



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



HEVELYNN FRANCO MARTINS

**PRODUÇÃO DE KOMBUCHA UTILIZANDO DISTINTOS TIPOS DE
AÇÚCARES E CHÁS: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA
MICROBIOTA E AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PROCESSO
FERMENTATIVO**

Ficha catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteadó - UEFS

Martins, Hevelynn Franco
M343p Produção de Kombucha utilizando distintos tipos de açúcares e
chás: caracterização molecular da microbiota e avaliação físico-química
do processo fermentativo / Hevelynn Franco Martins. – 2025.
161f. : il

Orientador: Ernesto Acosta Martinez
Coorientadores: Giovani Brandão Mafra de Carvalho, Leila Thaise
Santana de Oliveira Santos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Feira de Santana.
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2020.

1. Kombucha. 2. Microbiota. 3. Bebida funcional. 4. Fermentação.
5. *Scooby*. I. Martinez, Ernesto Acosta, orient. II. Carvalho, Giovani
Brandão Mafra de, coorient. III. Santos, Leila Thaise Santana de,
coorient. IV. Universidade Estadual de Feira de Santana. Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia. V. Título.

CDU: 663.8

HEVELYNN FRANCO MARTINS

**PRODUÇÃO DE KOMBUCHA UTILIZANDO DISTINTOS TIPOS DE
AÇÚCARES E CHÁS: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA
MICROBIOTA E AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PROCESSO
FERMENTATIVO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de
Santana, como requisito parcial para a obtenção do
título de Doutora em Biotecnologia.

Profº Dr. Ernesto Acosta Martinez (Orientador)

Profº Dr. Giovani Brandão Mafra de Carvalho (Coorientador)

Profª Drª Leila Thaise Santana de Oliveira Santos
(Coorientadora)

HEVELYNN FRANCO MARTINS

**“Produção de Kombucha utilizando distintos tipos de açúcares e chás:
caracterização molecular da microbiota e avaliação físico-química do
processo fermentativo”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, área de concentração em Biotecnologia com ênfase em Recursos Naturais da Região Nordeste, como requisito para obtenção do grau de doutor, tendo sido aprovada pelos membros signatários abaixo.

Feira de Santana, 25 de fevereiro de 2025.

Documento assinado digitalmente
 **ERNESTO ACOSTA MARTINEZ**
Data: 26/02/2025 11:26:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientador: Prof. Dr. **Ernesto Acosta Martínez**
Universidade Estadual de Feira de Santana

Documento assinado digitalmente
 **SILVIA MARIA ALMEIDA DE SOUZA**
Data: 11/03/2025 16:48:27-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membra: Prof^a. Dr^a. **Silvia Maria Almeida de Souza**
Universidade Estadual de Feira de Santana

Documento assinado digitalmente
 **ANGELICA MARIA LUCCHESI**
Data: 10/03/2025 10:03:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membra: Prof^a. Dr^a. **Angélica Maria Lucchese**
Universidade Estadual de Feira de Santana

Documento assinado digitalmente
 **FERNANDA PALLADINO PEDROSO**
Data: 10/03/2025 12:41:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membra: Prof^a. Dr^a. **Fernanda Palladino Pedroso**
Universidade Federal de São João del-Rei

Documento assinado digitalmente
 **RITA DE CÁSSIA LACERDA BRAMBILLA RODRIGUES**
Data: 07/03/2025 09:58:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membra: Prof^a. Dr^a. **Rita de Cássia Lacerda Brambilla Rodrigues**
Universidade de São Paulo

DEDICATÓRIA

Escolhi o tema de pesquisa quando minha avó Dalva havia sido diagnosticada com câncer cerebral e procurei uma forma, enquanto Engenheira de Alimentos e Mestra em Biotecnologia na qual o meu projeto pudesse ajudar a melhorar a sua imunidade e de todos que estivessem precisando. Infelizmente, não tive tempo de ajuda-la, mas este estudo poderá auxiliar na saúde de outras pessoas e, principalmente, poderá ajudar na qualidade de vida daqueles que eu amo. Portanto, com imensa gratidão no meu coração, dedico este trabalho a Deus, à minha família e a todos que eu puder auxiliar com estes resultados.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Dessa forma, agradeço à Universidade Estadual de Feira de Santana por todos os anos de estudo e amadurecimento pessoal e intelectual na instituição. Estendo meus agradecimentos a todos do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pelo incentivo e grandes parceiras proporcionadas que facilitaram o desenvolvimento do meu estudo. Bem como, a toda equipe da Universidade Federal de Minas Gerais pela parceria nas análises mais complexas de metagenômica bem como ao Instituto Federal do Sertão Pernambucano e ao Prof. Dr. Marcos Santos e a Profª Drª Ana Júlia Carvalho pela parceria nas análises em HPLC.

Agradeço a Deus por todo amor e por me cercar de pessoas tão importantes que contribuíram para a realização desse grande sonho de menina.

Aos meus amados pais, Claudio e Daniella, para quem eu ofereço sempre o que há de melhor em mim. Agradeço por toda dedicação, por todo amor, por cada escolha que fizeram ao me darem uma educação de qualidade mesmo quando isso significava adiar algum plano de vocês. Obrigada por me ensinarem a ser forte e resiliente em meio às tempestades e, principalmente, por acreditarem e confiarem tanto em mim. Os pais jovens e subestimados estão formando uma filha Doutora e com muita responsabilidade e amor no que faz, foram vocês quem me tornaram a mulher e profissional que hoje sou. Meu eterno respeito e gratidão. Vou honrá-los sempre.

Agradeço aos meus irmãos Lipe e Teco bem como as irmãs que vocês me deram de presente, Amanda e Lari, por todo incentivo, carinho e apoio incondicional.

Agradeço a Vó Ene, por cada palavra de carinho, cada conselho, por cada vez que chorei em seu colo, por acreditar tanto no meu potencial e me oferecer tanto amor que me fazia sentir meus avós (*in memoriam*) Daniel, Dalva e Nelson sempre por perto, me enchendo de bênçãos, amor e luz.

Agradeço aos meus tios (Tio Marcello, Tia Dinha, Tio Marcelo, Tio Neto) e primos (Florzinha, William, Rafa, Di e Ti) queridos que mesmo longe fisicamente, sempre estiveram presentes, demonstrando orgulho, apoiando minhas decisões e me encorajando. Agradeço a Tia Bel, em especial, pois não apenas me viu crescer e me apoiou em tudo, como esteve ao meu lado nos momentos bons e ruins, me fazendo acreditar que sou capaz de conquistar absolutamente o que quiser, honrando os ensinamentos dos meus avós.

A ele, meu noivo, Vi, devo minha gratidão pela compreensão, por muitas vezes, entender a minha ausência, minhas noites em claro, meu cansaço, e até mesmo, se interessar

pelos assuntos que eu amo, escutando-me sempre com muito carinho e dedicação. Eu me sinto honrada ao ver o brilho nos seus olhos quando fala de mim e é extremamente recíproco, eu tenho o mesmo orgulho de você, jamais esqueça isso. Sou muitíssimo grata por me apoiar incondicionalmente e me ajudar a enfrentar esses anos difíceis do doutorado.

Aos meus amados alunos e pesquisadores, vocês não fazem ideia do quanto importantes são para mim e o quanto me espelho em vocês para continuar dando conta de tudo com alegria e muita vontade de fazer a diferença na vida de cada um.

Aos gestores e colegas das minhas duas escolas (Colégio Estadual Professor Carlos Valadares, em Santa Bárbara e Colégio Estadual Luiz Viana Filho, em Candeias) que foram essenciais e me permitiram conciliar o doutorado com muita compreensão e confiança no meu trabalho. Gratidão!

Durante esse estudo, conquistei uma rede de apoio e muitas pessoas foram fundamentais na pesquisa científica e me auxiliaram a me tornar Dr^a em Biotecnologia, mas não apenas pelo título e sim, pelo amor à profissão. Vou honrar o esforço de cada um de vocês:

Primeiramente, a Renato Pereira, que se tornou um grande amigo e incentivador. Obrigada pelo apoio além das discussões e estatísticas dos artigos. Mas pelos conselhos e amizade conquistadas. Vou estar sempre torcendo por você também, muito obrigada.

Meu agradecimento especial ao meu querido pai na pós-graduação, como costumo brincar, Prof. Dr. Ernesto Martinez. O Sr. realmente é um ser humano de muita luz e me ajudou muito no meu amadurecimento intelectual e pessoal. Sorte a minha ter o sr como meu orientador. Obrigada pelos puxões de orelha, pelas gargalhadas, pelos conselhos e até pelas cobranças, pois me moldaram a profissional dedicada que me tornei. O sr é minha referência como profissional e como pessoa. Gratidão!

Agradeço a minha querida coorientadora, Prof^a Dr^aa. Leila Thaise, profissional muito solícita, dedicada e competente, devo meus sinceros agradecimentos por ser uma grande incentivadora e parceira. Bem como ao meu querido coorientador, Prof. Dr. Giovanni Brandão, agradeço pela parceria e apoio de sempre.

Como não agradecer a um parceiro de trabalho que se tornou uma grande referência para mim: Prof Dr Aristóteles Gois. Gratidão pelo comprometimento, conselhos e apoio neste estudo. E ao querido Porf. Dr. Cosme Barbosa pela parceria no meu aprendizado, conselhos e pela delicadeza comigo.

Muito obrigada a todos, por tudo e por tanto!

“Um dos segredos do sucesso é se recusar a
deixar que revezes temporários nos derrotem”.

Mary Kay

RESUMO

A Kombucha é uma bebida fermentada obtida pela ação de uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras sobre o mosto de *Camellia sinensis* e açúcares, sendo amplamente consumida devido aos seus potenciais benefícios à saúde. No entanto, a influência de diferentes fontes de açúcares no processo fermentativo e na composição microbiológica, química e bioativa da bebida ainda carece de estudos sistemáticos. Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito de xaropes de guaraná, mel e açúcar cristal na fermentação da Kombucha, analisando suas características microbiológicas, físico-químicas e bioativas, além da viabilidade econômica da produção em microescala. Os ensaios foram conduzidos conforme um planejamento fatorial, com análise da microbiota por metabarcoding (*Amplicon Sequence Variants* e *Operational Taxonomic Units*), caracterização de ácidos orgânicos, compostos fenólicos, fibras, capacidade antioxidante e avaliação tecnológica de patentes. Os resultados indicaram que a fermentação com xarope de guaraná apresentou maior consumo de glicose (64%) e frutose (64%), com acúmulo de ácido cítrico (1,60 g L⁻¹), ácido tartárico (0,39 g L⁻¹) e álcool (0,8%) após 12 dias. A Kombucha adoçada com mel acumulou ácido acético (16,93 g L⁻¹), ácido láctico (0,14 g L⁻¹), acidez total (1,31 g.100mL⁻¹), acidez volátil (1,01 g.100mL⁻¹) e maior biomassa de Scoby, com maltose (21,87 g L⁻¹). O gênero *Komagataeibacter* predominou em todas as amostras, com variações na diversidade microbiana conforme o tipo de chá e adoçante. A análise dos compostos fenólicos revelou maior preservação de epicatequina galato e epigallocatequina galato nos tratamentos com chá verde, enquanto o mel modulou a conversão fenólica. A atividade antioxidante, avaliada pelos métodos DPPH e FRAP, foi superior nas bebidas preparadas com chá verde, sugerindo maior estabilidade dos compostos bioativos. Os testes utilizando chá preto e verde (50-50%) adoçado com mel e xarope de guaraná apresentaram maior teor de celulose (2,42-2,55%), holocelulose (5,06-5,59%), hemicelulose (2,51-2,98%) e lignina insolúvel de Klason (4,05-4,58%). A análise de patentes identificou 365 registros no Espacenet, com a China liderando (63%), e apenas 10 no INPI entre 2017 e 2022, com pico em 2020. A viabilidade econômica indicou custo unitário de R\$ 4,77 por garrafa de 500 mL e lucro de 50% por unidade vendida. Este estudo contribui para a valorização de matérias-primas regionais e para o desenvolvimento de produtos funcionais inovadores, agregando conhecimento ao setor de bebidas fermentadas.

PALAVRAS-CHAVE: Kombucha, microbiota, bebida funcional, fermentação, *Scoby*.

ABSTRACT

Kombucha is a fermented beverage produced by the action of a symbiotic culture of bacteria and yeast on *Camellia sinensis* must and sugars, and is widely consumed due to its potential health benefits. However, the influence of different sugar sources on the fermentation process and on the microbiological, chemical and bioactive composition of the beverage still lacks systematic studies. Thus, this study aims to evaluate the effect of guarana syrups, honey and crystal sugar on the fermentation of Kombucha, analyzing their microbiological, physicochemical and bioactive characteristics, in addition to the economic predictions of microscale production. The tests were conducted according to a factorial design, with analysis of the microbiota by metabarcoding (Amplicon Sequence Variants and Operational Taxonomic Units), characterization of organic acids, phenolic compounds, fibers, antioxidant capacity and technological evaluation of patents. The results indicated that fermentation with guarana syrup presented higher consumption of glucose (64%) and fructose (64%), with accumulation of citric acid (1.60 g L^{-1}), tartaric acid (0.39 g L^{-1}) and alcohol (0.8%) after 12 days. Kombucha sweetened with honey accumulated acetic acid (16.93 g L^{-1}), lactic acid (0.14 g L^{-1}), total acidity ($1.31 \text{ g.100mL}^{-1}$), volatile acidity ($1.01 \text{ g.100mL}^{-1}$) and higher Scoby biomass, with maltose (21.87 g L^{-1}). The genus *Komagataeibacter* predominated in all samples, with variations in microbial diversity according to the type of tea and sweetener. The analysis of phenolic compounds revealed greater preservation of epicatechin gallate and epigallocatechin gallate in treatments with green tea, while honey modulated phenolic conversion. The antioxidant activity, evaluated by DPPH and FRAP methods, was higher in beverages prepared with green tea, suggesting greater stability of the bioactive compounds. The tests using black and green tea (50-50%) sweetened with honey and guarana syrup showed higher content of cellulose (2.42-2.55%), holocellulose (5.06-5.59%), hemicellulose (2.51-2.98%) and Klason insoluble lignin (4.05-4.58%). The patent analysis identified 365 registrations in Espacenet, with China leading (63%), and only 10 in INPI between 2017 and 2022, with a peak in 2020. The economic viability indicated a unit cost of R\$ 4.77 per 500 mL bottle and a profit of 50% per unit sold. This study contributes to the valorization of regional raw materials and to the development of innovative functional products, adding knowledge to the fermented beverage sector.

KEYWORDS: Kombucha, microbiota, functional beverage, fermentation, Scoby.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	12
REFERÊNCIAS.....	15
OBJETIVOS.....	17
APRESENTAÇÃO DA TESE.....	18
<i>CAPÍTULO 1: Kombucha: uma revisão de literatura.....</i>	<i>19</i>
<i>CAPÍTULO 2: Prospecção tecnológica e análise de patentes de kombucha de chás verde e preto adoçadas com mel de abelha e xarope de guaraná.....</i>	<i>42</i>
<i>CAPÍTULO 3: Propriedades físico-químicas de kombuchas de chá preto produzidas com diferentes adoçantes e determinação do teor de fibras do Scobys.....</i>	<i>62</i>
<i>CAPÍTULO 4: Crescimento do Scoby, compostos fenólicos, atividade antioxidante e cinética da fermentação de kombuchas produzidas com diferentes adoçantes e chás.....</i>	<i>86</i>
<i>CAPÍTULO 5: Variação temporal das características físico-químicas e da comunidade bacteriana (metabarcoding) de kombuchas produzidas com distintos tipos de chás e adoçantes.....</i>	<i>113</i>
<i>CAPÍTULO 6: Viabilidade econômica da produção de kombucha com xarope de guaraná e mel de abelha.....</i>	<i>142</i>
CONCLUSÃO GERAL.....	160

INTRODUÇÃO GERAL

No contexto hodierno, o mundo vive mudanças históricas no que diz respeito à saúde e ao bem-estar. A busca por uma vida mais saudável e equilibrada tem sido uma meta a ser alcançada por muitas pessoas, tendo em vista o surgimento de novos problemas de saúde, seja por conta da densidade demográfica, ou pelo intenso processo de comercialização de produtos, além do ressurgimento e fortalecimento de vírus e bactérias (SCHATZMAYR, 2001). O conceito de uma alimentação mais saudável tem se popularizado como uma questão essencial para a promoção da saúde e bem-estar, especialmente em um mundo globalizado, onde o distanciamento humano em relação aos alimentos se intensifica devido à industrialização e à massificação de cardápios. Segundo Proença (2010), a busca por alimentos saudáveis, tanto novos quanto tradicionais, reflete uma tentativa de reconexão com práticas alimentares mais sustentáveis e culturalmente significativas.

Deste modo, a Kombucha, uma bebida funcional e de origem asiática, vem se popularizando no Brasil e no mundo. A mesma se caracteriza como uma bebida fermentada por uma cultura simbiótica de leveduras e bactérias (*Scoby*, do inglês *Symbiotic Colony of Bacteria and Yeast*, responsável pelo processo de fermentação, sabor ácido e gaseificação da kombucha) com chá e açúcar (CHEN, LIU, 2000) com diversos estudos associados à sua capacidade de fortalecimento imunológico (MAGALHÃES *et al.*, 2011).

A provável origem da kombucha remonta à Manchúria, no nordeste da China, por volta de 221 a.C., sendo chamada de “chá da imortalidade” (SANTOS, 2016). Relatos históricos em diferentes culturas apontam os benefícios do consumo da kombucha que está associado ao tratamento e prevenção de problemas digestivos, circulatórios, retardo de envelhecimento (PISTELLI, COSTA, 2010). Segundo Martins *et al.* (2023) a kombucha ajuda a tratar e prevenir distúrbios respiratórios e digestivos, e também é uma rica fonte de antioxidantes, enzimas digestivas e vitaminas B. Seu efeito probiótico ajuda a equilibrar a flora intestinal, o que ajuda a desintoxicar o organismo e fortalecer o sistema imunológico, além de ajudar a combater infecções urinárias. Pesquisas conduzidas por Kapp e Sumner (2019) destacaram as propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes do kombucha, que também demonstrou reduzir os níveis de colesterol e melhorar a saúde cardiovascular.

A composição química da kombucha pode ser influenciada por fatores como o tipo e a concentração do chá e a fonte de carboidrato que afetam o perfil de compostos bioativos e o sabor da bebida e impactam diretamente na qualidade e aceitação do produto (WANG *et al.*,

2023); os tipos de microrganismos no inóculo; e o tempo de fermentação e as condições de armazenamento que influenciam na síntese de ácidos orgânicos e outros metabólitos, bem como na estabilidade microbiológica do produto (GRASSI *et al.*, 2022; MARTINS *et al.*, 2023).

O presente trabalho visa avaliar a elaboração da Kombucha a partir da fermentação de chás verde e preto em xaropes de guaraná, mel e açúcar cristal sobre os diferentes aspectos do processo de fermentação. Primeiramente, foi realizada uma caracterização microbiológica dos *Scobys* e das bebidas fermentadas por meio de análises metagenômicas, utilizando métodos avançados como *Amplicon Sequence Variants* (ASV) e *Operational Taxonomic Units* (OTU). Além disso, a composição físico-química das matérias-primas empregadas, como mel e xarope de guaraná, é avaliada minuciosamente, fornecendo subsídios para compreender a influência desses insumos no processo fermentativo.

Outro ponto focal do estudo é a análise da produção de compostos bioativos durante a fermentação da Kombucha, incluindo ácidos orgânicos, compostos fenólicos e capacidade antioxidante, em função das diferentes fontes de açúcares e chás preto e verde. A caracterização físico-química dos *Scobys* gerados ao final da fermentação também é abordada, incluindo aspectos como umidade e composição química. No contexto regulatório, o trabalho buscou determinar padrões de qualidade e identidade para as bebidas fermentadas, de acordo com os critérios estabelecidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2019).

Além de abordar aspectos técnicos e científicos, a pesquisa também avalia a viabilidade econômica da produção de Kombucha adoçada com xarope de guaraná e mel em escala industrial, fornecendo insights para sua inserção no mercado. A exploração tecnológica e a análise de patentes relacionadas ao kombucha revelam seu enorme potencial de inovação no mercado de bebidas funcionais (MARTINS *et al.*, 2024). Pesquisas mostram que há um enorme potencial para o desenvolvimento de novos produtos e aplicações combinando ingredientes como chá verde, chá preto e fontes de açúcares naturais como mel e xarope de guaraná.

