Downes, F. P.; Ito, K. (org), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed**. American Public Health Association, Washington, DC, 2001. Cap. 8, p. 69-82.

Kreger-van Rij, N.J.W. *General classification of the yeasts*. **The yeasts, a taxonomic study, 3^{ed}**. Groningen, The Netherlands.

Kurtzman, C.P; Fell, J.W.; Boekhout, T. *Definition, Classification and Nomenclature of the Yeasts*. In: Kurtzman, C.P; Fell, J.W.; Boekhout, T. (org) **The yeasts, a taxonomic study, 5^{ed}**. V. 1, 2011, Cap. 1.

Leroy, F.; Vuyst, L. D. **Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry**. Trends in Food Science and Technology, v. 15, n. 2, 2004, p. 67-78.

- Liu, C.-H.; Hsu, W.-H.; Lee, F.-L.; Liao, C.-C. **The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation.** Food Microbiology, v. 13, n. 6, 1996, p. 407-415.
- Lima, U.A. *Chás.* In: Aquarone E.; Borzani, W Schmidell, W.; Lima, U.A.(org), **Biotechnologia industrial.** São Paulo, Brasil, 2008, V. 4.
- Marsh, A. J.; O'Sullivan, O.; Hill, C.; Ross, R. P.; Cotter, P. D.. **Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples.** Food Microbiology, v. 38, 2014, p. 171–178.
- Martins, C. F. G. **Caracterização Fenotípica e Genotípica de Bactérias do Ácido Acético Isoladas de Alimentos.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Qualidade Alimentar). Universidade De Trás-Os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2012.
- Mas, A.; Torija, M. J.; González, A.; Poblet, M.; Guillamón, J. M. **Acetic acid bacteria in oenology.** Contributions to Science, v. 3, n. 4, 2007, p. 511–521.
- Mayser, P.; Fromme, S.; Leitzmann, C.; Grunder, K. **The yeast spectrum of the ‘tea fungus Kornbucha’.** Mycoses, v. 38, 1995, p. 289-295.
- Mayo, B.; Piekarczy, T.A.; Fernandez, M.; Kowalczyk, M.; Martin, P.A.; Bardowski, J. Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. In: Mozzi, F.; Raya, R.R.; Vignolo, G.M.(org), **Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications.** 1a Ed. Ames, Usa, 2010, Cap. 1, P. 3 - 33.
- Midura, T. F.; Bryant, R. G. *Sampling plants, sample collection, shipment and preparation for analysis.* In: Downes, F. P.; Ito, K. (org), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.** American Public Health Association, Washington, DC, 2001. Cap. 2, p. 13-23.
- Mo, H.; Zhu, Y.; Chen, Z. **Microbial fermented tea: a potential source of natural preservatives.** Trends in Food Science and Technology, v. 19, n. 3, 2008, p. 124-130.
- Moraes, F. P.; Colla, L. M. **Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde.** Revista Eletrônica de Farmácia, v. 3, n. 2, 2006, p. 109-122.
- Morais, S. M.; Cavalcanti, E. S. B.; Costa, S. M. O.; Aguiar, L. A. **Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 19, n. 1B, 2009, p. 315-320.
- Morton, R. D. Aerobic plate count, In: Downes, F. P.; Ito, K. (org), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.** American Public Health Association, Washington, DC, 2001. Capítulo 7, p. 63-67.
- Neffe-Skocińska, K.; Sionek, B.; Ścibisz, I.; Kołożyn-Krajewska, D. **Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties.** Journal of Food, 2017.

Oliveira, A. L. D; Santos Junior, V.; Liotti, R, G.; Zilioli, E.; Spinosa, W. A.; Ribeiro-Paes, J. T. **Estudo de bactérias do gênero *Gluconobacter*: isolamento, purificação, identificação fenotípica e molecular.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 30, n. 1, 2010, p. 106-112.

Oliveira, M. N.; Sivieri, K.; Alegro, J. H. A.; Saad, S. M. I. **Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 38, n. 1, 2002.

Patel, R. V.; Thaker, V. T.; Patel, V. K. **Antimicrobial activity of ginger and honey on isolates of extracted carious teeth during orthodontic treatment.** Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, v. 1, n. 1, suplemente, 2011, p. S58-S61.

Raspor, P.; Goranovič, D. **Biotechnological applications of acetic acid bacteria.** Critical Reviews in Biotechnology, v. 28, n. 2, 2008, p. 101-124.

Reiss, J. **Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus.** Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung, v. 198, n. 3, 1994, p. 258-261.

Romano, P.; Capece, A.; Jespersen, L.. *Taxonomic and Ecological Diversity of Food and Beverage Yeasts.* In: Querol, A.; Fleet, G.H. (org.). **Yeasts in food and beverages.** Vol. 2, 2006. Cap. 2.