A produção de Kombucha é um campo dinâmico e promissor, com patentes registradas em todo o mundo nas áreas de alimentos e bebidas, cosméticos e biotecnologia (MARTINS *et al.*, 2025). A identificação de tendências tecnológicas por meio de bancos de dados como INPI e *Espacenet* destaca países como China e Coreia do Sul como líderes em inovação nessa área, enquanto o Brasil se mostra cada vez mais influente, principalmente por meio de suas instituições de ensino superior. Esses avanços ressaltam a importância da colaboração entre indústria, universidade e pesquisa para concretizar todo o potencial econômico e funcional do kombucha. Portanto, a presente pesquisa busca realizar uma análise de tendências e inovação no setor de Kombucha, por meio da prospecção tecnológica de patentes, destacando

formulações e processos produtivos inovadores. Assim, esta tese contribui para o avanço do conhecimento científico e tecnológico no campo das bebidas fermentadas.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa nº 41/2019, de 17 de setembro de 2019**. Estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha em todo território nacional. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, ed. 181, p. 13, 18 set. 2019.
- CHEN, C.; LIU, B. Y. **Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation**. Journal of Applied Microbiology, England, v. 89, n. 5, p. 834-839, 2000.
- GRASSI, A., CRISTANI, C., PALLA, M., DI GIORGI, R., GIOVANNETTI, M., AGNOLUCCI, M. (2022) **Tempo de armazenamento e temperatura afetam a dinâmica microbiana de leveduras e bactérias do ácido acético em uma bebida de kombucha**. Int J Food Microbiol. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109934>
- KAPP, J. M.; SUMNER, W. Kombucha: **A systematic review of the empirical evidence of human health benefit**. *Annals of epidemiology*, v. 30, p. 66-70, 2019.
- MAGALHÃES, K. T; PEREIRA, G. V. M; CAMPOS, C. R; DRAGONE, G; SCHWAN, R. F. **Brazilian kefir: microbial communities and chemical composition**. Brazilian Journal of Microbiology, v. 42, p. 693 – 702, 2011.
- MARTINS, HF, DE OLIVEIRA SANTOS, LTS, DE CARVALHO, GBM, & MARTINEZ, EA **Viabilidade econômica da produção de kombuchá com xarope de guaraná e mel**. Observatório De La Economía Latinoamericana , v. 10, pág. e7455-e7455, 2024b. 2025.
- MARTINS, HF, SANTOS, LTS DE O., CARVALHO, GBM DE, LIMA, RP DE, LIMA, M. DOS S., ARAÚJO, AJ DE B., & MARTINEZ, EA **Qualidade física de kombuchas de chá preto adoçadas com mel de abelha e xarope de guaraná**. *Em Anais do 15º SLACAN - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos e Nutrição*, ISBN: 978-65-89463-70-2, 2024a.
- MARTINS, H.F., SANTOS, L.T.S.O., CARVALHO, G.B.M., MARTINEZ, E.A. (2023) **Kombucha: uma revisão de literatura**. CED. <https://doi.org/10.55905/cuadv15n10-065>
- PISTELLI, G. C., COSTA, C. E. M. **Bactérias intestinais e obesidade**. Revista Saúde e Pesquisa, v. 3, n. 1, p. 115-119, jan./abr. 2010.
- PROENÇA, Rossana Pacheco da Costa. **Alimentação e globalização: algumas reflexões**. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v. 62, n. 4, p. 1-10, out. 2010. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br>. Acesso em: 13 abr. 2025.

SANTOS, M. J. **Kombucha: caracterização da microbiota e desenvolvimento de novos produtos alimentares para uso em restauração.** 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia dos Alimentos) — Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2016.

SCHATZMAYR, Hermann G. **Viroses emergentes e reemergentes.** *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 17, supl., 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-311X2001000700031>>. Acesso em: 10 abr. 2025.

WANG, B., RUTHERFURD-MARKWICK, K., NAREN, N., ZHANG, X.X., MUTUKUMIRA, A.N. (2023) **Características microbiológicas e físico -químicas do chá preto Kombucha fermentado com uma cultura inicial da Nova Zelândia.** Alimentos. <https://doi.org/10.3390/foods12122314>

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Investigar o processo fermentativo da Kombucha utilizando diferentes fontes de açúcares e chás, analisando o impacto dessas variações na microbiota fermentativa, na composição físico-química e bioativa da bebida, e na sua viabilidade econômica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar microbiologicamente os *Scobys* e as bebidas fermentadas por meio de análise metagenômica, utilizando *Amplicon Sequence Variants* (ASV) e *Operational Taxonomic Units* (OTU).
- Analisar a composição físico-química das matérias-primas utilizadas na fermentação, incluindo mel e xarope de guaraná.
- Avaliar a produção de compostos bioativos durante a fermentação da Kombucha, incluindo ácidos orgânicos, compostos fenólicos e capacidade antioxidante, considerando diferentes fontes de açúcares e chás.
- Caracterizar físico-quimicamente os *Scobys* gerados após a fermentação, incluindo umidade e composição química.
- Determinar os padrões de qualidade e identidade das bebidas fermentadas com base nos critérios estabelecidos pela legislação brasileira.
- Avaliar a viabilidade econômica da produção de Kombucha adoçada com xarope de guaraná e mel de abelha em escala industrial.
- Analisar tendências e inovação no setor de Kombucha por meio da prospecção tecnológica de patentes, identificando formulações e processos produtivos relevantes.

APRESENTAÇÃO DA TESE

A tese está estruturada em capítulos conforme a descrição a seguir:

Capítulo 1: “*Kombucha: a literature review*”. Artigo publicado na Revista *Cuadernos de Educación y Desarrollo*.

Capítulo 2: “*Technological prospecting and patent analysis of kombucha made from green and black teas sweetened with honey and guarana syrup*”. Artigo publicado na Revista *Caderno Pedagógico*.

Capítulo 3: “*Technological prospecting and patent analysis of kombucha made from green and black teas sweetened with honey and guarana syrup*”. Artigo em avaliação.

Capítulo 4: “*Scoby growth, phenolic compounds, antioxidant activity and fermentation kinetics of kombuchas produced with different sweeteners and teas*”. Artigo em avaliação.

Capítulo 5: “*Temporal variation of the bacterial community (metabarcoding) and physicochemical characteristics of kombuchas produced with different types of teas and sweeteners*”. Artigo em avaliação.

Capítulo 6: “*Economic viability of the production of kombucha with guarana syrup and bee honey*”. Artigo publicado na Revista *Observatorio de la Economía Latinoamericana*.

CAPÍTULO 1

Kombucha: uma revisão de literatura



Kombucha: a literature review

Kombucha: uma revisão de literatura

Hevelynn Franco Martins

PhD in Biotechnology in the Graduate Program in Biotechnology (PPGBiotec)

Institution: Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

Address: Av. Transnordestina, s/n, Feira de Santana, Novo Horizonte - BA,

CEP: 44036-900

E-mail: hevelynn_martins@hotmail.com

Leila Thaise Santana de Oliveira Santos

PhD in Biotechnology

Institution: Centro Universitário Nobre (UNIFAN)

Address: Av. Bela Vista, 26, Jardim Esmeraldas, Goiânia - GO,

CEP: 74905-020

E-mail: leilathaise@yahoo.com.br

Giovanni Brandão Mafra de Carvalho

Doctor in Industrial Biotechnology

Institution: Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

Address: Av. Transnordestina, s/n, Feira de Santana, Novo Horizonte - BA,

CEP: 44036-900

E-mail: brandao.phd@gmail.com

Ernesto Acosta Martinez

Doctor in Industrial Biotechnology

Institution: Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

Address: Av. Transnordestina, s/n, Feira de Santana, Novo Horizonte - BA,

CEP: 44036-900

E-mail: ernesto.amartinez@uefs.br

ABSTRACT

Kombucha is a fermented beverage obtained through aerobic respiration and anaerobic fermentation of the majority obtained by infusion or extract of *Camellia sinensis* and sugars by symbiotic culture of bacteria and microbiologically active yeasts. It is the fastest growing functional beverage market in the world and there are historical reports in different cultures that point to the benefits of its consumption as an aid in the treatment and prevention of respiratory and digestive diseases, source of antioxidants, digestive enzymes, B vitamins, as well as balance of the intestinal flora due to its probiotic action, helping to detoxify the body, favoring the strengthening of the immune system and helping to fight urinary infections. However, some manufacturers market the drink as a probiotic even without scientific proof, and, in this case, Brazilian legislation prohibits the use of this expression and allows the use of fruits as ingredients for flavoring. Thus, the present work aimed to carry out a bibliographic review on the main



items related to this drink, since its origin, studies that associate its use with immune strengthening, present microorganisms, Brazilian and international legislation, factors that affect fermentative performance, subjects raw materials used in manufacturing as well as market information.

Keywords: fermentation, probiotic, beverages, tea, kombucha.

RESUMO

A Kombucha é uma bebida fermentada obtida através da respiração aeróbia e fermentação anaeróbica do mosto obtido pela infusão ou extrato de *Camellia sinensis* e açúcares por cultura simbiótica de bactérias e leveduras microbiologicamente ativas. É o mercado de bebida funcional que mais cresce no mundo e existem relatos históricos em diferentes culturas que apontam os benefícios do seu consumo como auxílio no tratamento e prevenção de doenças respiratórias e digestivas, fonte de antioxidantes, de enzimas digestivas, de vitaminas do complexo B, bem como equilíbrio da flora intestinal devido à sua ação probiótica, ajudando a detoxificar o organismo, favorece o fortalecimento do sistema imunológico e auxilia no combate de infecções urinárias. Entretanto, alguns fabricantes comercializam a bebida como probiótica mesmo sem comprovação científica, e, nesse quesito, a legislação brasileira proíbe o uso dessa expressão e permite a utilização de frutas como ingredientes opcionais para a saborização. Assim, o presente trabalho teve como objetivo realizar uma revisão bibliográfica sobre os principais itens referentes a essa bebida, desde sua origem, estudos que associam seu uso ao fortalecimento imunológico, microrganismos presentes, legislação brasileira e internacional, fatores que afetam o desempenho fermentativo, matérias-primas utilizadas na fabricação assim como informações do mercado.

Palavras-chave: fermentação, probiótico, bebidas, chá, kombucha.

1 Kombucha

Kombucha is a refreshing drink, slightly sweet and acidic, consumed all over the world. It is obtained from the infusion of tea leaves by fermentation of a symbiotic association of bacteria and yeasts forming the "tea fungus" (CHEN; LIU, 2000). A layer of floating cellulosic film and sour liquid broth are the two portions of Kombucha tea. The natural beverage, without flavoring, tastes like sparkling apple cider and can be produced at home by natural fermentation. Although green tea can be used for its preparation, black tea and white sugar are considered the best substrates (JAYABALAN *et al.*, 2014).



The scoby is a symbiotic culture of acetic acid bacteria (AAB; Komagataeibacter, Gluconobacter and Acetobacter species) (ROOS; VUYST, 2018), lactic acid bacteria (LAB; Lactobacillus, Lactococcus) (MARSH *et al.*,¹2014) and yeasts (Schizosaccharomyces pombe, Saccharomyces ludwigii, Kloeckerapiculata ces cerevisiae, Zygosaccharomyces bailii, Torulasporadelbrueckii, Brettanomyces bruxellensis) (COTON *et al.*, 2017). Its fermentation process also leads to the formation of a floating biofilm on the surface of the growth medium due to the activity of certain strains of AAB (WATAWANA *et al.*, 2016). The main acids present are acetic acid, gluconic acid, tartaric acid, malic acid and to a lesser extent citric acid. All of these acids are responsible for their flavor characteristics (JAYABALAN; MARIMUTHU; SWAMINATHAN, 2007). Real food trends for minimally processed, additive-free, high nutritional value products with health benefits have increased with consumer awareness. In this context, the traditional Kombucha tea recently caught the attention of researchers and consumers for its probiotic characteristics. However, the manufacturing technology, its microbiota, by-products and physicochemical properties are important facts to be considered for industrial production. There are several types of fermentation and products obtained depending on the metabolic pathway followed. Kombucha fermentation is a combination of three of them: alcoholic, lactic, and acetic, due to the presence of various yeasts and bacteria coexisting in the middle. It is started by osmotolerant microorganisms and finally dominated by acid-tolerant species. Several authors have studied the benefits of Kombucha tea, but there is little information on the characterization of its active components, its evolution during fermentation, and its pharmacological activities. In addition, the influence of fermenters, substrates, metabolites and improvements in organoleptic qualities and fermentation kinetics should also be assessed.



2 SOURCE

The origin of kombucha is uncertain and is usually attributed to China. During the Qin dynasty in 200 BCE, the first kombucha would have been created for Emperor Qin Shi Huangdi, who believed he had found the tea of immortality (YOUNG, 2019). However, the name is associated with the existence of Dr. Kombu, who would have taken the tea-based drink from Korea to Japan in 414 CE, to cure the digestive problems of the Japanese emperor Inyoko (PETRUZELLO, 2017). The drink became popular among samurai, who consumed it to increase their strength and energy before a battle (YOUNG, 2019).

Later, the supposed elixir was introduced in European countries, by Portuguese and Dutch explorers, as a medicinal herb (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000). It subsequently spread to the Far East, the Pacific, India, Russia, Germany, and eventually to the rest of Europe and Africa. More recently, kombucha has been widespread worldwide, as a popular remedy for various diseases (OFORI *et al.*, 2015).

During World War I, German scientist Dr. Rudolf Sklenar witnessed Russian peasants using kombucha to aid wounded soldiers. Returning to Germany, he reportedly used the drink in the treatment of cancer patients. On the other hand, during the Second World War, as a consequence of the rationing of tea and sugar, the main inputs for the production of kombucha, the trend of the use of the beverage decreased. In the 1960s, kombucha returned to the market, when the hippies tried natural remedies. The return of its use also occurred, when after the Chernobyl disaster in 1986, a group of frequent consumers of kombucha were found to suffer less from the effects of radiation (YOUNG, 2019).

In the United States, kombucha gained popularity during the HIV epidemic in the late 1980s, as it was believed that the drink could strengthen the compromised immune system (PETRUZELLO, 2017). However, the popularity of the beverage declined after a case study published in 1995 *that linked the product to two cases of severe metabolic acidosis, one of which was fatal* (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1995). Resurging in the early



21st century in the US, and becoming popular also in countries such as Canada and Australia, and more recently in Brazil, with the return of the use of natural products and the growing research in the area of food and functional drinks (VILLAREAL-SOTO *et al.*, 2018).

3 STUDIES THAT ASSOCIATE ITS USE WITH IMMUNE STRENGTHENING

The literature on non-human subjects suggests that Kombucha's health benefits are derived from tea and fermentation products, including glucuronic acid, acetic acid, polyphenols, phenols and B-complex vitamins, including folic acid. Health benefits reported from in vitro and in vivo studies include increased antimicrobial activity, liver and gastrointestinal functions, immune stimulation, detoxification, antioxidant, antitumor, prophylactic to health and recovery effects through immune stimulation; inhibiting the development and progression of cancer, cardiovascular diseases, diabetes and neurodegenerative diseases; and normal central nervous system function.

The kombucha has been growing very fast in the market of functional drinks. It is referred to as a functional drink due to the numerous health benefits (KAPP and SUMNER, 2019), such as its anti-inflammatory properties, antioxidant activity, for its ability to reduce cholesterol levels and arterial hypertension, improve the immune and gastrointestinal system helping to rebalance the intestinal microbiota, and can improve its functioning and improve blood circulation (SOUSA; FIOROTO, 2019).

Many studies and benefits are known in recent years about probiotics. The promotion of the growth and regulation of the intestinal microbiota are aspects known for a long period, since its immunomodulatory effect is presenting new and great evidence, which prioritizes more and more studies on its action specifically. Improving its prophylactic, growth-promoting and immunomodulatory application are well-known studies that have proven their effectiveness (OLIVEIRA, 2020).

Probiotics have modulatory activity in the immune response, as well as increasing the integrity of the epithelial barrier. Reasons why probiotics are thought to be very likely to be beneficial to humans who have human



immunodeficiency virus (HIV-1) infection. Many studies have already shown that infection can be decreased (FERIA *et al.*, 2017). Very positive results were also found in another study regarding supplementation of humans with HIV infection. By increasing immunity, the risk of opportunistic infections decreases, and the use of probiotics is very beneficial, as they usually have a higher risk of these infections. Thus, the use of probiotics modifies the intestinal microbiota, influencing mucosal integrity and microbial translocation for these humans (LIMA; SOUSA; BEZERRA, 2020).

Visualizing the current global imbalance caused by infection with nCoV2019 (new corona virus 2019) the most common symptoms were fever, cough and body pain or tiredness. Less common symptoms were sputum, headache, and diarrhea. Complications were acute respiratory distress syndrome, heart injury and secondary infection (HUANG, 2020). Even though probiotics are not yet part of the treatment protocols for respiratory viral infections, it is known that the response to the virus and inflammation is very positive. SARS-CoV-2 (Severe Acute Corona Respiratory Syndrome Virus 2) imbalance also infects the gastrointestinal tract and causes inflammation of the absorbent mucosa, which can cause diarrhea. The food industry is developing products called nutraceuticals, which are foods with bioactive substances or even natural products that contain bioactive substances that bring intrinsic nutritional values. In this way probiotics, mainly oral, are products with a very rich potential to modulate the systemic immune system and bring many benefits to humans (INFUSINO *et al.*, 2020).

Recently, the effects of bifidobacteria supplementation have been described in clinical studies that indicate their ability to induce beneficial changes in the GI or to improve the functionality of pre-existing microbial communities through mechanisms such as competition for nutrients, production of growth or inhibition substrates, and modulation of intestinal immunity. Probiotic strains of Lactobacilli improve the integrity of the intestinal barrier, resulting in maintenance of immune tolerance and decrease of bacterial translocation by intestinal mucosa (HEMARAJATA; VERSALOVIC, 2013). Healthy volunteers who underwent a six-



week experiment with the addition of probiotic bacteria (*Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, and *L. rhamnosus*) showed changes in the expression of genes involved in immunity and other mucosal functions (BAARLEN *et al.*, 2011).

4 BRAZILIAN LEGISLATION

According to Brazilian legislation, Kombucha is the fermented beverage obtained through aerobic respiration and anaerobic fermentation of the must obtained by infusion or extract of *Camellia sinensis* and sugars by symbiotic culture of microbiologically active bacteria and yeasts (BRAZIL, 2019).

As the consumption of kombucha has gained popularity worldwide, many people are already producing handcrafted with little or virtually no control of the physico-chemical and microbiological characteristics. In addition, the microorganisms found in kombucha, so far, are not on the ANVISA list of probiotics. And, up until the moment of the writing of this study, the beverage did not fit into any food category of DRC No. 12/2001, which establishes the microbiological control standards for various foods (ANVISA, 2018).

Thus, due to the great interest in expanding the fermentation process to meet the demands of the food industry, the Ministry of Agriculture and Livestock Supply (MAPA) released for public consultation, in June 2018, the norms that intended to establish the standards of identity and quality of the kombuchas produced and marketed in the country (MAPA, 2018). The result was Normative Instruction No. 41/2019 (BRAZIL, 2019), published in the Official Gazette of the Union in September 2019. Thus, Brazil became the first country in the world to have specific legislation regarding kombucha, requiring manufacturers to limit the maximum and minimum parameters (Table 1). In addition to the requirement to declare the alcohol content on the label of products (if it contains alcohol above 0,5% v/v), the use of expressions that attribute characteristics of superlative qualities and functional properties is prohibited. The legislation also authorizes the use of appropriate technological processes for the production of kombucha, such as pasteurization, filtration and ultracentrifugation, and prohibits the addition of microorganisms after the fermentation process.



Table 1. Analytical parameters of kombucha required by Brazilian legislation.

Parameter	Minimum	Maximum
pH	2.5	4.2
Alcoholic graduation (% v/v) kombucha without alcohol	-	0.5
Alcoholic graduation (% v/v) kombucha with alcohol	0.6	8.0
Volatile acidity (mEq/L)	30	130
Pressure (atm at 20°C) in added CO ₂ kombucha	1.1	3.9

Source: Brazil, 2019

5 INTERNATIONAL LAW

In the United States, kombucha, when it has an alcoholic strength of up to 0.5% by volume, is supervised by the FDA (Food and Drug Administration). If the volume of alcohol is equal to or greater than this value, during any stage of processing, since production, bottling or distribution, it is subject to regulation by the TTB (Alcohol and Tobacco Tax and Trade Bureau) (UNITED STATES CODE, 2007).

In this case, the beverage must be produced according to the Internal Revenue Code of 1986 (IRC) standards, obtaining the license to act as a brewery. The producer establishment must comply with the requirements relating to labeling, nutritional composition and taxes levied. The label must contain information such as the producer's trade name, net volume of beverage, nature of product and place of production. For alcoholic beverages, you must comply with the Alcoholic Beverage Labeling Act of 1988 established by the FDA (LOPES, 2019).

6 MICRO-ORGANISMS PRESENT: METAGENOMIC ANALYSIS

The chemical composition of kombucha is very variable, depending on several factors such as the time of fermentation, the type of microorganisms present in the inoculum and the characteristics of the tea base that depend on the water used, type and concentration of tea and sugar (SANTOS, 2006).

Scooby is the common name given to the symbiotic growth of acetic acid bacteria and osmophilic yeast species in a zooglycal matrix that must be grown in sugary tea. According to Jarrell *et al.*, (2000), kombucha is a consortium of



yeasts and bacteria. The formal botanical name *Medusomyces gisevii* was given by Lindau (HESSELTINE, 1965). The tea fungus is not a mushroom. This name is given erroneously due to the bacteria's ability to synthesize a floating cellulose net that looks like a surface mold in an undisturbed and unshaken medium.

As with milk-derived kefir, the exact microbial composition of Kombucha cannot be provided precisely because it varies from drink to drink. It depends on the origin of the inoculum for the fermentation of the tea. One of the clearest accounts of microorganisms found in the kombucha starter was by Hesseltine (1965) who isolated an *Acetobacter* sp. (NRRL B -2357) and 2 yeasts (NRRL YB -4810, NRRL YB-4882) from a Kombucha sample from Switzerland which were subsequently used to produce Kombucha.

The most abundant prokaryotes in this culture belong to the bacterial genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*. The basic bacterium is *Acetobacter xylinum* (DANIELOVA, 1954; KONOVALOV; SEMENOVA, 1955; SIEVERS *et al.*, 1995; ROUSSIN, 1996) which produces a floating cellulosic network on the surface of the liquid in fermentation. The net is the secondary metabolite of Kombucha fermentation, but also one of the unique characteristics of the culture (MARKOV *et al.*, 2001). Sievers *et al.*, (1995), reported that the microflora embedded in the cellulose layer was a mixed culture of *A. xylinum* and *Zygosaccharomyces* sp. The predominant acetic acid bacteria found in tea fungus are *A. xylinum*, *A. pasteurianus*, *A. aceti* and *Gluconobacter oxydans* (LIU *et al.*, 1996). *Gluconacetobacter* sp. A4 (G. Sp. A4), which has strong capacity to produce D-saccharic-1,4-lactone acid (DSL), was the main functional bacterial species isolated from a Kombucha preserved by Yang *et al.*, (2010). Strains of a new species of the genus *Acetobacter*, namely *Acetobacter*. Dutta and Gachhui (2006, 2007) isolated the new nitrogen fixer *Acetobacter nitrogenifigens* sp. and *Gluconacetobacter kombuchae* sp.¹, nitrogen fixator and cellulose producer. nov., from Kombucha tea. Research by Marsh *et al.*, (2014) indicated that the dominant bacteria in 5 Kombucha samples (2 from Canada and one from Ireland, the United States and the United Kingdom) belong to *Gluconacetobacter* (more than 85% in most samples) and *Lactobacillus* (up to 30%) species.



According to the bibliographic review carried out by Jayanbalan *et al.*, 2014, in addition to acetic acid bacteria, there are many yeast species in Kombucha. A broad spectrum of yeasts have been reported, including species of *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida*, *Torulospora*, *Koleckera*, *Pichia*, *Mycotorula* and *Mycoder*. Yeasts of the species *Saccharomyces* have been identified as *Saccharomyces sp.* (KONOVALOV *et al.*, 1959; KOZAKI *et al.*, 1972) and as *Saccharomyces cerevisiae* (HERRERA; CALDERON-VILLAGOMEZ, 1989; LIU *et al.*, 1996; MARKOV *et al.*, 2001; SAFAKams *et al.*, 2002), *Saccharomycoides ludwigii* (REISS, 1987; MARKOV *et al.*, 2001; RAMADANI; ABULREESH, 2010), *Schizosaccharomyces pombe* (REISS, 1987; TEOH *et al.*, 2004), *Zygosaccharomyces sp.* (SIEVERS *et al.*, 1995; MARKOV *et al.*, 2001; MARSH *et al.*, 2014), *Zygosaccharomyces rouxii* (HERRERA; CALDERON-VILLAGOMEZ, 1989) and *Zygosaccharomyces bailii* (HERRERA; CALDERON-VILLAGOMEZ, 1989; LIU *et al.*, 1996; JAYABALAN). The genus *Brettanomyces* has been isolated by several authors. Herrera and Calderon-Villagomez (1989) isolated *Brettanomyces intermedius*, Liu *et al.*, 1996 and Teoh *et al.*, 2004 isolated *Brettanomyces bruxellensis*, and Jayabalan *et al.*, 2008b isolated *B. clausenii*. Pestilence. In the characterization of 2 commercial Kombucha and 32 private household cultures in Germany (MAYSER *et al.*, 1995) showed variable yeast compositions. The predominant yeasts were *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces* and *Saccharomyces spp.* Roussin (1996) determined *Zygosaccharomyces* and *S. cerevisiae* as the yeasts typical of the American Kombucha. Kurtzman *et al.* (2001) isolated an ascosporegenic yeast, *Zygosaccharomyces kombuchaensis sp. n.* (strain NRRL YB-4811, CBS 8849), from Kombucha. An investigation of the physiology of *Z. kombuchaensis sp.* related to the spoilage yeasts *Zygosaccharomyces lentus*, clearly showed that these 2 species were not the same (STEELS *et al.*, 2002).

Barbosa *et al.*, 2021 characterized microbial diversity and its results revealed low diversity of yeast and acetic bacteria species. *Zygosaccharomyces* (*Z. bailii*) and *Komagataeibacter* (*K. rhaeticus*, *K. hansenii*, *K. intermedius*, *K.*



europaues, and *K. xylinus*) are the main genera predominant in Kombucha, respectively.

The presence of other microorganisms has been reported in other studies: *Torula* (REISS, 1987), *Torulopsis* (KONOVALOV et al., 1959; HERRERA; CALDERON-VILLAGOMEZ, 1989; MARKOV et al., 2001), *Torulaspora delbrueckii* (TEOH et al., 20004), V. et al., 1959), AKI et al., 1972; SAFAK et al., 2002) and *Kluyveromyces africanus* (SAFAK et al., 2002).

7 PROCESSING

7.1 FIRST FERMENTATION

Kombucha tea is prepared by placing *scooby* culture in a tea broth with sugar for fermentation. If the Kombucha culture is cultivated according to the standard recipe with black tea sweetened with sucrose, it transforms this substrate into a refreshing drink with high nutritional value and medicinal properties (LONČAR et al., 2000).

The concentrations of tea, sugar and tea fungus used in the must are very varied. The standard procedure is as follows: tap water (1 L) is boiled and during boiling 50 g of sucrose are added and dissolved using stirring. Then 5 g of tea leaves are added and removed by filtration after 5 min. After cooling to room temperature (20°C), the tea is inoculated with 24 g of *scooby* and poured into a beaker (1 L) previously sterilized with boiling water. The growth of undesirable microorganisms is inhibited by the addition of 0.2 L of previously fermented Kombucha, lowering the pH. The beaker is covered with a paper towel to prevent the entry of insects. Incubation is carried out between 20 and 22 °C. The ideal temperature is in the wide range of 18 and 26 °C. In the following days, the newly formed daughter culture begins to float and form a thin, transparent gel-like membrane over the entire available surface of the container. This is the new *scooby* (culture-daughter) newly formed available as a new layer above the first *scooby* (culture-mother), is inoculated to begin fermentation. At this moment, the tea begins to smell like fermented tea and bubbles of gas of the carbonic acid produced during fermentation appear. The mother culture will remain in its



original volume as it sinks into the tea broth, where it remains under the newly formed daughter culture.

7.2 SECOND FERMENTATION

The newly formed *scooby* is removed and kept in a small volume of fermented tea. The rest of the beverage is filtered and stored in bottles closed at 4 °C (REISS, 1994). The taste of Kombucha changes during fermentation from a pleasantly fruity, sour-like sparkling taste after a few days to a mild taste of vinegar after a long incubation period. It is notable that 50 g of sucrose/L provides the optimal concentrations of ethanol and lactic acid, and is thus used in traditional recipes for the preparation of "teakwass" (another name for Kombucha) for a long time (REISS, 1994). Longer fermentation produces high levels of acids (such as mild vinegar) that can pose potential risks when consumed (SREERAMULU *et al.*, 2000).

7.3 FACTORS AFFECTING FERMENTATION PERFORMANCE

For the fermentation process, it is necessary that the microorganisms multiply, so it requires that some conditions, referring to the medium and the substrate, be observed and vary from organism to organism. The main interfering conditions are pH, redox potential, nutrient content, microbiota and temperature. The pH measures the concentration of H⁺ in the solution and the higher the concentration of H⁺, the lower the pH and the more acidic the substance (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008).

Another factor that influences fermentation is the presence or not of oxygen that contributes to the redox potential of the environment. Thus, microorganisms can be classified into aerobic (oxygen-requiring), anaerobic (oxygen-free), and optional (if they develop in the presence and absence of oxygen). In fermentation, the nutrient content factor interferes with the microbiota and the development of metabolites, as well as interfering with the aroma and taste of food (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008).



Microorganisms may compete with each other or one may favor the growth of the other by constituting metabiosis. When the conditions are right for all kinds of microorganisms to grow, bacteria grow faster than yeasts and these grow faster than molds. And finally, temperature affects the growth of microorganisms, there is an optimum temperature and as this aspect varies the growth speed decreases until the microorganisms stop multiplying (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008).

In Kombucha's fermentation process, ethanol, lactic acid, acetic acid and gluconic acid are produced, as well as carbon dioxide. The yeasts transform the sucrose available in the sugar present in the tea into fructose and glucose. The ethanol produced is consumed by acetic bacteria to generate acetic acid, in the presence of gluconic acid, ethanol production increases (SANTOS, 2016). And lactic bacteria convert ethanol and acetic acid into lactic acid. As the concentration of acids increases, the pH of the solution decreases (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000). The aroma, flavor and color of Kombucha are modified mainly by the action of the yeasts of the genera *Zygosaccharomyces* and *Saccharomyces*, producing an aroma similar to that of cider and the color becomes lighter compared to the original color (SANTOS, 2016).

7.4 RAW MATERIALS NORMALLY USED FOR MANUFACTURE

Kombucha is a symbiosis between bacteria and yeasts that make up the cellulose film suspended in fermented tea containing the metabolites of these microorganisms. Therefore, while yeasts hydrolyze sucrose to produce glucose and fructose, acid-acetic bacteria transform glucose into gluconic acid and fructose into acetic acid. Among the microorganisms capable of carrying out these conversions, *Acetobacter xylinum* is the most mentioned bacterium, as well as the yeasts of the genera *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces* and *Pichia* (SOUSA; FIOROTO, 2019).

The substrates used in the fermentation of Kombucha are tea and sugar, the most commonly used being black or green tea and crystal sugar. Studies with other substrate sources were conducted. Malbasa, Loncar and Djuric (2007)



compared beet molasses and sucrose, obtaining a nine-fold variation in biomass for molasses while maintaining taste, color and lactic acid content.

Among the trends for the use of kombucha is the fermentation of milk. Hrnjez *et al.*, 2014 assessed the effects of fermentation of the microorganisms of kombucha on milk during 14-day storage compared to milk fermented by probiotics and yogurts. The milk fermented with kombucha presented characteristics of pH, degree of proteolysis and sensory quality similar to the others, but with greater activity of the angiotensin converting enzyme and high level of vitamin C after 14 days of storage. Greater stability during storage was also observed by Malbaša *et al.*, 2009 when comparing the application of different inocula in milk, obtaining a significant difference in the levels of dry matter and proteins between the beverages produced by kombucha and yogurt.

Following the study strand of fermented beverages based on plant origin, Zubaidah *et al.*, 2018 used five cultivars of fruit *Salacca zalacca* for the production of beverage fermented by kombucha raising the antioxidant activity, content of phenolic compounds, tannins and flavonoids of the beverages, besides presenting antibacterial activity and good sensorial acceptance. The partial replacement of traditional black tea by wheat grass juice, wheat seed ripe bud extract, also showed improvement in flavonoid indices, antioxidant activity and phenolic compounds such as catechin, gallic acid, rutin, caffeic acid, chlorogenic acid and ferulic acid (SUN *et al.*, 2015).

Based on studies highlighting the potential of different plants for the production of kombucha, the use of unconventional food plants can be a source of nutrients for new fermented beverages. Rahmani *et al.*, 2019 observed that fermentation with kombucha increased the concentration of phenolic compounds and antioxidant activity of *Brassica tournefortii*, a North African plant known as African mustard, and decreased cytotoxicity in leaves.

Residues of the food industry can also be considered rich in bioactive compounds and used for the production of kombucha, such as the derivatives of the production of green tea and black tea (JAYABALAN *et al.*, 2007), the molasses from the manufacture of beet sugar (MALBAŠA *et al.*, 2008) and the



extract obtained during the production of tofu and soy isolated protein, known as soy whey, which was studied as a matrix for the manufacture of beverage fermented by kombucha in order to use of the by the by-product. The results found indicated an increase in antioxidant capacity and sensory acceptance, as well as antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*, demonstrating the functional potential of the fermented residue (TU et al., 2019).

7.4.1 Scoby

The cellulosic film also known as "Kombucha's mother" or SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts) (PALUDO, 2017) is responsible for the fermentation giving rise to drink and a new film. Composed primarily of cellulose, yeasts and bacteria. Its exact composition has not yet been found, varying according to fermentation (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000).

The Scoby is a biofilm of microorganisms that resembles a mushroom cap, which becomes an initiator for subsequent fermentations. Comprises several acetic acid bacteria (e.g. *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* and *Gluconobacter oxydans*¹ and yeasts (e.g. , *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, *Torulopsis* sp., *Pichia* spp., *Brettanomyces* sp. and *Zygosaccharomyces bailii*). After fermentation, the scoby-generated beverage is a cocktail of chemical components, including sugars; tea polyphenols; organic acids of food; fiber; ethanol; amino acids including lysine; essential elements such as Cu, Fe, Mn, Ni and Zn; water-soluble vitamins such as vitamin C and various B vitamins; carbon dioxide; antibiotic substances; and hydrolytic enzymes (KAPP; SUMNER, 2019).



7.4.2 Green Tea

The chemical composition of green tea includes several classes of phenolic compounds or flavonoids, among them the main ones present are the monomers of catechins, besides flavonols and phenolic acids, as well as caffeine, pigments, carbohydrates, amino acids and micronutrients such as vitamins B, E and C, and minerals such as calcium, magnesium, zinc, potassium and iron (RODRIGUES *et al.*, 2018).

Fresh leaves of the boiled and boiled plant are used for the production of green tea to prevent enzymatic oxidation of catechins, promoting high concentration of catechins and low teaflavins (BRAIBANTE *et al.*, 2014).

7.4.3 Black Tea

For the production of black tea, aged leaves are used by aerobic oxidation of catechins, presented high concentration of teaflavins and low of catechins (BRAIBANTE *et al.*, 2014), the catechins are oxidized enzymatically, generating a complex mixture of polyphenols, consisting of teaflavins, teasinensines and tearubigins (RODRIGUES *et al.*, 2018).

The behavior of black tea during Kombucha fermentation was analyzed by Kallel *et al.* (2012), when producing Kombucha from black tea, the authors observed an initial pH of 5.5, which decreased to 3.8 after fermentation. According to the authors, this reduction in pH can be attributed to the acidic characteristics of the substrate provided. In the course of fermentation, it was observed that black tea showed a high pH drop on the first day and, in the remainder of the time, its behavior was similar to green tea, which showed a drop in pH, continuously throughout the fermentation process.

7.4.4 Sugar

Sugar is a carbohydrate extracted from sugar cane, beet and other plants. Crystal or refined sugar is composed of more than 99% sucrose, which when hydrolysed results in glucose and fructose, this reaction is known as sucrose inversion and the resulting product is called invert sugar. Honey is obtained naturally from plants and composed of different sugars, in addition to proteins, a



aminoacids, enzymes, organic acids, minerals, pollen and traces of fungi, algae and yeasts (BATISTA, 2019).

Sugar (sucrose) is one of the essential ingredients of kombucha, as it is the source of energy for the colony of bacteria, fungi and yeasts (*scooby*), transforming the sweetened infusion product (tea) into a fermented beverage. During the fermentation process the sugar is converted into glucose and fructose, after which the yeasts transform the glucose into carbon dioxide (CO₂) and ethyl alcohol responsible for the sensory characteristics of the kombucha. Sucrose is also used by acetic bacteria as a carbon source, producing a type of gelatin that is a secondary metabolite of fermentation, which will give rise to a new *scooby* (MOURA, 2019).

White sugar is better and more widely used, according to Moura (2019), when compared to molasses, which hinders the fermentation process. Other studies report that with addition of 50g/L of cane or beet molasses, fermentation becomes faster, occurring in a shorter time period than using 70g/L of sugar (JAYABALAN *et al.*, 2010).

7.4.5 Fruit Juice

Several substrates, understood as unconventional, such as fruit juices, milk, wine and beer have been used in the production of kombuchas (VITAS *et al.*, 2013). Ayed, Abid and Hamdi (2016) analyzed red grape juice as an alternative substrate in beverages under fermentation between 6 and 12 days and considering the requirements such as intensity, sweetness, aroma, acidity, acceptability and color. The authors found that the juice in fermentation process for 12 days had a lower acceptance with respect to the set of attributes considered. So they realized that six days is enough to get a sensorially satisfying drink.

Zubaidah *et al.*, 2019 made use of fruit juice related to palm Salak species for the preparation of Kombuchas. With this experiment, the authors realized that the drink produced had considerable potential for possessing functional properties, since it significantly elevated the antioxidant and antibacterial activities of natural juice when not yet fermented.



7.5 BRAZILIAN AND WORLDWIDE PRODUCTION

One of the probiotic beverages that has conquered greater visibility in the market nowadays, kombucha is expected to grow at a rate of 16% a year, turning over more than five billion dollars by 2025, according to market research by the company Global Market Insights. According to a market survey by Mordor Intelligence (2023), the Kombucha market is about to grow by 22.35% by 2027.

In Brazil, the production of the drink has grown in the last year, with the emergence of several brands, according to the magazine Casa Vogue (2018). The drink has become so popular that a 300 mL bottle of kombucha costs, on average R\$ 15.00 (COMPANHIA DOS FERMENTADOS, 2023). In Paraná, the drink is produced in the Campo Largo and Biozen factories as well as by artisanal producers. As already exists in other places in the world, the first specialized bar in Kombucha do Brasil, located in São Paulo, was opened in January 2017, where the customer can consume the drink in the store, directly from *chopp* barrels or bottled bottles.

THANKS

We thank the Graduate Program in Biotechnology (PPGBiotec) of the State University of Feira de Santana (UEFS).

FINANCING

This work was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel - Brazil (CAPES), Financial Code - 001.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.



REFERENCES

BAARLEN, P. V.; TROOST, F.; MEER, C.V.; HOOIVELD, G.; BOEKSCHOTEN, M.; BRUMMER, R. J.M; KLEEREBEZEM, M. Human mucosal in vivo transcriptome responses to three lactobacilli indicate how probiotics may modulate human cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011 Mar 15;108 Suppl 1(Suppl 1):4562-9. DOI:[10.1073/pnas.1000079107](https://doi.org/10.1073/pnas.1000079107). Epub 2010 Sep 7 PMID 20823239; PMCID PMC3063594.

BARBOSA, C. D., UETANABARO, A. P. T., SANTOS, W. C. R., CAETANO, R. G., ALBANO, H., KATO, R., COSENZA, G. P., AZEREDO, A., GÓES-NETO, A., ROSA, C. A., TEIXEIRA, P., ALVARENGA, V. O., & LACERDA, I. C. A. (2021). Microbial-physicochemical integrated analysis of kombucha fermentation. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111788> *LWT - Food Science and Technology*, 148, 1-9. [111788].

BRAZIL. Ministry of Livestock Farming and Supply. Normative Instruction No. 41/2019 of September 17, 2019. It establishes the Identity and Quality Standard of Kombucha throughout the national territory. Official Journal of the Union: section 1, Brasilia, DF, ed. 181, p. 13, 18 Sep. 2019.

CASA VOGUE. Kombucha: Learn all about the thousand-year-old drink that slimmers. Available at: <https://casavogue.globo.com/LazerCultura/noticia/2018/06/dossie-kombucha-saiba-tudo-sobre-bebida-milenar-que-emagrece.html>. Accessed 10 July 2022.

CHEN, C.; LIU, B. Y. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *Journal of applied microbiology*, v. 89, n. 5, pp. 834-839, 2000.

COMPANY OF THE FERMENTED. Price of Kombucha. Available at: <https://www.ciadosfermentados.com.br/collections/kombucha/garrafa>. Accessed: 01 August 2023.

DUFRESNE, C.; FARNWORTH, E. Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Research International*. v. 33, pp. 409-421, 2000.

DUTTA, D., & GACHHUI, R. New nitrogen fixer, *Acetobacter nitrogenifigens* sp. nov., isolated from Kombucha tea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56 (8), 1899-1903, 2006.

DUTTA, D., & GACHHUI, R. *Gluconacetobacter kombuchae* sp. Nitrogen fixer and pulp producer. nov., isolated from Kombucha tea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57 (2), 353-357, 2007.

FERIA, Manuel G. et al. Effect of the therapy with probiotics/prebiotics on the reconstitution of the lymphoid tissue associated with the gastrointestinal mucosa during the infection by the human immunodeficiency virus-1. *Medical Journal of Chile*, v. 145, n. 2, p. 219-229, 2017.



HEMARAJATA, P.; VERSALOVIC, J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therapeutic advances in gastroenterology*, v. 6, n. 1, pp. 39-51, 2013.

HESELTIME, C. W. A millennium of fungi, food and fermentation. *Mycology*, 57 (2), 149-197, 1965.

HRNJEZ, D.; VAŠTAG, Z; MILANOVIĆ, S.; VUKIĆ, V.; ILIČIĆ, M.; L. POPOVIĆ, J.; KANURIĆ, K. The biological activity of fermented dairy products obtained by kombucha and conventional starter cultures during storage. *Journal of Functional Foods*, v. 10, p. 336-345, 2014.

HUNG IFN, LUNG KC, TSO EYK. Triple with bination of interferon beta1b, lopinavir-ritonavir, and rib avirin in the treatment of patients admitted to hospital with COVID an openlabel, randomized, phase 2 trial. *Lance t*. 2020;395(10238):1695704.

Infusino, F.; Marazzato, M.; Mancone, M.; Fedele, F.; Mastroianni, C.M; Severino, P.; Ceccarelli, G.; Santinelli, L.; Cavarretta, E.; Marullo, A.G.M.; Miraldi, F.; Carnevale, R.; Nocella, C.; Biondi-Zoccai, G.; Pagnini, C.; Schiavon, S.; Pugliese, F.; Frati, G.; d'Ettorre, G. probiotics, and nutraceuticals in SARS-CoV-2 infection: a scoping review. *Nutrients*, v. 12, para. 6, p. 1718, 2020.

JAYABALAN R.; MARIMUTHU S.; SWAMINATHAN K. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*, v. 102, n. 1, pp. 392-398, 2007.

JAYABALAN, R.P.; SUBATHRADEVI, S.; MARIMUTHU, M.; SATHISHKUMAR, K. SWAMINATHAN. Changes in the ability to eliminate free radicals from kombucha tea during fermentation. *Food Chem*, 109: 227 - 43, 2008b.

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, p. 538-550, 2014.

JARRELL, J.; CAL, T.; BENNETT, J. W. The Kombucha consortium of yeasts and bacteria. *Mycologist*, 14 (4), 166-170, 2000.

KAPP, J. M.; SUMNER, W. Kombucha: A systematic review of the empirical evidence of human health benefit. *Annals of epidemiology*, v. 30, p. 66-70, 2019.

LIMA, V. S. de; SOUSA, A. F. de; BEZERRA, A. N. Effects of supplementation with probiotics in patients with human immunodeficiency virus: systematic review. *Health Sciences Journal*, v. 10, n. 2, pp. 69-79, 2020.

MALBAŠA, R.; LONČAR, E.; DJURIĆ, M. Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. *Food Chemistry*, v. 106, n. 3, p. 1039-1045, 2008.



MALBAŠA, R. V.; MILANOVIĆ, S. D.; LONČAR, E. S.; et al. Milk-based beverages obtained by Kombucha application. *Food Chemistry*, v. 112, n. 1, pp. 178-184, 2009.

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, p. 171-178, 2014.

MORDOR INTELLIGENCE. KOMBUCHA MARKET - GROWTH, TRENDS AND FORECAST. Available at: <https://www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/kombucha-market>. Accessed: 01 September 2023.

OFORI, J. A.; OCLOO, A.; OFORI, M.; DORLEKU, W.P.; GBEWONYO, W.S.K.; Kombucha protects against arsenic-induced protein peroxidation in rats. *Journal of Ghana Science Association*, v. 16, n. 2, 2015.