Saad, S. M. I. **Probióticos e prebióticos: o estado da arte.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 42, n. 1, 2006, p. 1-16.

Sanders, M. E. **Overview of Functional Foods: Emphasis on Probiotic Bacteria.** Dairy Journal, v. 8, n. 5-6, 1998, p. 341-347.

Seeramulu, G.; Zhu, Y.; Knol, W. **Kombucha fermentation and its antimicrobial activity.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 48, n. 6, 2000, p. 2589-2594.

Semjonovs, P.; Denina, I.; Linde, R. **Evaluation of physiological effects of Acetic bacteria and yeast fermented non-alcoholic beverage consumption.** Journal of Medical Sciences, v. 14, 2014, p. 147-152.

Steinkraus, K. H. **Fermentation in world food processing.** Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, San Francisco, v.1, n. 1, p.23-31, 2002.

Steinkraus, K. H., Shapiro, K. B., Hotchkiss, J. H., Mortlock, R. P. **Investigations into the Antibiotic Activity of Tea Fungus/Kombucha Beverage.** Engineering in Life Science, v. 16, n. 2-3, 1996, p. 199-205.

Suhartatik, N.; Karyantina, M.; Marsono, Y.; Rahayu, E. S.; Kuswanto, K. P. **Kombucha as anti hypercholesterolemic agent (in vitro study using SD rats).** The 3rd International Conference of Indonesian Society for Lactic Acid Bacteria (3rd IC-ISLAB): Better Life with Lactic Acid Bacteria: Exploring Novel Functions of Lactic Acid Bacteria, 2011.

Teoh, A. L.; Heard, G.; Cox, J. **Yeast ecology of kombucha fermentation.** International Journal of Food Microbiology, v.95, n. 2, 2004, p.119-126.

Tsuru, V. H. **Kombucha: bebida fermentada não alcoólica, de chá oolong ou erva-mate.** Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

Velićanski, A.; Dcvetković, D.; Markov, S. **Characteristics of Kombucha fermentation on medicinal herbs from Lamiaceae Family.** Romanian Biotechnological Letters, v. 18, n. 1, 2013.

Vidal, A.M.; Dias, D.O.; Martins, E.S.M.; Oliveira, R.S.; Nascimento, R.M.S.; Correia, M.G.S. **A ingestão de alimentos funcionais e a sua contribuição para a diminuição da incidência de doenças.** Caderno de Graduação – Ciências Biológicas e da Saúde, v. 1, n.15, 2012, p. 43-52.

Young, Q.V. **Epidemiological Evidence Linking Tea Consumption to Human Health: A Review.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 54, 2014.

Zaveri, N. T. **Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer application.** Life Science, v. 78, n. 18, 2006, p. 2073-2080.

ANEXOS

Anexo A: Composição informada no rótulo dos meios de cultura utilizados.

Meio	Composição	Quantidade (g/l)
OSA	Soro de Laranja	10,0
	Extrato de levedura	3,0
	Digerido pancreático de caseína	10,0
	Dextrose	4,0
	Fosfato de potássio (KH ₂ PO ₄)	2,5
	Agar	15,5
PCA	Digerido pancreático de caseína	5,0
	Extrato de levedura	3,5
	Dextrose	1,0
	Agar	15,0

Anexo B: Valores de p encontrados na ANOVA *two-way*, entre os meios de cultura utilizados e o tempo de armazenamento, com os resultados da contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos expressos em log₁₀/ml.

Amostra	Análise	Tempo (dias)				
		0	15	45	60	90
Maçã com canela	PCA	4,57	5,86	5,38	5,48	5,43
	OSA	7,11	7,79	7,95	7,36	7,67
	ANOVA (valor de p)	p < 0,001	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,05	p < 0,01
Manga	PCA	5,11	5,15	4,48	4,45	4,30
	OSA	8,86	8,97	9,15	8,86	7,99
	ANOVA (valor de p)	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001
Gengibre com limão siciliano e mel	PCA	-	2,26	2,04	1,98	2,06
	OSA	-	-	2,77	3,11	2,35
	ANOVA (valor de p)	-	-	P < 0,01	P < 0,01	P > 0,05
Maracujá	PCA	7,08	4,30	3,54	4,65	4,41
	OSA	7,30	8,36	8,74	8,65	8,81
	ANOVA (valor de p)	P > 0,05	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001
Melancia com gengibre	PCA	-	3,23	3,34	3,08	2,56
	OSA	7,56	8,64	8,73	8,60	8,43
	ANOVA (valor de p)	-	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001