OLIVEIRA, F. G. de. *Benefits of home-made probiotics Kefir and Kombucha: a literature review*. Advisor: Prof. Magda Comoretto Gall. 2020. 30 f. TCC (Specialization) - Graduate Course in Integrative and Complementary Practices, University of Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2020. Available at: <<https://repositorio.unisc.br/jspui/bitstream/11624/2939/1/Fernanda%20Gomes%20de%20Oliveira.pdf>>. Accessed: March 24, 2023.

Kombucha production is multiplying in Brazil. In: AGRIBUSINESS PORTAL. [s. l.]: Gigrô.com, 30 Oct. 2018. Available at: <<https://www.portaldoagronegocio.com.br/noticia/producao-de-Kombucha-semultiplica-no-brasil-177446>>. Accessed: 20 October 2022.

RAHMANI, R.; BEAUFORT, S.; VILLARREAL-SOTO, S. A.; TAILLANDIER, P.; BOUAJILA, P.; DEBOUBA, M. Kombucha fermentation of African mustard (*Brassica tournefortii*) leaves: Chemical composition and bioactivity. *Food Bioscience*, v. 30, p. 100414, 2019.

SOUSA, L. C. S. de; FIOROTO, C. K. S. Functionality and application of kombucha in food. XI International Meeting of Scientific Production. Anais Eletrônico, 2019.

SUN, T.-Y.; LI, J.-S.; CHEN, C. Effects of blending wheatgrass juice on enhancing phenolic compounds and antioxidant activities of traditional kombucha beverage. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 23, n. 4, p. 709-718, 2015.

UNITED STATES CODE, U.S.C. Laws and Regulations under the Federal Alcohol Administration Act and Other Related Provisions of Title 27 Alcohol and Tobacco Tax and Trade (TTB), 2007, 190 p.

VILLARREAL-SOTO, S. A.; BEAUFORT, S.; BOUAJILA, J.; SOUCHARD, S. *Journal of Food Science*, v. 83, n. 3, p. 580-588, 2018.



CUADERNOS DE

EDUCACIÓN

Y DESARROLLO

Europub European Publications

ISSN: 1989-4155

YOUNG, S. P (2019). Kombucha: Revered For Millennia, But Is It Really A Life Saving Brew? Available at: < <https://www.ancient-origins.net/myths-legends-asia/kombucha-0011948>>. Accessed on 31 March 2020.

ZUBAIDAH, E.; DEWANTARI, F. J.; NOVITASARI, F. R.; SRIANTA, I.; BLANC, P. J. Potential of snake fruit (*Salacca zalacca* (Gaerth.) Voss) for the development of a beverage through fermentation with the Kombucha consortium. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 13, p. 198-203, 2018.

CAPÍTULO 2

Prospecção tecnológica e análise de patentes de kombucha de chás verde e preto adoçadas com mel de abelha e xarope de guaraná

Technological prospecting and patent analysis of kombucha made from green and black teas sweetened with honey and guarana syrup

Prospecção tecnológica e análise de patentes de kombucha feita de chás verde e preto adoçados com mel e xarope de guaraná

Prospección tecnológica y análisis de patentes de kombucha elaborada con té verde y negro endulzado con miel y jarabe de guaraná

DOI: 10.54033/cadpedv22n4-227

Originals received: 1/24/2025

Acceptance for publication: 2/17/2025

Hevelynn Franco Martins

Doctoral Student in Biotechnology

Institution: Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

Address: Feira de Santana, Bahia, Brazil

E-mail: hevelynn_martins@hotmail.com

Leila Thaise Santana de Oliveira Santos

Doctor in Biotechnology

Institution: Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

Address: Feira de Santana, Bahia, Brazil

E-mail: leilathaise@yahoo.com.br

Giovanni Brandão Mafra de Carvalho

Doctor in Industrial Biotechnology

Institution: Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

Address: Feira de Santana, Bahia, Brazil

E-mail: brandao.phd@gmail.com

Ernesto Acosta Martinez

Doctor in Industrial Biotechnology

Institution: Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

Address: Feira de Santana, Bahia, Brazil

E-mail: ernesto.amartinez@uefs.br

ABSTRACT

Kombucha is a fermented beverage with functional properties and growing popularity due to its potential health benefits. This study aimed to conduct a technological prospecting and patent analysis of kombucha produced from green

and black teas, sweetened with honey and guarana syrup. Using the INPI and Espacenet® databases, searches were conducted between february and may of 2024, employing descriptors such as "kombucha", "green tea", "black tea", "guarana", "honey", and various combinations thereof. The analysis revealed 365 patents related to kombucha in Espacenet, with China accounting for 63% of the deposits, followed by South Korea with 17%. In INPI, only 10 records were found between 2017 and 2022, with a peak in deposits in 2020. Higher education institutions (HEIs) represented the majority of depositors in Brazil. The main IPC classifications included A23L 2/38 and C12G 3/02, indicating a strong emphasis on non-alcoholic beverages and alcoholic beverages by direct fermentation. The results indicate that kombucha is a dynamic and promising field for technological innovations, with strong potential for the development of new products.

Keywords: Innovation. Fermented Beverage. Functional Properties. Technological Trends.

RESUMO

A kombucha é uma bebida fermentada com propriedades funcionais e popularidade crescente devido aos seus potenciais benefícios à saúde. Este estudo teve como objetivo realizar uma prospecção tecnológica e análise de patentes de kombucha produzidas a partir de chás verde e preto, adoçadas com mel de abelha e xarope de guaraná. Utilizando as bases de dados INPI e Espacenet®, as buscas foram realizadas entre os meses de fevereiro e maio de 2024, empregando descritores como "kombucha", "green tea", "black tea", "quarana", "honey" e diferentes combinações destes. A análise revelou 365 patentes relacionadas à kombucha no Espacenet, com a China sendo responsável por 63% dos depósitos, seguida pela Coreia do Sul com 17%. No INPI, foram encontrados apenas 10 registros entre 2017 e 2022, com um pico de depósitos em 2020. As instituições de ensino superior (IES) representaram a maioria dos depositantes no Brasil. As principais classificações IPC incluíram A23L 2/38 e C12G 3/02, indicando uma forte ênfase em bebidas não alcoólicas e alcoólicas por fermentação direta. Os resultados indicam que a kombucha é um campo dinâmico e promissor para inovações tecnológicas, com um forte potencial para o desenvolvimento de novos produtos.

Palavras-chave: Inovação. Bebida Fermentada. Propriedades Funcionais. Tendências Tecnológicas.

RESUMEN

La kombucha es una bebida fermentada con propiedades funcionales y creciente popularidad debido a sus potenciales beneficios para la salud. El objetivo de este estudio fue realizar una prospección y análisis tecnológico de patentes de kombucha producida a partir de té verde y negro, endulzada con miel de abeja y jarabe de guaraná. Utilizando las bases de datos INPI y Espacenet®, se realizaron búsquedas entre febrero y mayo de 2024, utilizando descriptores como «kombucha», «té verde», «té negro», «quarana», «miel» y diferentes combinaciones de los mismos. El análisis reveló 365 patentes relacionadas con la kombucha en Espacenet, de las cuales el 63% correspondían a China, seguida

de Corea del Sur, con el 17%. En el INPI, solo se encontraron 10 registros entre 2017 y 2022, con un pico de solicitudes en 2020. Las instituciones de educación superior (IES) representaron la mayoría de los declarantes en Brasil. Las principales clasificaciones de la CIP incluyeron A23L 2/38 y C12G 3/02, lo que indica un fuerte énfasis en las bebidas no alcohólicas y alcohólicas por fermentación directa. Los resultados indican que la kombucha es un campo dinámico y prometedor para la innovación tecnológica, con un fuerte potencial para el desarrollo de nuevos productos.

Palabras clave: Innovación. Bebida Fermentada. Propiedades Funcionales. Tendencias Tecnológicas.

1 INTRODUCTION

Kombucha is a fermented beverage traditionally prepared from green or black tea and sugar that has gained worldwide popularity due to its potential health benefits and diverse commercial applications (Emiljanowicz & Malinowska-Pańczyk, 2020). The beverage is known for its probiotic, antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory properties, attributed to the presence of a symbiotic culture of bacteria and yeasts (SCOBY) (Miranda *et al.*, 2022). Originally produced in China, kombucha has spread globally, being adapted and modified in various ways to meet consumer preferences and market demands.

In recent years, interest in kombucha has increased significantly, reflected in the growth of patent filings related to its production and applications (Barros *et al.*, 2024). This trend reflects not only consumer appeal for natural and functional products but also the pursuit of technological innovations in the field of fermented beverages. Innovations in this area include variations in the types of teas used, as well as sweeteners and other ingredients added during the fermentation process (Barros *et al.*, 2024; Miranda *et al.*, 2022). Specifically, the use of honey and guarana syrup as natural sweeteners has gained attention due to their nutritional benefits and potential to enhance the physicochemical and sensory profile of kombucha (Martins *et al.*, 2024a; Martins *et al.*, 2024b).

Honey is valued for its antibacterial and antioxidant properties, in addition to being a natural energy source (Araújo *et al.*, 2021). Meanwhile, guarana syrup, derived from a plant native to the Amazon, is known for its stimulating and

antioxidant properties, owing to its high caffeine content and other bioactive compounds (Schimpl *et al.*, 2013). The combination of these ingredients with green and black teas may result in a beverage with enhanced health benefits, as well as a distinctive and appealing flavor for consumers (Martins *et al.*, 2024a).

Technological prospecting is an essential tool for identifying trends and opportunities in the development of new products and technologies (Martins *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2021). In the case of kombucha, patent analysis provides insights into innovations and future directions in the market. In other words, it helps identify the main research areas, the leading countries in innovation, and the institutions or companies at the forefront of developing new kombucha-based products. Therefore, this study aims to conduct a technological prospecting and patent analysis of kombucha produced from green and black teas, sweetened with honey and guarana syrup.

2 MATERIALS AND METHODS

This study utilized a qualitative and quantitative approach to conduct technological prospecting and patent analysis related to kombucha produced from green and black teas, sweetened with honey and guarana syrup. The searches were performed in Brazilian national (INPI - Brazilian National Institute of Industrial Property) and international (Espacenet® - European Patent Office) databases, with no time restriction, retrieving all patent documents filed up to the research date. The searches were conducted between February and May 2024.

The following descriptors were used: INPI - "kombucha" and "kombucha and chá"; Espacenet - "kombucha," "kombucha and green tea," "kombucha and black tea," "kombucha and green tea and black tea," "kombucha and honey," "kombucha and guarana," "kombucha and crystal sugar," and "kombucha and honey and green tea and black tea." In INPI, advanced search options were applied using keywords in the "Abstract" field and a "granted patents" filter. In Espacenet, keywords and combinations of descriptors were used as mentioned above.

The collected data included the type of depositor, country of origin, international patent classification (IPC), and year of filing. The data were organized and analyzed using Microsoft Excel. Analyses included patent counts, identification of the main filing countries, and categorization of patents by IPC classification.

A literature review was also conducted to identify relevant studies on the application of honey and guarana syrup in kombucha production. Searches were performed in the Google Scholar, SciELO, and PubMed databases using the terms "kombucha," "honey," and "guarana syrup." These terms were combined in pairs and all three simultaneously, and the searches were conducted in both Portuguese and English. No time restrictions were applied, allowing the retrieval of relevant publications regardless of the date available in the consulted databases. Results were examined based on titles, abstracts, and methodologies to assess their relevance and association with the use of these ingredients in kombucha production.

This study is limited to patents and scientific articles available in the consulted databases (INPI, Espacenet, Google Scholar, SciELO, and PubMed) and the descriptors used in the searches. The analysis did not consider the validity or current status of the patents. The study adhered to ethical guidelines for documentary research, ensuring the integrity of the collected data.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 NATIONAL LANDSCAPE OF PATENT FILINGS RELATED TO KOMBUCHA

The advanced search in the INPI database using the descriptor "kombucha" identified 17 patent filings between 2017 and 2024. The patents filed addressed the use of kombucha SCOBY in packaging for fermented beverages, coating soles and straps of footwear, and the production of coffee and honey vinegars, natural ferment starters, and natural cosmetics with probiotics. The raw materials and fermentation conditions used in kombucha production are detailed in Table 1.

Table 1. Raw materials and process conditions for infusion preparation (A), first fermentation (B), and second fermentation (C) in kombucha production as described in patents filed with the Brazilian National Institute of Industrial Property (INPI).

Raw Materials	Fermentation conditions	Patent and authors
A. 20 g of sucrose or honey, 40 g of mate tea (<i>Ilex paraguariensis</i>) in 500 mL of cold water.	Boiling (90°C).	BR 102018014077-9 A2 Matias and Gallina (2018)
B. 50 mL of fermented tea, 20 g of SCOBY.	35°C, no agitation, aerobic environment, 7 days.	
C. Beverage mixed with 25% juice, herbal tea, or flowers; sweetened with stevia, sucrose, xylitol, or honey.	Second fermentation: 7 days.	
A. Water, tea.	80-85°C for 15 min.	BR 102018074125-0 A2
B. 1% (v/v) acetic acid, 12.5% (w/v) carbohydrate, SCOBY.	20°C for 14 days	De Carvalho et al. (2020)
C. First fermentation tea, alcoholic yeast, 5% (v/v) carbohydrate, with or without added concentrated juice.	20°C for 14 days	
A. Tea with 2-10% flour from leaves and/or stems of <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. or <i>Talinum paniculatum</i> .	100°C for 15 min.	BR 102020020531-5 A2 Pereira et al. (2022)
B. 2-10% sucrose, 10% (w/v) SCOBY.	28-30°C for 6-10 days in BOD. Agitation for 1 min, and 28-30°C for 3-5 days in BOD.	
C. 20-30% whole juice, 70-80% (v/v) beverage from first fermentation.		
A. 15 g of green tea in 1000 mL water, 300 g of crystal sugar in 1500 mL water.	Pressure cooker until pressure point.	BR 102020024262-8 A2 Scariot et al. (2022)
B. With SCOBY and inoculum without biofilm, at least one fungus from <i>Saccharomycetales</i> or <i>Schizosaccharomycetales</i>	35°C for 3-10 days with continuous aeration (0.5 vvm) or without aeration using bubble column (airlift) or pneumatically agitated reactor. Aeration in the first 12, 24, and 36 hours.	
A. Crystal sugar in water, green tea sachet	Boiling up to 100°C, followed by the addition of the sachet, infusion for 10 minutes.	BR 102022017404-0 A2 Sanches and Falaschi (2024)
B. Starter tea, SCOBY	25-28°C for 5 days.	
C. Fermented tea flavored with 25% (K1) and 50% (K2) bocaiuva juice (<i>Acrocomia aculeata</i>)	Kept in a light-free environment for 2 days.	
A. Green tea sachet, 10% (v/v) of white crystal sugar.		BR 102023006329-2 A2
B. SCOBY, 20% kombucha	30°C for 7 days in plastic trays in BOD	Coelho et al. (2023)
A. Sugar, filtered water, tea from <i>Ilex paraguariensis</i> or <i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i> or <i>Camellia sinensis</i> .	Boiling water (70-90°C).	BR 102023006808-1 A2 Carneiro et al. (2023)

B. SCOBY.	30°C for 3-10 days.	
C. Pineapple (<i>Ananas comosus</i>) juice, other fresh or dried ingredients, or oils.	Plastic bottles, 2-14 days.	
A. 150 mL water, 5% (w/v) sucrose, 2 g rosemary (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.).	Boiling water, infusion for 15 min at 80°C.	BR 202021009130-0 U2 Luvison <i>et al.</i> (2023)
B. 5-10% starter liquid or pre-fermented tea, 2.18 g SCOBY per tube.	8 days in a dark environment, room temperature (20.6°C) or controlled (30°C).	
C. 5% fruit pulp and sugar.	Bottles	
A. 12 g green tea (<i>Camellia sinensis</i>), 50 g/L sucrose.	70°C for 10 min, must be sterilized by microfiltration	BR 102024002794-9 A2 Morais <i>et al.</i> (2024)
B. Microbial culture at 10% (v/v).	25°C for 10 days in an incubator without agitation or aeration, with controlled temperature.	
C. Spirulina biomass (0.2, 0.4, and 0.6% w/v) and samples with kombucha at 0.2, 0.4, and 0.6% (w/v) and 10% (w/v) lemon juice.		

Source: The Authors (2024)

The infusions included the use of mate tea, green tea, rosemary, and tea with leaves or stems of roselle. SCOBY or inoculum without biofilm was used in the first fermentation stage, with the addition of juices, sweeteners, herbs, flowers, and Spirulina biomass in the second fermentation stage. For infusion preparation, boiling occurred at temperatures between 80 and 100°C. The first fermentation stage was conducted at temperatures between 20 and 35°C, lasting 3 to 10 days in incubators with continuous aeration or without aeration (Table 1). Limited information was available on the second fermentation stage, with noted use of bottles, a temperature of 20°C, and durations between 2 and 10 days (Table 1). None of the patents had been granted at the time of this research.

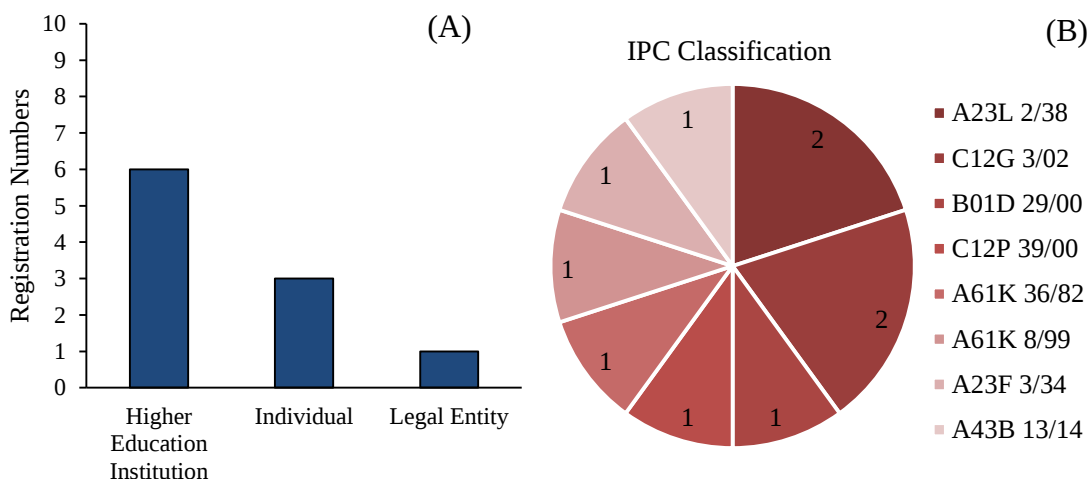
Regarding the results reported by Scariot *et al.* (2022) in patent BR 102020024262-8 A2 on a fermentation process, fermentation device, and kombucha, the study observed a reduction of 10.4% to 22.5% in the concentration of reducing sugars. When incubated with SCOBY, continuous aeration resulted in higher sugar consumption, whereas aeration for 24 hours led to lower consumption. When inoculated with starter tea, continuous aeration resulted in lower sugar consumption, while aeration for 24 hours resulted in higher sugar consumption.

Sanches and Falaschi (2022), in patent BR 102022017404-0 A2 titled Composition of bocaiuva-flavored kombucha and its development method, observed pH levels ranging between 2 and 3 in kombuchas. The fermented tea with 25% bocaiuva juice (*Acrocomia aculeata*) (K1) had a higher fiber concentration (3.27) compared to the formulation with 50% juice (K2) (2.34), where higher moisture, ash, lipid, and energy values were noted.

Luvison *et al.* (2022), in patent BR 202021009130-0 U2 titled Traditional and flavored rosemary kombucha, reported higher antioxidant activity values (7040 μ M), 558 mg GAE/L, and 18.5 mg of tannic acid/L in kombucha with a higher starter liquid concentration (10%) and at the higher temperature (30°C). Additionally, final pH values close to 3.2 were observed in the kombuchas.

The distribution of filings by depositor type in INPI showed that Higher Education Institutions (HEIs) were the main depositors, accounting for six patents (Figure 1A). Individual applicants and one legal entity contributed three and one patent, respectively. This analysis indicates that, although Brazil has a smaller number of patents, Higher Education Institutions are actively involved in kombucha research, highlighting the importance of collaboration between academia and industry to foster innovation.

Figure 1. Number of patent filings related to kombucha by depositor type (A) and IPC classification of filings (B) in INPI.



Source: The Authors (2024)

The analysis of International Patent Classifications (IPC) revealed that the most frequent categories were A23L 2/38, related to non-alcoholic beverages and their preparations, and C12G 3/02, concerning the preparation of other alcoholic beverages by direct fermentation (Figure 1B). Additional IPC classifications included B01D 29/00, referring to filters used in beverage purification; C12P 39/00, related to the production of carbon-containing compounds through fermentation or solvent extraction; A61K 36/82 and A61K 8/99, both involving compositions for cosmetic or medicinal use, which may include plant extracts used in beverages; A23F 3/34, specific to the treatment of tea or tea infusions; and A43B 13/14, associated with footwear articles. The diversity of IPC classifications reflects kombucha's versatility as a raw material, with applications extending beyond the food sector to include the pharmaceutical, cosmetic, and biotechnology industries (Rezaldi *et al.*, 2021; Stanek-Wandzel *et al.*, 2023).

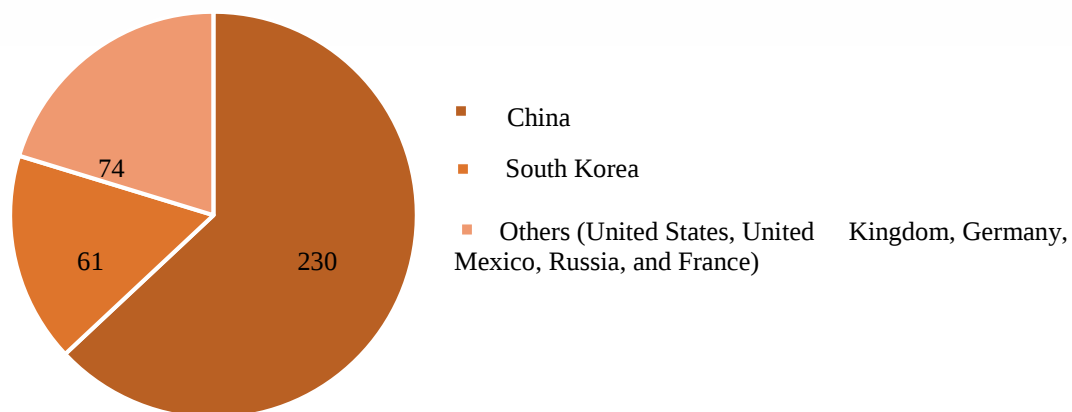
The use of honey and guarana syrup as natural sweeteners adds nutritional and functional value to kombucha, creating opportunities for the development of innovative and healthy products (Martins *et al.*, 2024b). However, no national patent applications related to kombucha with honey or guarana were found.

3.2 INTERNATIONAL DATABASE PROSPECTION

The search in the Espacenet database identified a total of 365 patents related to kombucha (Figure 2, Table 2). The distribution of patents by country revealed a significant predominance of China, which holds 230 patents (63%), followed by South Korea with 61 patents (17%). Other countries, including the United States, United Kingdom, Germany, Mexico, Russia, and France, accounted for 74 patents (20%).

Figure 2. Distribution of kombucha-related patent filings in Espacenet by country.

Country of Origin of Patent Filings



Source: The Authors (2024)

Table 2. Results of different search strategies for kombucha-related patents in the Espacenet database.

Title	Number	Year
"Kombucha" in the title or abstract		
Rapid method of producing non-alcoholic and alcoholic beer	US2024101940 (A1)	2024
Cigarette rolling papers formed from kombucha biofilms	PL3694343 (T3)	2024
Kombucha natural health products, gummies composition and methods therefor	GB2622161 (A)	2024
Kombucha leavening agent based on 3D printing and preparation method and application of kombucha leavening Agents	CN117356642 (A)	2024
Manufacturing method of dry kombucha powder using fermented kombucha	KR20230174477 (A)	2023
Fermentation systems and methods in kombucha manufacture	US11849746 (B1)	2023
Oral liquid for improving sleep disorder and preparation method thereof	CN117337980 (A)	2024
Composite nano colorimetric sensor and method for detecting volatile organic compounds by using same	CN117309849 (A)	2023
Kombucha bean juice beverage and preparation method thereof	CN117256800 (A)	2023
Helianthus tuberosus Kombucha Carbonated Drink Manufacturing method	KR20230167501 (A)	2023
Manufacturing method of a kombucha composition comprising a balloon flower mixture extract	KR20230164899 (A)	2023
Tea enzyme and production and filtration method thereof	CN117204559 (A)	2023
Method for producing solid tea using spray-dried Kombucha powder	KR20230158147 (A)	2023
Fermented health-care beverage and preparation method thereof	CN117121997 (A)	2023
Method for green preparation of graphene oxide from cellulose	CN117088363 (A)	2023
Mango desensitization and aroma enhancement method	CN117084384 (A)	2023
Method for preparing kombucha	KR102610939 (B1); KR20230156254 (A)	2023
Method for realizing high-added-value poly-generation of mulberry leaves by fermentation method	CN117044933 (A)	2023

Traditional Chinese medicine compound composition for resisting hyperplasia of mammary glands as well as preparation method and application thereof	CN117018093 (A)	2023
Curcuma longa kombucha beverage and preparation process thereof	CN117016644 (A)	2023
Molded tea compositions incorporating microbial cellulose as Binders	CN116997260 (A)	2023
rapid method of producing alcohol-free, non-alcoholic and alcoholic beer	WO2023205348 (A1)	2023
Manufacturing method of kombucha fermented liquid	KR20230141421 (A)	2023
Cell immobilized kombucha and preparation method thereof	CN116869062 (A)	2023
Process for preparation of kombucha using hemp seeds	KR102573871 (B1)	2023
kombucha and "green tea" in the title or abstract		
Cell immobilized kombucha and preparation method thereof	CN116869062 (A)	2023
Method for producing multi-fermented KOMBUCHA using lactic acid bacteria acetic acid bacteria and yeast having antioxidant antidiabetic and antiobesity activity	KR102509451 (B1)	2023
Manufacturing method of kimchi using kombucha	KR102471921 (B1)	2022
A kombucha powder mixture and a preparation method thereof	KR102448738 (B1)	2022
Preparation method and application of Kombucha product	CN114052104 (A)	2022
Komagataeibacter oboediens strain SW-1 and fermentation application thereof	CN113528379 (A); CN113528379 (B)	2021
Composition for forming leather and manufacturing method for leather	KR20210100523 (A)	2021
A kombucha composition and a preparation method thereof	KR102176334 (B1); KR20200066842 (A)	2020
Kombucha manufacturing method	KR20190138066 (A)	2019
Symbiotic composition containing a probiotic microorganism consortium and process for preparing the same	RO132748 (A0); RO132748 (B1)	2018
Method of Manufacturing Kombucha with Extracts Using Green Tea and Citrus	KR101870522 (B1); KR20180026021 (A)	2018
Refreshing jasmine tea	CN106561897 (A)	2017
Chocolate rose-essence-oil scented tea	CN106615345 (A)	2017
Essential oil scented tea for slimming and reducing fat	CN106551036 (A)	2017
Powdery coconut oil scented tea	CN106538735 (A)	2017
Essential oil scented tea with effects of fluid production promoting, thirst quenching and aging resistance	CN106509213 (A)	2017
Nutritive yoghurt and lavender scented tea	CN106509246 (A)	2017
Pig feed synergist for improving disease resistance	CN106071220 (A)	2016
Pig feed synergist for improving pork quality	CN106071222 (A)	2016
Pig feed synergist for preventing oxidation	CN106071221 (A)	2016
Pig feed synergist capable of improving productivity	CN105961873 (A)	2016
Mould-proof pig feed synergist	CN105961874 (A)	2016
Kombucha fermentated composition	KR20150124258 (A)	2015
Method for production of Kombucha containing green-tea extract	KR100482308 (B1); KR20040023982 (A)	2004
Kombucha and "black tea" in the title or abstract		
Kombucha leavening agent based on 3D printing and preparation method and application of kombucha leavening Agente	CN117356642 (A)	2024

Method for realizing high-added-value poly-generation of mulberry leaves by fermentation method	CN117044933 (A)	2023
Curcuma longa kombucha beverage and preparation process thereof	CN117016644 (A)	2023
Ferment stock solution rich in tea polyphenol and preparation method thereof	CN115868624 (A)	2023
Preparing Method of Kombucha beverages	KR102484575 (B1)	2023
Manufacturing method of kimchi using kombucha	KR102471921 (B1)	2022
Preparation method of kombucha pellicle	CN115354000 (A)	2022
Kombucha vinegar containing Rubus coreanus and manufacturing method thereof	KR102621242 (B1); KR20220101230 (A)	2022
Cold Brew Tea Method of Producing Kombucha	US2022202033 (A1)	2022
Methods of manufacturing kombucha beverage using black tea and beetroot extracts fermented by microorganisms	KR102450013 (B1); KR20220028851 (A)	2022
Preparation method and application of kombucha product	CN114052105 (A)	2022
Zinc-rich kombucha beverage and preparation method thereof	CN113826733 (A)	2021
Komagataeibacter oboediens strain SW-1 and fermentation application thereof	CN113528379 (A); CN113528379 (B)	2021
Making process of rhododendron black tea	CN112970873 (A)	2021
Kombucha and preparation method thereof	CN112931650 (A)	2021
Tea fermented beverage and preparation method thereof	CN112868841 (A)	2021
Black tea original drink and preparation method thereof	CN112616960 (A); CN112616960 (B)	2021
Compound health-care product containing purple bud black tea aqueous extract	CN111919935 (A)	2020
Black tea stirring and fermenting device	CN111838355 (A)	2020
New preparation method and application of kombucha protein	CN111733104 (A); CN111733104 (B)	2020
Natto and kombucha liquid beverage	CN111480713 (A)	2020
Manufacture of cosmetic products with kombucha fungus pulp as active component	GR1009749 (B)	2020
A kombucha composition and a preparation method thereof	KR102176334 (B1); KR20200066842 (A)	2020
Preparation method of digestion-promoting black tea beverage	CN111109408 (A)	2020
Method for fermenting corn straw by using black tea starter	CN111057722 (A)	2020
Kombucha and "green tea" and "black tea" in the title or abstract		
Manufacturing method of kimchi using kombucha	KR102471921 (B1)	2022
Komagataeibacter oboediens strain SW-1 and fermentation application thereof	CN113528379 (A); CN113528379 (B)	2021
A kombucha composition and a preparation method thereof	KR102176334 (B1); KR20200066842 (A)	2020
Kombucha manufacturing method	KR20190138066 (A)	2019
Method of Manufacturing Kombucha with Extracts Using Green Tea and Citrus	KR101870522 (B1); KR20180026021 (A)	2018
Method for production of Kombucha containing green-tea extract	KR100482308 (B1); KR20040023982 (A)	2004
Kombucha and honey in the title or abstract		
Preservative-free mask and preparation method thereof	CN116650393 (A)	2023

Tea fermented beverage and preparation method thereof	CN112868841 (A)	2021
Preparation method and application of seasoning	CN112741301 (A)	2021
Method for preparing rose vinegar beverage through fermentation of kombucha	CN111109486 (A)	2020
Method for producing a beverage using a microbial consortium for fermentation and mate tea as a raw material	WO2020010421 (A1)	2020
Kombucha hawthorn vinegar beverage and preparation method thereof	CN108669389 (A)	2018
Refreshing jasmine tea	CN106561897 (A)	2017
Chocolate rose-essence-oil scented tea	CN106615345 (A)	2017
Essential oil scented tea for slimming and reducing fat	CN106551036 (A)	2017
Powdery coconut oil scented tea	CN106538735 (A)	2017
Essential oil scented tea with effects of fluid production promoting, thirst quenching and aging resistance	CN106509213 (A)	2017
Nutritive yoghurt and lavender scented tea	CN106509246 (A)	2017
Pig feed synergist for improving disease resistance	CN106071220 (A)	2016
Pig feed synergist for improving pork quality	CN106071222 (A)	2016
Pig feed synergist for preventing oxidation	CN106071221 (A)	2016
Pig feed synergist capable of improving productivity	CN105961873 (A)	2016
Mould-proof pig feed synergist	CN105961874 (A)	2016
Preparing method of enzyme speckle removing cream	CN105232441 (A)	2016
Skin-nourishing wrinkle-proof jabuticaba and Kombucha beverage	CN104232430 (A); CN104232430 (B)	2014
Blueberry kombucha beverage and preparation method thereof	CN103211253 (A)	2013
Method of manufacturing biologically active beverage and beverage manufactured by method	RU2006135366 (A); RU2337592 (C2)	2008
Method for production of Kombucha containing green-tea extract	KR100482308 (B1); KR20040023982 (A)	2004
kombucha and honey and "green tea" and "black tea" in the title or abstract		
Method for production of Kombucha containing green-tea extract	KR100482308 (B1); KR20040023982 (A)	2004

Source: The Authors (2024)

The predominance of China can be attributed to its strong investment in research and development, as well as the extensive use of kombucha in various industrial and pharmaceutical applications (Batista *et al.*, 2022). South Korea also stands out as a significant contributor, reflecting its growing interest in the functional and therapeutic properties of kombucha (Lee *et al.*, 2022).

The combination of search strategies in Espacenet revealed 24 patents associated with the production of kombucha using green tea, 48 related to kombucha with black tea, and only six linking kombucha to both types of tea simultaneously (Table 3). Additionally, 22 filings were found for kombucha production with honey, while no filings related to kombucha with guarana were identified. Only one international patent, originating from South Korea and

classified as A23L 2/38, pertains to the production of kombucha with green and black teas and honey (Table 1).

Table 3. Results of different search strategies for kombucha-related patents in the Espacenet database.

Search strategies	Results Found
Kombucha	365
kombucha and “green tea”	24
kombucha and “black tea”	48
kombucha and “green tea” and “black tea”	6
kombucha and honey	22
kombucha and guaraná	0
kombucha and “crystal sugar”	0
kombucha and honey and “green tea” and “black tea”	1

Quotation marks (") were used to ensure precision in retrieving exact terms during the search.
Source: The Authors (2024)

The predominance of patents related to the production of kombucha with black tea compared to green tea suggests a recognized preference or efficacy of black tea in production, possibly due to its chemical and organoleptic properties (Emiljanowicz & Malinowska-Pańczyk, 2020; Miranda *et al.*, 2022). The scarcity of patents combining both teas simultaneously may indicate technical challenges or an underexplored area, representing a significant opportunity for future research aimed at developing innovative products.

The presence of 22 filings on the use of honey as a natural sweetener highlights the trend of seeking ingredients with additional health benefits, while the absence of patents related to the use of guarana suggests a gap in leveraging this ingredient, known for its stimulating properties (Martins *et al.*, 2024a; Schimpl *et al.*, 2013). The sole patent filed for kombucha production combining green and black teas with honey, originating from South Korea and classified under A23L 2/38, underscores the uniqueness of this formulation and its potential as a non-alcoholic beverage. This scenario highlights not only established areas in kombucha research but also points to specific niches that can be explored to diversify and enrich the kombucha market with new functional and differentiated products.

The search for scientific articles in the Google Scholar, SciELO, and PubMed databases on the application of honey and guarana syrup as sweeteners for kombucha yielded no significant findings. No full articles addressing these

ingredients were identified. Only an abstract published in the proceedings of a scientific event (Martins *et al.*, 2024a) provided information on the use of honey and guarana syrup as sweeteners for kombucha, albeit with limitations due to the summarized format. This study investigated the physicochemical quality of kombuchas prepared with black tea and sweetened with honey and guarana syrup. The research highlights the fundamental role of sugars in the fermentation process, essential for the development of bacteria and yeasts, which affect the final composition and sensory profile of the beverage.

Overall, the data indicate significant interest in exploring the fermentative and functional properties of kombucha, with a diversity of potential applications ranging from non-alcoholic beverages to pharmaceutical and cosmetic products. These trends suggest that kombucha will continue to be a focal point for research and the development of new products.

4 CONCLUSION

This study analyzed how patent filings reveal trends and opportunities in the development of kombuchas based on green and black teas sweetened with honey and guarana syrup. The results showed that kombucha is an expanding field of innovation, with China leading global filings and Brazil presenting limited initiatives, primarily concentrated in higher education institutions. The use of honey and guarana, still underexplored, emerges as an opportunity for technological innovations and the development of new functional products.

The findings can benefit society by encouraging the development of healthy and functional beverages, and academia by highlighting gaps and promising areas for collaborative research. The main limitations include restrictions to the consulted databases and the lack of specific studies on the combined use of honey and guarana. It is recommended to expand analyses to other databases and experimentally investigate the impact of these sweeteners on the fermentation, composition, and acceptance of kombucha.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Biotechnology Graduate Program (PPGBiotec) of the State University of Feira de Santana (UEFS).

FUNDING

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code AUXPE 2567/2024.

REFERENCES

ARAÚJO, G. S., SAMPAIO, K. F., SANTOS, F. S., BASTOS, T. D. S., OLIVEIRA, P. P., DE CARVALHO, G. B. M., & MARTÍNEZ, E. A. Biochemical, physicochemical and melissopalynological analyses of two multifloral honey types from Brazil and their influence on mead production. **Journal of Apicultural Research**, v. 60, n. 5, p. 784-796, 2021.

BARROS, V. C., BOTELHO, V. A., & CHISTÉ, R. C. Alternative Substrates for the Development of Fermented Beverages Analogous to Kombucha: An Integrative Review. **Foods**, v. 13, n. 11, p. 1768, 2024.

BATISTA, P., PENAS, M. R., PINTADO, M., & OLIVEIRA-SILVA, P. Kombucha: perceptions and future prospects. **Foods**, v. 11, n. 13, p. 1977, 2022.

CARNEIRO, L. F. G.; CARNEIRO, C. V. G. C.; GARCIA, N. O. S.; SOUZA, N. F.; SIQUEIRA, K. F.; CATHARIN, C. W. **Processo de produção de kombucha com o subproduto sumo de abacaxi para redução da concentração de açúcar**. Depositante: Luiz Fernando Galvão Carneiro. BR 102023006808-1 A2. Depósito: 12 abr. 2023.

COELHO, R. M. D.; RAMOS, A. S. S.; DA SILVA JÚNIOR, J. M.; DE SOUSA, P. H. M. **Processo de obtenção de canudos ecológicos produzidos a partir da celulose formada durante a fermentação da kombucha e seu produto**. Depositantes: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte; Universidade Federal do Ceará. BR 102023006329-2 A2. Depósito: 04 abr. 2023.

DE CARVALHO, L. F.; WALTRICH, C.; HINGST, R. C.; CAMPESTRINI, G. M. **Processo para produção de bebida alcoólica probiótica e bebida alcoólica probiótica**. Depostante: Fundação Universidade Regional De Blumenau. BR 102018074125-0 A2. Depósito: 02 jun. 2020.

EMILJANOWICZ, K. E., & MALINOWSKA-PAŃCZYK, E. Kombucha from alternative raw materials–The review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 19, p. 3185-3194, 2020.

LEE, S. M., LEE, J. Y., YOO, D. G., JEON, Y. B., YOON, H. S., & KIM, C. H. Functional characteristics of kombucha fermented with lactic acid bacteria, yeast, and acetic acid bacteria derived from Korea traditional foods. **Journal of Dairy Science and Biotechnology**, v. 40, n. 1, p. 23-34, 2022.

LUVISON, A.; DE LIMA, K. P.; DANGUI, A. Z. **Kombucha de alecrim tradicional e saborizado**. Depositante: Instituto Federal do Paraná. BR 202021009130-0 U2. Depósito: 11 maio 2021.

MARTINS, H. F., DE OLIVEIRA SANTOS, L. T. S., DE CARVALHO, G. B. M., & MARTINEZ, E. A. Kombucha: a literature review. **Cuadernos de Educación y Desarrollo**, v. 15, n. 10, p. 11175-11197, 2023.

MARTINS, H. F., DE OLIVEIRA SANTOS, L. T. S., DE CARVALHO, G. B. M., & MARTINEZ, E. A. Economic feasibility of the kombucha production with guarana syrup and honey. **Observatório De La Economía Latinoamericana**, v. 22, n. 10, p. e7455-e7455, 2024b.

MARTINS, H. F., SANTOS, L. T. S. DE O., CARVALHO, G. B. M. DE, LIMA, R. P. DE, LIMA, M. DOS S., ARAÚJO, A. J. DE B., & MARTINEZ, E. A. Qualidade físico-química de kombuchas de chá preto adoçadas com mel de abelha e xarope de guaraná. In **Anais do 15º SLACAN - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos e Nutrição**, ISBN: 978-65-89463-70-2, 2024a.

MATIAS, F.; GALLINA, E. S. **Processo de preparo de bebida usando consórcio microbiano para a fermentação e chá mate como matéria-prima**. Depositante: Meltech Tecnologia de Mel LTDA. BR 102018014077-9 A2. Depósito: 10 set. 2018.

MIRANDA, J. F., RUIZ, L. F., SILVA, C. B., UEKANE, T. M., SILVA, K. A., GONZALEZ, A. G. M., & LIMA, A. R. Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. **Journal of Food Science**, v. 87, n. 2, p. 503-527, 2022.

MORAIS, M. G.; LOPES, D. R.; COSTA, J. A. V. **Processo para produção de kombucha adicionada de spirulina e kombucha adicionada de spirulina**. Depositante: Universidade Federal do Rio Grande. BR 102024002794-9 A2. Depósito: 09 fev. 2024.

PEREIRA, A. L. F.; ABREU, V. K. G.; LEMOS, T. O.; DUTRA, R. P.; DOS REIS, A. S.; MENDONÇA, G. R.; PINTO, R. A. **Kombucha das folhas e dos caules de vinagreira ou joão-gomes e seu processo de obtenção**. Depositante: Universidade Federal Do Maranhão. BR 102020020531-5 A2. Depósito: 19 abr. 2022.

REZALDI, F., MARUF, A., PERTIWI, F. D., FATONAH, N. S., NINGTIAS, R. Y., FADILLAH, M. F., & SOMANTRI, U. W. Narrative Review: Kombucha's Potential As A Raw Material For Halal Drugs And Cosmetics In A Biotechnological Perspective. **International Journal Mathla'ul Anwar of Halal Issues**, v. 1, n. 2, p. 43-56, 2021.

SANCHES, F. F. Z.; FALASCHI, M. **Composição de kombucha sabor bocaíuva e seu método de desenvolvimento**. Depositante: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. BR 102022017404-0 A2. Depósito: 30 ago. 2022.

SANTOS, R. D. S., CASTRO, C. D. C., Rybka, A. C. P., Biasoto, A. C. T., & da Silva, F. L. H. Estudo prospectivo de documentos de patentes relacionados à produção de bebidas alcoólicas fermentadas de frutas. **Cadernos de Prospecção**, v. 14, n. 1, p. 209-221, 2021.

SCARIOT, K.; SCHREINER, J.; POLIDORO, T. A. **Processo fermentativo, dispositivo para fermentação e kombucha**. Depositante: Fundação Universidade De Caxias Do Sul. BR 102020024262-8 A2. Depósito: 07 jun 2022.

SCHIMPL, F. C., DA SILVA, J. F., DE CARVALHO GONÇALVES, J. F., & MAZZAFERA, P. Guarana: revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **Journal of ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 14-31, 2013.

STANEK-WANDZEL, N., ZARĘBSKA, M., WASILEWSKI, T., HORDYJEWICZ-BARAN, Z., ZAJSZŁY-TURKO, E., TOMAKA, M., & NIZIOŁ-ŁUKASZEWSKA, Z. Kombucha fermentation as a modern way of processing vineyard by-products into cosmetic raw materials. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 45, n. 6, p. 834-850, 2023.

CAPÍTULO 3

Propriedades físico-químicas de kombuchas de chá preto produzidas com diferentes fontes de carboidratos fermentáveis e determinação do teor de fibras do Scobys

**PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE KOMBUCHAS DE CHÁ PRETO
PRODUZIDAS COM DIFERENTES FONTES DE CARBOIDRATOS
FERMENTÁVEIS E DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FIBRAS DO SCOBYS**

Hevelynn Franco Martins^a, Cosme Damião Barbosa^b, Renato Pereira de Lima^c, Maria Emilia Ferreira da Mata Lima^d, Marcos dos Santos Lima^e, Ana Júlia de Brito Araújo^f, Leila Thaise Santana de Oliveira Santos^g, Giovani Brandão Mafra de Carvalho^h, Ernesto Acosta Martinez^{i*}

^a Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, Bahia, Brasil.

^b Departamento de Análises Bromatológicas, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.

^c Instituto Nacional do Semiárido, Campina Grande, Paraíba, Brasil.

^d Departamento de Tecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, Bahia, Brasil.

^{e,f} Departamento de Tecnologia. Instituto Federal do Sertão Pernambucano, Campus Petrolina. Petrolina, Pernambuco. Brasil.

^g Centro Universitário Nobre (UNIFAN). Feira de Santana, Bahia, Brasil.

^{h,i} Departamento de Tecnologia. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, Bahia.

*Autor correspondente: Prof. Dr. Ernesto Acosta Martinez, e-mail: ernesto.amartinez@uefs.br

Resumo

O metabolismo do açúcar por bactérias e leveduras desempenha um papel essencial no processo de fermentação da kombucha e influencia diretamente na qualidade da bebida. Este estudo avaliou a qualidade físico-química de kombuchas preparadas com chá preto e diferentes fontes de carboidratos fermentáveis (açúcar de mesa, mel de abelha e xarope de guaraná) e a caracterização química dos inóculos (Scobys). As bebidas fermentadas foram obtidas utilizando 1 L de água mineral com 5 g de chá preto, 45 g de Scoby, 100 mL de inóculo de kombucha e 50 g L⁻¹ de carboidrato durante 12 dias de fermentação. A fermentação foi mais intensa no kombucha com xarope de guaraná, apresentando maior consumo de glicose (até 64%) e frutose (até 64%) e acúmulo mais significativo de ácido cítrico (1,60 g. L⁻¹), ácido tartárico (0,39 g. L⁻¹) e álcool (0,8%) após 12 dias de fermentação. O maior acúmulo de ácido acético (16,93 g L⁻¹), ácido láctico (0,14 g. L⁻¹), acidez total (1,31 g.100mL⁻¹), acidez volátil (1,01 g.100mL⁻¹) e níveis de maltose (21,87 g. L⁻¹) foram observados no kombucha adoçado com mel de abelha após 12 dias de fermentação. Maiores concentrações de celulose (2,42-2,55%), foram obtidas nos testes utilizando a mistura de chás preto e verde (50-50%), com xarope de guaraná e mel. O mel de abelha e o xarope de guaraná impactam significativamente a acidez, doçura, teor alcoólico e sabor do chá preto kombucha ao longo do período de

fermentação.

Palavras-chave: *Scoby*; Bebida fermentada; Kombucha; Mel; Xarope de guaraná; *Camellia sinensis*.

Introdução

Kombucha é uma bebida fermentada à base de chá que ganhou popularidade recentemente devido aos seus potenciais benefícios à saúde, incluindo melhor digestão, fortalecimento do sistema imunológico e assistência na desintoxicação do corpo [1, 2]. O processo de fermentação é realizado por uma cultura simbiótica indefinida de bactérias do ácido acético (AAB) e leveduras (SCOBY), que convertem os açúcares presentes no chá em ácidos orgânicos, vitaminas e outros compostos bioativos [3]. Durante a fermentação, a sacarose é inicialmente hidrolisada por leveduras em glicose e frutose. As AAB e leveduras metabolizam os monossacarídeos para produzir ácidos glucônico e glucurônico, celulose, etanol e dióxido de carbono. As AAB posteriormente metabolizam o álcool resultante em ácido acético [4]. Após a fermentação, o kombucha compreende uma ampla diversidade de microrganismos e compostos não patogênicos, como fenólicos, ácidos cítrico e acético, açúcares e etanol, que são responsáveis por fornecer sabor, aroma e propriedades funcionais [5].

A composição química da kombucha pode ser influenciada por fatores como o tipo e a concentração do chá, a fonte de carboidrato, os compostos de microrganismos no inóculo, o tempo de fermentação e as condições de armazenamento [5, 6], que impactam diretamente na qualidade e aceitação do produto. O tipo de chá e as fontes de carboidrato afetam o perfil de compostos bioativos e o sabor da bebida [4]. Por sua vez, o tempo de fermentação e as condições de armazenamento influenciam a síntese de ácidos orgânicos e outros metabólitos, bem como a estabilidade microbiológica do produto [6].

O chá preto, devido ao seu alto teor de polifenóis e antioxidantes, é um dos mais

utilizados na produção do chá de kombucha [7]. O açúcar branco é o carboidrato mais utilizado; no entanto, o consumo excessivo de bebidas adoçadas com açúcar tem sido associado a epidemias globais de obesidade e doenças crônicas [8]. Nesse sentido, há uma busca por produtos naturais alternativos, como fontes de carboidratos fermentáveis ricos em antioxidantes, vitaminas e minerais [7]. O mel é um carboidrato natural com vitaminas, minerais e compostos bioativos [9]. Ao mesmo tempo, o xarope de guaraná é um carboidrato natural rico em cafeína e ácido guarânico, o que pode conferir propriedades estimulantes à bebida [10]. No entanto, apesar do alto potencial do mel de abelha e do xarope de guaraná como adoçantes naturais, as informações sobre seu uso na produção de kombucha são escassas, e ainda não há uma caracterização adequada da qualidade da bebida.

A colônia gelatinosa ou Scoby que cresce durante o processo de fermentação tem papel crucial na produção de bebidas fermentadas e se caracteriza por ser rica em polímeros como a celulose, produzida por *Gluconacetobacter* e *Komagataeibacter*. A celulose $(C_6H_{10}O_5)_n$ é o polímero mais abundante no mundo, de baixo custo e facilmente encontrado em plantas e/ou seus resíduos, fungos, protozoários e procariontes [11]. A celulose bacteriana pode ser obtida com maior pureza e apresenta maior grau de polimerização, melhor resistência mecânica, hidrofiliabilidade e índice de cristalinidade do que a celulose vegetal. Além disso, também apresenta maior resistência à tração e capacidade de retenção de água, tornando-se uma matéria-prima mais adequada para produção de filmes com atividade antimicrobiana, membranas de filtração e alimentos de sobremesa [12, 13]. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a qualidade físico-química de kombuchas e a caracterização química de Scobys preparado com chá preto e adoçado com mel e xarope de guaraná como fontes de açúcar. Avaliar o impacto desses fatores nas características físico-químicas da kombucha é essencial para entender e modificar a qualidade da bebida, promovendo sua aceitabilidade e segurança para consumo. Por outro lado, a caracterização de Scoby é importante para determinar possíveis aplicações em

diversas áreas.

Materiais e métodos

Suprimentos químicos e biológicos

As folhas de chá preto (*Camellia sinensis*), açúcar de mesa, xarope de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) e o mel de abelha (*Apis mellifera*) foram adquiridos no mercado local em Feira de Santana, Bahia, Brasil. Um produtor artesanal local forneceu as culturas starter (caldo fermentado e filme de celulose).

Processo de fermentação e amostragem

Os extratos de chá foram preparados pela infusão de 5 g de folhas de chá preto em 1 L de água mineral por 10 minutos, seguida de filtração por membrana filtrante. Em seguida, foram adicionados 50 g de carboidrato e agitados até a dissolução. Foram utilizadas três fontes de carboidratos fermentáveis: 1 – açúcar cristal (carboidrato tradicional – controle); 2 – mel de abelha (carboidrato natural); 3 – xarope de guaraná (carboidrato natural). Após o resfriamento dos chás a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, a filha scoby (película de celulose) foi adicionada à bebida juntamente com 10% de cultura starter (caldo fermentado) [14, 15]. As fermentações foram realizadas por 12 dias, por método artesanal, em recipiente de vidro de 3 L com abertura de 9 cm de diâmetro, coberto com papel toalha, permitindo a passagem de ar sem insetos ou outras sujidades físicas (Fig. 1).

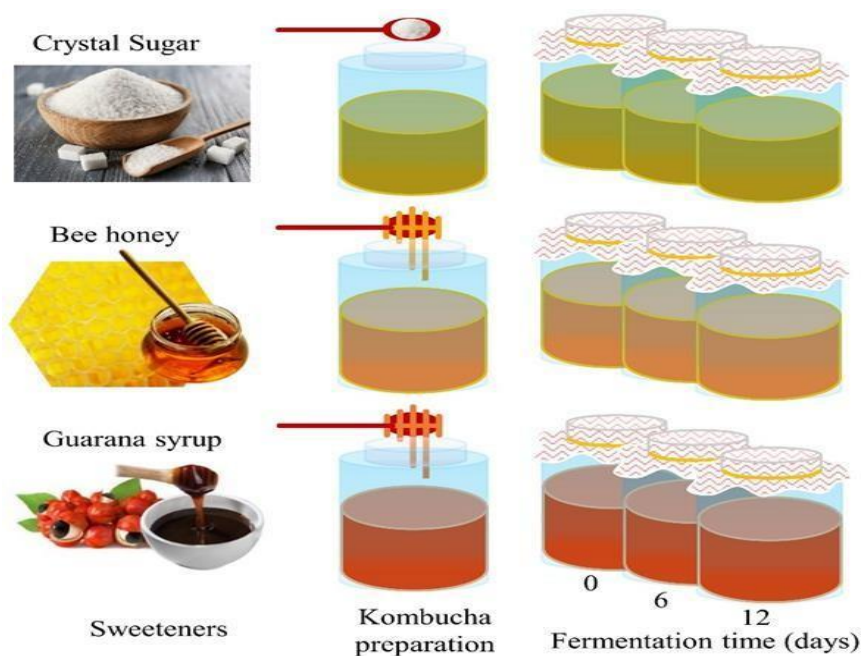


Figura 1. Diagrama representativo de preparações de chá preto kombucha adoçadas com açúcar, mel e xarope de guaraná .

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com três repetições biológicas. Os fatores em estudo foram dispostos em esquema fatorial 3×3 , correspondendo a três fontes de carboidratos fermentáveis (açúcar de mesa, mel e xarope de guaraná) e três períodos de amostragem (0, 6 e 12 dias de fermentação). A amostragem do dia 0 correspondeu à infusão logo após a adição do inóculo de kombucha. Amostras de filme de celulose e caldo fermentado foram armazenadas a 4°C.

Caracterização físico-química de kombuchas

As amostras foram centrifugadas (centrífuga Excelsa Baby I FANEM) a 2240×g por 5 minutos, e o sobrenadante foi usado para análises posteriores. As concentrações de açúcares totais (AT) e açúcares redutores (AR) foram determinadas por reação com DNS e leitura em espectrofotômetro (540 nm) conforme descrito por Vasconcelos *et al.* [16]. A acidez titulável total (ATT), acidez volátil e fixa foram realizadas por titulação simples conforme descrito por Barbosa *et al.* [14]. As concentrações de etanol (E), glicose, frutose, maltose e ácidos cítrico, tartárico, succínico, málico, butírico, fórmico, láctico e acético individuais no kombucha foram

determinadas por HPLC usando a metodologia de Lima *et al.* [17].

As análises de HPLC foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida Agilent 1260 Infinity LC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). A coluna e a pré-coluna utilizadas foram uma Zorbax Eclipse Plus RP-C18 (100×4,6 mm, 3,5 µm) e uma Zorbax C18 (12,6×4,6 mm, 5 µm), respectivamente (Agilent Technologies). Antes da injeção da amostra, os kombuchas foram diluídos 1:2 com fase móvel A e filtrados através de uma membrana de 0,45 µm (Millex Millipore, Barueri, SP, Brasil). O solvente A foi uma solução de ácido fosfórico 0,1 mol/L (pH 2,0), e o solvente B foi metanol acidificado com 0,5% de H₃PO₄. O gradiente de eluição foi o seguinte: 0 a 5 min: 5% B; 5 a 14 min: 23% B; 14 a 30 min: 50% B; e 30 a 33 min: 80% B. O volume de injeção foi de 20 µL, e a detecção foi definida em 220, 280, 320, 360 e 520 nm. Além disso, a pureza espectral dos picos foi verificada usando a ferramenta de limiar para garantir a precisão da identificação de cada composto, de acordo com Da Padilha *et al.* [18]. Todos os reagentes e os padrões de HPLC usados neste estudo eram de grau analítico e foram obtidos da Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Caracterização físico-química de *Scobys*

Cada *scooby* foi retirado das kombuchas após 12 dias de fermentação e colocado em estufa a 50° C por 10 horas para obtenção do material seco.

O método do clorito ácido foi utilizado na análise de α -celulose com algumas modificações conforme descrito por Silva *et al.* [19].

Análise estatística

As análises foram realizadas usando o software R versão 4.2.3 [20]. Os dados foram submetidos à ANOVA bidirecional. Um teste post-hoc Sidak foi usado para comparar médias entre tempos de fermentação para cada kombucha e entre kombuchas em cada tempo de fermentação. As suposições de normalidade e homogeneidade de variância foram avaliadas

usando os testes de Shapiro- Wilk e Levene , respectivamente. As diferenças foram consideradas significativas em um limite de probabilidade de 5% ($p < 0,05$). Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Resultados e discussão

Perfis de açúcar em kombuchas

As concentrações de açúcares redutores, açúcares totais e etanol durante 12 dias de fermentação são apresentadas na Fig. 2. O tipo de carboidrato utilizado na preparação da kombucha e o tempo de fermentação influenciaram significativamente as características físico-químicas das bebidas. O teor de glicose foi maior no kombucha adoçado com açúcar ao longo do tempo de fermentação, com valores de 66,31, 59,60 e 52,00 g. L⁻¹ em 0, 6 e 12 dias, respectivamente (Fig. 2A). De modo geral, a concentração de glicose diminuiu ao longo do período de fermentação, exceto no kombucha adoçado com xarope de guaraná , que apresentou pico no teor de glicose (38,45 g. L⁻¹) no dia 6 e consumo subsequente de 63,8% nos últimos 6 dias, correspondendo a uma concentração de 13,9 g. L⁻¹ em 12 dias.

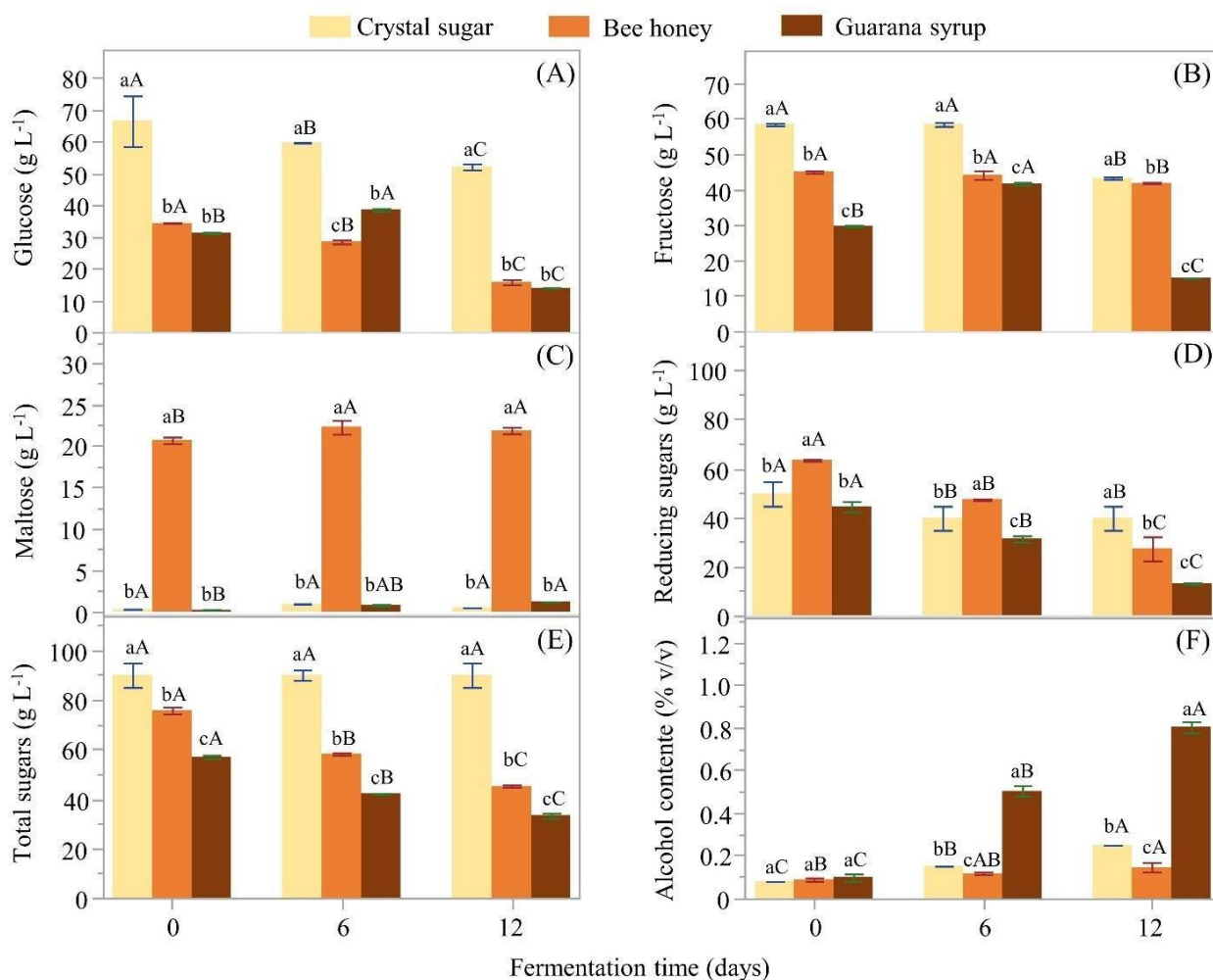


Figura 2. Concentrações de açúcar e teor alcoólico de kombuchas de chá preto adoçado com mel ou xarope de guaraná durante o tempo de fermentação. Os resultados são expressos como média $\pm$ DP (n = 3). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as fontes de carboidratos fermentáveis dentro de cada nível de tempo de fermentação. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de fermentação dentro de cada nível de carboidrato.

O teor de frutose foi maior no kombucha adoçado com açúcar em todos os tempos de fermentação, seguido pelo adoçado com mel (Fig. 2B). Nessas bebidas, não houve alterações significativas nos níveis de frutose até o 6º dia de fermentação, mas houve uma redução de 5,33% e 25,07%, respectivamente, entre os dias 6 e 12. Por outro lado, no kombucha contendo xarope de guaraná, o teor de frutose atingiu o pico (41,58 g L⁻¹) no dia 6, seguido por uma redução de 64% na concentração no dia 12 de fermentação.

Enquanto outros açúcares foram metabolizados durante o período de fermentação, a concentração de maltose permaneceu essencialmente constante (Fig. 2C). Kombuchas adoçadas com mel apresentaram níveis mais altos de maltose (20,69 a 22,27 g. L⁻¹) em comparação com aquelas adoçadas com açúcar (0,30 a 0,90 gL⁻¹) ou xarope de guaraná (0,23 a 1,20 gL⁻¹). Em kombuchas adoçadas com açúcar, os açúcares redutores e totais permaneceram quase constantes durante a fermentação (Fig. 2D e 2E). Por outro lado, em kombuchas adoçadas com mel ou xarope de guaraná, tanto os açúcares redutores quanto os açúcares totais diminuíram gradualmente com o aumento do tempo de fermentação, com concentrações mais altas naquelas adoçadas com mel.

Kombucha é um chá espumante tipicamente adoçado com açúcar, principalmente sacarose [4]. Diferenças nos níveis de açúcares entre os kombuchas pode ser atribuído à composição inicial dos fontes de carboidratos fermentáveis e à atividade de bactérias e leveduras durante a fermentação [21]. Enquanto o açúcar de mesa compreende principalmente sacarose, o mel é rico em frutose, glicose e maltose [9, 22], e o xarope de guaraná é rico em glicose, sacarose, taninos e proteínas [23, 10]. Por sua vez, as bactérias e leveduras no kombucha são capazes de metabolizar diferentes tipos de carboidratos por meio da ação de enzimas liberadas no líquido, mas com velocidades e eficiências variadas dependendo da comunidade microbiana, da presença e concentração do substrato, tempo de fermentação, pH, etc. [14, 24-26]. Portanto, os substratos presentes em cada tipo de carboidrato impactam a disponibilidade e a taxa de produção de glicose e frutose no meio de fermentação, para serem usados como fontes primárias de carbono e energia pelo AAB para produzir ácidos glucônico e glucurônico [4, 24], afetando a taxa de produção de ácidos orgânicos e álcool. A redução gradual nas concentrações de glicose, frutose, açúcares redutores e açúcares totais ao longo da fermentação confirma seu uso como fonte de carbono na produção de metabólitos, crescimento microbiano e produção de energia por AAB e leveduras [27]. A kombucha produzida com

açúcar apresentou níveis mais altos de glicose, frutose e, conseqüentemente, açúcares redutores ao longo do tempo de fermentação, resultando em uma maior disponibilidade de açúcares para fermentação. No entanto, os açúcares totais no kombucha com açúcar permaneceram constantes ao longo do tempo, indicando que a fermentação pode ter atingido um equilíbrio entre a produção e o consumo de açúcar.

Por outro lado, no kombucha adoçado com mel e xarope de guaraná, os açúcares totais foram gradualmente reduzidos, sugerindo um uso mais eficiente desses açúcares ao longo da fermentação. Os kombuchas adoçados com mel apresentaram maior teor de açúcares redutores e totais do que aqueles com xarope de guaraná. O pico de glicose observado no kombucha com xarope de guaraná no 6º dia pode resultar da hidrólise aumentada da sacarose em glicose e frutose durante os primeiros dias de fermentação [24, 25]. O maior teor de frutose no kombucha com mel em comparação ao xarope de guaraná pode ser explicado pelo fato de que este adoçante é uma fonte rica em açúcar [22]. A redução na concentração de frutose ao longo do tempo ocorreu principalmente nos estágios finais da fermentação dos kombuchas, indicando uma mudança na fonte de carbono preferida de glicose para frutose a partir do sexto dia de fermentação.

O aumento (5%) na maltose durante a fermentação de kombuchas com mel e xarope de guaraná pode ser atribuído à ação de enzimas amilolíticas no Scoby. Kombuchas com mel exibiram níveis de maltose muito mais altos, o que pode ser explicado pelos polissacarídeos na fonte de carboidrato fermentável que são mais facilmente hidrolisados por enzimas amilolíticas [22]. É essencial destacar que a maltose em alimentos fermentados, como kombucha, impacta positivamente a qualidade do produto, incluindo contribuições para doçura, aumento da viscosidade e estabilização da cor [28].

Comportamento de teor alcoólico

O teor alcoólico (média de 0,09%) foi semelhante entre as infusões de kombucha no tempo 0 de fermentação, ou seja, logo após a adição do inóculo de kombucha (Fig. 2F). O teor alcoólico no kombucha adoçado com xarope de guaraná foi 3,2 e 5,5 vezes maior do que aqueles detectados nos kombuchas adoçados com açúcar e mel, respectivamente, após 12 dias de fermentação .

O maior teor alcoólico no kombucha com xarope de guaraná pode ser explicado pela atividade fermentativa mais significativa associada ao maior consumo de açúcar [26]. Ou seja, foi verificada uma redução de 13%, 44% e 64% no teor de glicose nos kombuchas com açúcar, mel e xarope de guaraná , respectivamente, do 6º ao 12º dia de fermentação. A diferença no consumo de frutose foi ainda mais significativa (64%) com o xarope de guaraná. Em comparação, os kombuchas com açúcar e mel tiveram apenas 26% e 5% de redução entre os 6º e 12º dias de fermentação (Fig. 2A e 2B). Assim, o maior consumo de substrato resultou em maior produção de álcool, sugerindo uma maior eficiência na conversão de açúcares em álcool nos kombuchas adoçados com xarope de guaraná por bactérias e leveduras [24, 25].

Neste estudo, apenas o kombucha adoçado com xarope de guaraná apresentou teores alcoólicos acima de 0,5% v/v, chegando a 0,80% no 12º dia de fermentação. De acordo com a legislação vigente (Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019), este kombucha pode ser considerado alcoólico após 12 dias de fermentação e está sujeito a regulamentações federais e estaduais [29]. No entanto, os kombuchas adoçados com mel e açúcar mantiveram níveis de álcool abaixo de 0,5% em todos os dias de fermentação, não sendo considerados alcoólicos. De acordo com Rukman e Haerussara [30], na fermentação com chá verde, o mel produz o maior teor de álcool (2,78 %). Azfaralariff *et al.* [31] relataram o maior teor de etanol produzido com mel (3,49 mg/L), seguido por sacarose (3,25 mg/L) e açúcar mascavo (2,14 mg/L) em caldo de chá preto. O teor de álcool é uma característica crucial a ser considerada na

produção de bebidas fermentadas, especialmente kombucha, devido à sua popularidade e potencial impacto na saúde do consumidor [32].

Ácidos orgânicos e medidas de acidez

As concentrações de ácido cítrico, tartárico e succínico aumentaram durante a fermentação de kombuchas adoçadas com mel e xarope de guaraná. Ainda assim, elas diminuíram ou permaneceram constantes no kombucha adoçado com açúcar entre os dias 6 e 12 (Tabela 1). Os ácidos aumentaram durante a fermentação devido à atividade de microrganismos, como *Komagataeibacter*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Lactobacillus* e outros [25, 33]. Geralmente, kombuchas com mel e xarope de guaraná exibiram níveis mais altos desses ácidos, o que pode ser atribuído a compostos específicos nessas fontes de açúcar que favorecem a produção de ácidos orgânicos pelos microrganismos presentes na fermentação. Por exemplo, kombuchas com mel apresentaram maior concentração de ácido acético, o que pode ser atribuído à produção mais excelente desse ácido pelo AAB [25, 33]. Após 12 dias de fermentação, os níveis de ácidos cítrico e tartárico foram maiores em kombuchas com xarope de guaraná, seguidos daqueles feitos com mel. Concentrações semelhantes de ácido succínico foram encontradas em kombuchas com xarope de guaraná e mel, com valores maiores que os observados no kombucha adoçado com açúcar após 12 dias e maiores que os registrados no kombucha adoçado com açúcar (Tabela 1).

Tabela 1. Teores de ácidos orgânicos e acidez total de kombuchas de chá preto adoçadas com mel ou xarope de guaraná durante o tempo de fermentação.

Tempo de fermentação (dias)			
	0	6	12

Ácido cítrico (g L ⁻¹)	Sacarose	0,02 ± 0,01 ^{aC}	1,00 ± 0,00 ^{bA}	0,30 ± 0,01 ^{cB}
	Mel de abelha	0,03 ± 0,02 ^{aC}	0,34 ± 0,04 ^{CB}	0,83 ± 0,08 ^{bA}
	xarope de guaraná	0,38 ± 0,02 ^{aC}	1,18 ± 0,16 ^{aB}	1,60 ± 0,08 ^{aA}
Ácido tartárico (g L ⁻¹)	Sacarose	0,00 ± 0,00 ^{aC}	0,13 ± 0,00 ^{aA}	0,05 ± 0,01 ^{cB}
	Mel de abelha	0,03 ± 0,02 ^{aC}	0,07 ± 0,01 ^{cB}	0,23 ± 0,02 ^{bA}
	xarope de guaraná	0,00 ± 0,00 ^{aC}	0,09 ± 0,01 ^{bB}	0,39 ± 0,03 ^{aA}
Ácido succínico (g L ⁻¹)	Sacarose	0,60 ± 0,05 ^{aA}	0,60 ± 0,02 ^{aA}	0,62 ± 0,00 ^{bA}
	Mel de abelha	0,56 ± 0,03 ^{aB}	0,64 ± 0,01 ^{aB}	0,78 ± 0,08 ^{aA}
	xarope de guaraná	0,41 ± 0,04 ^{aC}	0,70 ± 0,10 ^{aB}	0,86 ± 0,05 ^{aA}
	Sacarose			
Ácido málico (g L ⁻¹)		2,80 ± 0,05 ^{aB}	3,30 ± 0,01 ^{aA}	2,15 ± 0,05 ^{aC}
	Mel de abelha	E	E	E
	xarope de guaraná	E	E	E
Ácido butírico (g L ⁻¹)	Sacarose	E	E	E
	Mel de abelha	0,92 ± 0,03	E	E
	xarope de guaraná	E	e	E
Ácido fórmico (g L ⁻¹)	Sacarose	E	0,08 ± 0,01	E
	Mel de abelha	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,05	E
	xarope de guaraná	E	E	0,01 ± 0,00 ^{aA}
Ácido láctico (g L ⁻¹)	Sacarose	0,00 ± 0,00 ^{aB}	0,00 ± 0,00 ^{CB}	0,10 ± 0,00 ^{aA}
	Mel de abelha	0,00 ± 0,00 ^{aB}	0,14 ± 0,04 ^{aA}	0,14 ± 0,08 ^{aA}
	xarope de guaraná	0,00 ± 0,00 ^{aB}	0,08 ± 0,03 ^{bA}	0,11 ± 0,05 ^{aA}
Ácido acético (g L ⁻¹)	Sacarose	1,15 ± 0,06 ^{aB}	1,60 ± 0,01 ^{bB}	12,75 ± 0,01 ^{bA}
	Mel de abelha	1,03 ± 0,03 ^{aC}	10,08 ± 1,41 ^{aB}	16,93 ± 0,35 ^{aA}
Característica	Carboidrato			
	xarope de guaraná	1,18 ± 0,29 ^{aB}	2,13 ± 0,32 ^{bB}	5,38 ± 0,37 ^{cA}
Acidez fixa (g 100ml ⁻¹)	Sacarose	0,01 ± 0,00 ^{aA}	0,08 ± 0,00 ^{bA}	0,09 ± 0,00 ^{bA}
	Mel de abelha	0,04 ± 0,00 ^{aB}	0,25 ± 0,01 ^{aA}	0,27 ± 0,01 ^{aA}
	xarope de guaraná	0,13 ± 0,17 ^{aA}	0,12 ± 0,03 ^{bA}	0,19 ± 0,01 ^{abA}
Acidez volátil (g 100ml ⁻¹)	Sacarose	0,09 ± 0,00 ^{aA}	0,10 ± 0,00 ^{bA}	0,10 ± 0,00 ^{cA}
	Mel de abelha	0,08 ± 0,00 ^{aC}	0,68 ± 0,08 ^{aB}	1,01 ± 0,01 ^{aA}
	xarope de guaraná	0,06 ± 0,05 ^{aB}	0,13 ± 0,03 ^{bB}	0,34 ± 0,05 ^{bA}
Acidez total (g 100ml ⁻¹)	Sacarose	0,09 ± 0,00 ^{aB}	1,00 ± 0,00 ^{aB}	1,26 ± 0,04 ^{aA}
	Mel de abelha	0,12 ± 0,01 ^{aB}	0,92 ± 0,08 ^{aB}	1,31 ± 0,04 ^{aA}
	xarope de guaraná	0,13 ± 0,02 ^{aB}	0,25 ± 0,05 ^{bB}	0,54 ± 0,06 ^{bA}

Os resultados são expressos como média ± DP (n = 3). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa (p < 0,05) entre o carboidrato, dentro de cada nível de tempo de fermentação. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa (p < 0,05) entre o tempo de fermentação, dentro de cada nível de carboidrato.

O ácido málico foi detectado apenas no kombucha adoçado com açúcar, apresentando

um pico ($3,30 \text{ g. L}^{-1}$) aos 6 dias de fermentação, enquanto o ácido butírico foi detectado apenas no kombucha com mel no dia 0 de fermentação ($0,92 \text{ g. L}^{-1}$). O ácido fórmico (em concentrações de até $0,08 \text{ g. L}^{-1}$) foi detectado apenas no kombucha com açúcar aos 6 dias, no kombucha com mel até 6 dias de fermentação, ou no kombucha feito com xarope de guaraná após 12 dias de fermentação. O kombucha adoçado com açúcar contém concentração de ácido láctico ($0,10 \text{ g. L}^{-1}$) após 12 dias, enquanto os kombuchas adoçados com mel ($0,14$ e $0,14 \text{ g. L}^{-1}$) e xarope de guaraná ($0,08$ e $0,11 \text{ g. L}^{-1}$) exibiram esse ácido nos dias 6 e 12, respectivamente (Tabela 1). De acordo com Chakravorty et al. (2018) [34], a presença de ácido láctico e cítrico também foi relatada em alguns estudos, embora não sejam os produtos metabólicos característicos das bebidas tradicionais de kombuchá.

As bebidas com mel apresentaram maiores concentrações de ácido acético do que aquelas feitas com açúcar e xarope de guaraná após 6 e 12 dias de fermentação. Esse resultado era esperado, já que o mel contém uma variedade de açúcares fermentescíveis, como glicose, frutose e maltose, que favorecem o metabolismo de bactérias acéticas (*Komagataeibacter* e *Acetobacter*), responsáveis pela produção de ácido acético. As concentrações do ácido aumentaram em todos os kombuchas durante a fermentação, com valores superiores a 16, 11 e 4,5 vezes nos kombuchas com mel, com açúcar e com xarope de guaraná, respectivamente, ao final da fermentação (Tabela 1). Esse aumento é benéfico até certo ponto, pois o ácido acético contribui para o sabor ácido característico da kombucha e possui propriedades antimicrobianas que auxiliam na preservação da bebida. No entanto, teores muito elevados podem comprometer a aceitabilidade sensorial, sendo necessário equilíbrio entre acidez e palatabilidade.

Foi observado um aumento de $0,04$ a $0,25 \text{ g.100ml}^{-1}$ até 6 dias de fermentação, que se manteve constante até o dia 12, nos valores fixos de acidez no kombucha adoçado com mel. Por outro lado, nos kombuchas com açúcar (média de $0,06 \text{ g.100ml}^{-1}$) e xarope de guaraná (média de $0,15 \text{ g.100ml}^{-1}$), não houve variação significativa ao longo do tempo de fermentação.

Kombuchas com mel apresentaram maiores valores de acidez volátil e total do que aquelas produzidas com açúcar ou xarope de guaraná nos dias 6 e 12. Um aumento nos valores de acidez volátil e total foi notado ao longo da fermentação, independentemente do carboidrato. Maior acidez volátil ($1,01 \text{ g.100ml}^{-1}$) e acidez total ($1,26 \text{ g.100ml}^{-1}$) foram observadas na bebida produzida com mel. A acidez total não apresentou diferenças significativas em comparação com a produzida com xarope de guaraná ($1,31 \text{ g.100ml}^{-1}$). Embora a glicose seja preferencialmente consumida, especialmente em altas concentrações, a maltose pode desempenhar um papel significativo em estágios posteriores da fermentação, quando a maior parte da glicose foi consumida [35]. Os resultados indicam que a maltose se tornou um substrato essencial no kombucha com mel, contribuindo para o desenvolvimento e atividade do AAB e o sabor ácido característico da kombucha [36]. É essencial destacar que esta é uma área de pesquisa em desenvolvimento e mais estudos são necessários para determinar os mecanismos específicos pelos quais a maltose ou outros constituintes do mel podem influenciar a produção de ácido acético no kombucha.

As propriedades físico-químicas da kombucha dependem do tipo de carboidrato, que afeta a doçura, acidez e teor alcoólico da bebida. Este fato pode estar associado às diferenças nas concentrações e eficiência dos microrganismos, interações complexas no ecossistema microbiano multiespécies e concentrações de substrato [24, 26].

Esses resultados podem ser potencialmente usados por produtores, consumidores e profissionais de saúde interessados nos benefícios e riscos associados ao consumo de kombucha [37]. Notavelmente, o uso de mel como carboidrato fermentável pode ser recomendado para consumidores que buscam kombuchas com concentrações moderadas de açúcar, níveis mais baixos de álcool (kombucha não alcoólico) e concentrações mais altas de ácidos orgânicos, principalmente ácido acético. Estudos de análise sensorial são necessários para obter informações sobre as propriedades organolépticas e a aceitabilidade geral da kombucha.

adoçado com mel e xarope de guaraná pelos consumidores.

O teor de umidade dos Scobys obtidos em cada teste é apresentado na Fig. 3. Os Scobys apresentaram teor de umidade superior a 80%, com o maior nível de umidade (98%) utilizando xarope de guaraná e chá verde (Fig. 3). Segundo Schroeder (2019) [38], a celulose microbiana é produzida extracelularmente na forma de fibrilas. Uma das principais características da celulose é sua capacidade de absorver água, o que poderia explicar os altos níveis de umidade.

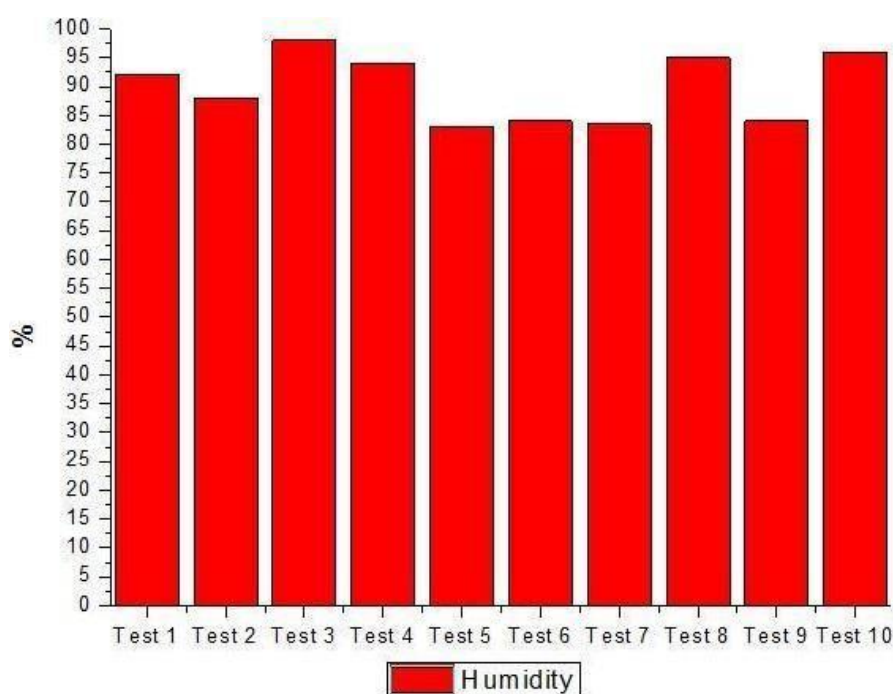


Figura 3. Teor de umidade dos Scobys obtidos nos diferentes testes: 1, xarope de guaraná e chá preto; 2, mel e chá preto; 3, xarope de guaraná e chá verde; 4, chá verde e mel; 5, 6 e 7, chás preto e verde + xarope de guaraná e mel que serão utilizados como pontos centrais, além dos controles que são definidos como 8, chá preto + açúcar cristal, 9, chá verde + açúcar cristal e 10, chás preto e verde + açúcar cristal.

Os teores de α -celulose dos Scobys obtidos em diferentes combinações de chás e fontes de carboidratos fermentáveis estão apresentados na Tabela 2. As características químicas dos Scobys, como os teores de α -celulose, são importantes na kombucha por influenciarem diretamente a estrutura, resistência mecânica e capacidade de retenção de água da matriz celulósica. Esses parâmetros estão associados à qualidade do biofilme formado durante a

fermentação, que atua como suporte para o crescimento microbiano e pode ter aplicações tecnológicas em alimentos funcionais, embalagens e biomateriais.

Tabela 2. Composição química dos Scobys obtidos a partir de mostos enriquecidos com 1, xarope de guaraná e chá preto, 2, mel e chá preto; 3, xarope de guaraná e chá verde; 4, chá verde e mel, 5, 6 e 7, chás preto e verde + xarope de guaraná e mel que serão utilizados como pontos centrais, além dos controles que são definidos como 8, chá preto + açúcar cristal, 9, chá verde + açúcar cristal e 10, chás preto e verde + açúcar cristal.

Teste	α -celulose (%)
1	2,41
2	2,38
3	2,32
4	2,35
5	2,55
6	2,42
7	2,48
8	1,32
9	1,52
10	1,07

Fonte: Os autores (2025)

Conclusão

O tipo de carboidrato utilizado para preparar o kombucha e o tempo de fermentação influenciam significativamente sua composição físico-química. O kombucha adoçado com xarope de guaraná apresentou maior consumo de carboidratos e teores de álcool (>0,5%) e ácidos cítrico e tartárico. Por outro lado, os kombuchas adoçados com mel e açúcar mantiveram níveis de álcool abaixo do limite legal para bebidas não alcoólicas. As concentrações de ácidos acético, cítrico e tartárico apresentaram variações significativas de acordo com o tipo de carboidrato utilizado. Tempos de fermentação mais longos melhoram a qualidade da kombucha

por meio do acúmulo mais significativo de maltose e ácidos acético e málico. Ao mesmo tempo, os níveis de frutose ainda são altos no kombucha adoçado com mel.

Declaração de contribuição de autoria do crédito

Hevelynn Martins: Conceitualização, Curadoria de dados, Análise formal, Investigação, Metodologia e Redação - rascunho original. **Cosme Barbosa:** Redação - rascunho original e Redação - revisão e edição. **Renato Lima:** Software, Visualização, Redação - rascunho original e Redação - revisão e edição. **Maria Emília:** Análise formal, Investigação, Metodologia. **Marcos Lima:** Análise formal. **Ana Araújo:** Análise formal. **Leila Santos:** Investigação e Supervisão. **Giovanni de Carvalho:** Investigação e Supervisão. **Ernesto Martinez:** Aquisição de financiamento, Administração do projeto, Recursos, Supervisão e Redação - revisão e edição.

Declarações

Conflito de interesses Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Aprovação ética Não aplicável. **Consentimento para participar** Não aplicável.

Consentimento para publicação Não aplicável. **Disponibilidade do código** Não aplicável.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), Código Financeiro – 001. Agradecemos ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e ao Programa Interno Financeiro aos Programas de Pós-Graduação Estrito Sensu (AUXPPG) - termo de concessão nº 008/2024.

Referências

1. Barakat N, Beaufort S, Rizk Z, Bouajila J, Taillandier P, El Rayess Y (2023) Análogos de kombucha ao redor do mundo: uma revisão. Crit Rev Food Sci Nutrição . <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2069673> .
2. Jayabalan R, Waisundara , VY (2019) Kombucha como uma bebida funcional. Em: Bebidas funcionais e medicinais. Academic Press.
3. Zheng Y, Liu Y, Han S, He Y, Liu R, Zhou P (2024) Avaliação abrangente da qualidade e bioatividade do kombucha de seis principais tipos de chá na China. Int J Gastron Food Sci. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2024.100910>
4. Wang B, Rutherford-Markwick K, Naren N, Zhang XX, Mutukumira AN (2023) Características microbiológicas e físico-químicas do chá preto Kombucha fermentado com uma cultura inicial da Nova Zelândia. Alimentos. <https://doi.org/10.3390/foods12122314>
5. Grassi A, Cristani C, Palla M, Di Giorgi R, Giovannetti M, Agnolucci M (2022) Tempo de armazenamento e temperatura afetam a dinâmica microbiana de leveduras e bactérias do ácidoacético em uma bebida de kombucha. Int J Food Microbiol. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109934>
6. Martins HF, Santos LTSO, Carvalho GBM, Martinez EA (2023) Kombucha: uma revisão de literatura. CED. <https://doi.org/10.55905/cuadv15n10-065>
7. Jayabalan R, Malbaša RV, Lončar ES, Vitas JS, Sathishkumar M (2014) Uma revisão sobre chá de kombucha — microbiologia, composição, fermentação, efeitos benéficos, toxicidade e fungo do chá. Compr Rev Food Sci Food Saf . <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>
8. Malik VS, Hu FB (2022) O papel das bebidas adoçadas com açúcar nas epidemias globais de obesidade e doenças crônicas. Nat Rev Endocrinol 18:205-218 <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00627-6>
9. Araújo GS, Sampaio KF, Santos FS, Bastos TDS., Oliveira PP, de Carvalho GBM. Souza SMA,

- Martínez EA (2021) Análises bioquímicas, físico-químicas e melissopalínológicas de dois tipos de mel multifloral do Brasil e sua influência na produção de hidromel. J Apic Res <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1828236>
10. Schimpl FC, da Silva JF, Gonçalves JFC, Mazzafera P (2013) Guaraná : revisitando uma planta altamente cafeinada da Amazônia. J Etnofarmacol . <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.08.023>
 11. McNamara JT, Morgan JL, Zimmer J (2015) Uma descrição molecular da biossíntese de celulose. Annu Rev Biochem . <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033930>
 12. Chawla, PR, Bajaj, IB, Survase SA, Singhal R. S (2009) Celulose microbiana: produção fermentativa e aplicações (revisão). Tecnologia de alimentos. Biotecnologia . 47 (2) 107– 124
 13. Morais MGC et al. (2022) Potencial nutricional e biotecnológico do SCOBY produzido Específico de chá verde . Res. Soc. Dev. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i11.34064>
 14. Barbosa CD, Baqueta MR, Santos WCR, Gomes D, Alvarenga VO, Teixeira P, Albano H, Rosa CA, Valderrama P, Lacerda IC (2020) Fusão de dados UPLC, espectros NIR e parâmetros físico-químicos com quimiometria como alternativa para avaliar a fermentação do kombuchá . LWT. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109875>
 15. Suciati F, Nurliyani N, Indratiningsih I (2019) Propriedades físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do soro de leite fermentado usando inóculo de Kombuchá . Boletim Peternakan . <https://doi.org/10.21059/buletinpeternak.v43i1.31496>
 16. Vasconcelos NM, Pinto GAS, Aragão FAS (2013) Determinação de Açúcares redutores pelo ácido 3,5 -Dinitrosa licílico: Histórico do Desenvolvimento de método e estabelecimento de um protocolo para o Laboratório de Bioprocessos. Embrapa Agroindústria de Alimentos . Fortaleza
 17. Lima MS, Ferreira TJ, de Souza MEAO, Pereira GE, Fedrigo IMT (2022) Rede neural artificial : uma ferramenta poderosa na associação de compostos fenólicos com atividade antioxidante de sucos de uva. Food Anal Methods . <https://doi.org/10.1007/s12161-021-02144-8>

18. Da Padilha CVS, Miskinis GA, Souza MEOS, Pereira GE, Oliveira D, Bordignon-Luiz MT, dos Santos ML (2017) Determinação rápida de flavonóides e ácidos fenólicos em sucos de uva e vinhos por RP-HPLC/DAD: Método de validação e caracterização de produtos comerciais das novas variedades de uva brasileiras. *Quim Alim.* <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.137>
19. Silva TAL, Zamora-Zamora HD, Varao LHR, Pasquini D, Baffi, MA (2016) Avaliação do efeito da explosão a vapor catalisada por NaOH na composição química e estrutural do bagaço de cana-de-açúcar. In: I Workshop do núcleo de biorrefinaria da rede mineira de Química & I Workshop do Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis UFVJM-UFU.
20. R Core Team (2018) R: Uma linguagem e ambiente para computação estatística. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria.
21. Watawana MI, Jayawardena N, Ranasinghe SJ, Waisundara VY (2017) Avaliação do efeito de diferentes agentes adoçantes nos teores de polifenóis e propriedades antioxidantes e inibitórias da hidrolase do amido do Kombucha . *J Food Process Pres.* <https://doi.org/10.1111/jfpp.12752>
22. Nordin A, Sainik NQAV, Chowdhury SR, Saim AB, Idrus RBH (2018) Propriedades físico-químicas do mel de abelhas sem ferrão de todo o mundo: uma revisão abrangente. *J Food Compos Anal* . <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.06.002>
23. Santos KL, de Sousa PHM, Cavalcanti -Mata MERM, de Vasconcelos LB (2021) Couro misto de xarope de açaí , banana, amendoim e guaraná : efeito do uso de ágar e goma gelana nos atributos de qualidade. *Int J Gastron Food Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2021.100407>
24. May A , Narayanan S, Alcock J, Varsani A, Maley C, Aktipis A (2019) Kombucha : Um novo sistema modelo para cooperação e conflito em um ecossistema microbiano multiespécies complexo. *Peer J.* <https://doi.org/10.7717/peerj.7565>
25. Oliveira ÍACLD, Rolim VADO, Gaspar RPL, Rossini DQ, de Souza R, Bogsan CSB (2022) As

- perspectivas tecnológicas do kombucha e suas implicações para a produção. Fermentação. <https://doi.org/10.3390/fermentation8040185>
26. Villarreal-Soto SA, Beaufort S, Bouajila J, Souchard JP, Taillandier P (2018) Compreendendo a fermentação do chá de kombucha : uma revisão. J Food Sci. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>
27. Kallel L, Desseaux V, Hamdi M, Stocker P, Ajandouz EH (2012) Insights sobre a bioquímica da fermentação de chás de Kombucha e impactos potenciais da ingestão de Kombucha na digestão do amido. Food Res Int. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.018>
28. Clemens RA, Jones JM, Kern M, Lee SY, Mayhew EJ, Slavin JL, Zivanovic S (2016) Funcionalidade dos açúcares em alimentos e saúde. Compr Rev Food Sci Food Saf <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12194>
29. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Gabinete da Ministra. Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019. Estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade do Kombuchá em todo o território nacional. Diário Oficial da União, Brasília, 18 de setembro de 2019. Seção 1. <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-41-de-17-de-setembro-de-2019-216803534> Acessado em 07 fev 2025.
30. Rukman MS, Haerussana ANEM (2023) O efeito de diferentes adoçantes nas atividades de eliminação de radicais livres, teores de álcool, reduções de açúcar e propriedades hedônicas do chá verde kombucha . Pharm. Sci.Asia . <https://doi.org/10.29090/psa.2023.01.22.340>
31. Azfaralariff A, Vohra B, Fazry S, Douglas L, Sairi F, Othman BA (2022) Efeitos da cultura inicial e do adoçante em compostos bioquímicos e diversidade microbiana do chá de kombucha . Sains Malays. <http://doi.org/10.17576/jsm-2022-5111-1>
32. Rossini D, Bogsan C (2023). É possível fabricar Kombucha sem álcool? Cenário brasileiro após legislação restritiva. Fermentação. <https://doi.org/10.3390/fermentation9090810>

33. Antolak H, Piechota D, Kucharska A (2021) Chá de kombucha — Um poder duplo de compostos bioativos do chá e cultura simbiótica de bactérias e leveduras (SCOBY). Antioxidantes. <https://doi.org/10.3390/antiox10101541>
34. Chakravorty S, Bhattacharya D, Bhattacharya S , Sarkar S, Gachhui R (2019) Kombucha : uma bebida funcional promissora preparada a partir do chá. Bebida não alcoólica. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815270-6.00010-4>
35. D'Amore T, Russell I, Stewart GG (1989) Utilização de açúcar por levedura durante a fermentação. J Ind Microbiol . <https://doi.org/10.1007/BF01577355>
36. Miranda JF, Ruiz LF, Silva CB, Uekane TM, Silva KA, Gonzalez AGM, Fernandes FF, Lima AR (2022) Kombucha : Uma revisão de substratos, regulamentações, composição e propriedades biológicas. J Food Sci . <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16029>
37. Batista P, Penas MR, Pintado M Oliveira-Silva P (2022) Kombuchá: percepções e perspectivas futuras. Alimentos 11(13):1977. <https://doi.org/10.3390/foods11131977>
38. Schroeder J. (2019) Kombuchá fermentada a partir de extinção de acerola. Trabalho de Conclusão do Curso (Bacharel em Engenharia de Alimentos). 2019. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos , Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis .
39. Domeneghetti PA, Soares MG, Schmidt VCR (2019) Caracterização do scoby de kombuchá para a produção de filmes. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Uberlândia , MG.

CAPÍTULO 4

Crescimento do Scoby, compostos fenólicos, atividade antioxidante e cinética da fermentação de kombuchas produzidas com diferentes fontes de carboidratos fermentáveis e chás

CRESCIMENTO DO SCOPY, COMPOSTOS FENÓLICOS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO DE KOMBUCHAS PRODUZIDAS COM DIFERENTES FONTES DE CARBOIDRATOS FERMENTÁVEIS E CHÁS

Hevelynn Franco Martins¹, Renato Pereira de Lima², Marcos dos Santos Lima³, Ana Júlia de Brito Araújo⁴, Leila Thaise Santana de Oliveira Santos⁵, Giovani Brandão Mafra de Carvalho⁶, Ernesto Acosta Martinez⁷.

¹**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.** Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, Bahia, Brasil. hevelynn_martins@hotmail.com

²**Instituto Nacional do Semiárido,** Campina Grande, Paraíba, Brasil. renatolima.p@gmail.com

³**Departamento de Tecnologia. Instituto Federal do Sertão Pernambucano,** Campus Petrolina. Petrolina, Pernambuco. Brasil. marcos.santos.lima@ifsertao-pe.edu.br

⁴**Departamento de Tecnologia. Instituto Federal do Sertão Pernambucano,** Campus Petrolina. Petrolina, Pernambuco. Brasil. ana.julia@ifsertao-pe.edu.br

⁵**Centro Universitário Nobre (UNIFAN).** Feira de Santana, Bahia, Brasil. leilathaise@yahoo.com.br

⁶**Departamento de Tecnologia. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Estadual de Feira de Santana.** Feira de Santana, Bahia. brandao.phd@gmail.com

⁷**Departamento de Tecnologia. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Estadual de Feira de Santana.** Feira de Santana, Bahia. ernesto.amartinez@uefs.br

*Corresponding author: Ernesto Acosta Martinez Phone: +55 (75) 99176-5450

E-mail: ernesto.amartinez@uefs.br

Resumo

A kombucha é uma bebida fermentada obtida a partir do chá adoçado pela ação de uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts – SCOBY*), resultando na produção de compostos bioativos com potencial antioxidante e funcional. O objetivo do estudo foi avaliar a influência dos tipos de chá e carboidrato sobre o crescimento do *Scoby*, a qualidade físico-química da kombucha e sua atividade antioxidante. Foram utilizados chás preto e verde, combinados com açúcar cristal, mel de abelha e xarope de guaraná como fontes de carboidratos fermentáveis. O crescimento do *Scoby*, após a fermentação, foi significativamente maior nos tratamentos com mel de abelha e xarope de guaraná, indicando que esses substratos favorecem a proliferação microbiana e formação de nova biomassa. A análise dos compostos fenólicos revelou uma maior preservação de epicatequina galato e epigallocatequina galato nos tratamentos contendo chá verde, enquanto a presença de mel de

abelha modulou a conversão fenólica. A atividade antioxidante, avaliada pelos métodos DPPH e FRAP, foi superior nas kombuchas preparadas com chá verde, sugerindo uma maior estabilidade dos compostos bioativos. A escolha do chá e do carboidrato influencia diretamente a dinâmica fermentativa, a produção de *Scoby*, a composição fenólica e a capacidade antioxidante da kombucha, fornecendo informações valiosas para a formulação de bebidas com maior valor funcional.

Palavras-chave: Fermentação, compostos fenólicos, antioxidantes, *Scoby*, bebidas funcionais.

1. Introdução

A kombucha é uma bebida fermentada tradicionalmente produzida a partir da infusão de chá adoçado e da ação de uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts – SCOBY) (Villarreal-Soto *et al.*, 2018). Esse processo resulta na produção de uma matriz rica em ácidos orgânicos, compostos fenólicos, álcool, vitaminas, enzimas e polissacarídeos os quais conferem à kombucha propriedades funcionais e sensoriais assim como potenciais benefícios à saúde (Antolak *et al.*, 2021; Miranda *et al.*, 2022). Além disso, o crescimento do SCOBY, que se forma como uma matriz celulósica na superfície do líquido fermentado, é um indicativo do desenvolvimento das colônias bacterianas e da eficiência do processo fermentativo (Landis *et al.*, 2022). A popularidade dessa bebida tem aumentado globalmente, impulsionada pelo interesse do consumidor por produtos naturais e com propriedades bioativas (Oliveira *et al.*, 2022).

Pesquisas anteriores sugerem que a fermentação da kombucha pode aumentar a disponibilidade de compostos antioxidantes, mas os efeitos variam de acordo com a matéria-prima utilizada e as condições do processo fermentativo (Anantachoke *et al.*, 2023; Martins *et al.*, 2023). Diversas pesquisas avaliaram o efeito de fatores tais como tipo de chá utilizado (verde, preto, oolong, rooibos), carboidrato (açúcar cristal, açúcar mascavo, mel, melaço, glicose, extrato de malte, lactose) e tempo de fermentação sobre a qualidade da kombucha, impactando diretamente seu potencial antioxidante e bioativo (Barbosa *et al.*, 2021; Massoud *et al.*, 2022; Nyhan *et al.*, 2022; Vohra *et al.*, 2019).

Os compostos fenólicos presentes no chá e fontes de carboidratos fermentáveis são responsáveis pela capacidade antioxidante da kombucha, assim como tem sido associada à potencialização de efeitos promotores da saúde. Durante a fermentação, esses compostos podem sofrer transformações enzimáticas que modulam sua biodisponibilidade e eficácia na neutralização de radicais livres (Dartora *et al.*, 2023; Kaashyap *et al.*, 2021). Estudos demonstram que a presença de catequinas, epicatequinas e procianidinas na kombucha influencia seu potencial antioxidante, sendo o chá verde uma fonte particularmente rica nestes compostos (Anantachoke *et al.*, 2023). Adicionalmente, a escolha do carboidrato pode afetar a composição fenólica e a atividade antioxidante, uma vez que diferentes açúcares podem interagir com os compostos presentes no meio e impactar a atividade metabólica do *SCOBY* (Vázquez-Cabral *et al.*, 2017; Venegas *et al.*, 2023).

A atividade antioxidante da kombucha tem sido avaliada por diversos métodos, principalmente DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), ABTS (2,2-azinobis-[3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico]), TPC (total phenolic compound), Cuprac (Cupric antioxidant capacity) and TEAC (Trolox equivalent activity capacity) (Lima *et al.*, 2022; Massoud *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2022).

Diante desse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência do tipo de chá e do carboidrato na fermentação da kombucha, com foco no crescimento do *SCOBY*, na qualidade físico-química da bebida e sua atividade antioxidante.

Material e Métodos

1.1. Insumos químicos e biológicos

Todos os reagentes e padrões de UPLC utilizados neste estudo eram de grau analítico e foram obtidos da Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, EUA). As folhas de chás preto e verde (*Camellia sinensis*), o açúcar cristal, o xarope de guaraná e o mel foram adquiridos no mercado

local de Feira de Santana, Bahia, Brasil. As culturas iniciadoras (caldo fermentado e filme de celulose) foram fornecidas por um produtor artesanal local.

1.2. Processo de fermentação e amostragem

As kombuchas foram preparadas por meio da fermentação do chá preto e/ou verde. As infusões e as condições de fermentação foram realizadas conforme as instruções de Barbosa et al. (2020). Os extratos de chá foram preparados por infusão de 5 g de folhas de chá preto em 1 L de água mineral por 10 minutos, seguida de filtração através de uma membrana filtrante. Em seguida, foram adicionados 50 g de carboidrato e a solução foi agitada até a completa dissolução. Foram utilizados as seguintes fontes de carboidratos fermentáveis: Açúcar cristal (carboidrato tradicional – controle); Mel de abelha (carboidrato natural); Xarope de guaraná (carboidrato natural).

Após o resfriamento dos chás para $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, o scoby (filme de celulose) foi inoculado e adicionou-se 10% de cultura iniciadora (caldo fermentado). Esse procedimento foi previamente descrito por Suciati *et al.* (2019). A fermentação ocorreu ao longo de 12 dias, utilizando um método artesanal, em um recipiente de vidro de 3 L com abertura de 9 cm de diâmetro, coberto com papel toalha, permitindo a passagem de ar sem contaminação por insetos ou outras impurezas físicas.

Os ensaios, em triplicata, foram realizados segundo um delineamento inteiramente casualizado com três repetições biológicas. Os tratamentos foram organizados a partir da combinação dos dois tipos de chá: preto (CP) e verde (CV), com os três fontes de carboidratos fermentáveis: açúcar cristal (AC), mel de abelha (MA) e xarope de guaraná (XG). Foram testados seis meios: CP+AC (chá preto com açúcar cristal), CP+MA (chá preto com mel de abelha), CP+XG (chá preto com xarope de guaraná), CV+AC (chá verde com açúcar cristal), CV+MA (chá verde com mel de abelha) e CV+XG (chá verde com xarope de guaraná). Outros ensaios foram realizados com meios combinando ambos os tipos de chá (50-50%) com açúcar

cristal (CP+CV+AC) e com xarope de guaraná e mel de abelha (50-50%) (CP+CV+XG+MA). As bebidas foram monitoradas em três períodos de amostragem (0, 6 e 12 dias de fermentação). A amostragem no dia 0 correspondeu à infusão logo após a adição do inóculo da kombucha. Amostras do filme de celulose e do caldo fermentado foram armazenadas a 4°C.

As concentrações de etanol durante a fermentação foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Waters 2414, EUA), utilizando uma coluna BIORAD AMINEX HPX-87H (300 mm × 7,8 mm) e um detector de índice de refração RID 6A, utilizando H₂ SO₂ 0,005 M como eluente, a uma vazão de 0,6 mL min⁻¹ e temperatura da coluna de 45 °C. Para avaliar o desempenho fermentativo, foram calculados a produtividade volumétrica em etanol (Q_p), o fator de conversão substrato-produto (Y_p / s) e a eficiência fermentativa (η), de acordo com a metodologia proposta por Borzani (1986) e Moser (1988).

1.3. Análise da produção de *Scoby*

As amostras de *Scoby* foram pesadas em balança analítica (Mettler Toledo) e dimensionadas com o auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo 200mm) nos dias 0 e 12 da fermentação. Foram analisados os parâmetros: peso, altura e comprimento.

Para avaliação de desempenho dos substratos, realizou-se o cálculo de rendimento com base na Equação 1:

$$R = 100 * (massa\ inicial\ (g) - massa\ final\ (g)) / massa\ inicial\ (g) \quad (Eq. 1)$$

O rendimento foi dado pela divisão entre a variação de massa do biofilme (peso inicial subtraído pelo peso final) por seu peso inicial, multiplicado por 100 (Batista, 2019).

1.4. Atividade Antioxidante

1.4.1. Reagentes e padrões de HPLC

TPTZ (2,4,6-Tri (2-piridil) -s-triazina), β-caroteno, Tween 40, clorofórmio, Trolox (ácido 6-hidroxi 2,5,7,8-tetrametilcro-man-2-carboxílico), ácido linoleico, 2,2-azino-bis (ácido

3- etilbenzotiazolina-6 sulfônico) (ABTS), 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e cloreto férrico hexa-hidratado foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Álcool etílico, persulfato de potássio, sulfato ferroso, ácido fosfórico, peróxido de hidrogênio e fosfato de potássio monobásico foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). O metanol grau de pureza HPLC foi obtido da JT Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). Água ultrapura foi gerada por purificação em um Sistema Marte Científica (São Paulo, SP, Brasil). Padrões externos de ácido gálico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido clorogênico, ácido siríngico, ácido trans-caftárico, hesperidina, procianidina B1, catequina, epicatequina, naringenina, procianidina B2, cianidina-3,5- diglucosídeo, mal- vidina-3,5-diglucosídeo e pelargonidina-3,5-diglucosídeo foram da Sigma- Aldrich. Procianidina A2, galato de epigallocatequina, galato de epicatequina, quercetina 3- rutinosídeo (rutina), kaempferol 3-glicosídeo, quercetina 3-glicosídeo, miricetina, malvidina-3- glicosídeo, cianidina-3-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo, delphinidina- 3-glicosídeo e pelargonidina-3-glicosídeo foram da Extrasynthese (Genay, França). Os isômeros cis-resveratrol e trans-resveratrol foram obtidos da Cayman Chemical Company (Michigan, EUA).

1.4.2. Métodos de capacidade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante *in vitro* das kombuchas foi avaliada usando os métodos de sequestro de radicais livres por DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) segundo as metodologias descritas por Lima *et al.* (2021). O poder antioxidante redutor férrico (FRAP) foi determinado conforme descrito por Rufino *et al.* (2006). Trolox foi usado para construir as curvas de calibração, exceto no método FRAP, onde sulfato ferroso foi usado. Os resultados foram expressos como equivalentes de Trolox por litro de kombucha (mmol TE L⁻¹) e mmol de Fe²⁺ por litro kombucha (mmol Fe²⁺ L⁻¹). As medidas de absorbância foram realizadas em um espectrofotômetro UV–Vis 2000A (Instrutherm, São Paulo, Brasil). Os procedimentos dos

métodos são descritos abaixo.

No método DPPH, uma solução do radical DPPH (1 mmol L^{-1}) foi preparada em etanol e diluída para uma absorbância de $0,900 \pm 0,050$ ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$). Uma alíquota de $2900 \mu\text{L}$ do radical foi misturada com $100 \mu\text{L}$ da amostra e mantida no escuro por 30 min. A atividade antioxidante das amostras foi avaliada através da taxa de decaimento na absorbância a 517 nm .

O reagente FRAP foi preparado em tampão acetato 300 mmol L^{-1} (pH 3,6), com TPTZ 10 mmol L^{-1} (2,4,6-Tri (2- Uma solução de peróxido de hidrogênio (4 mmol) preparada em tampão fosfato (pH 7,4) foi usada no método H_2O_2 . No procedimento, as amostras ($0,4 \text{ mL}$) foram misturadas com a solução de peróxido de hidrogênio ($0,6 \text{ mL}$), com o volume final ajustado para 3 mL usando o tampão fosfato. As absorbâncias foram determinadas espectrofotometricamente a 230 nm após 10 min. O tampão fosfato foi tomado como amostra em branco. Piridil) -s-triazina) em uma solução de HCl 40 mmol L^{-1} e $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ FeCl}_3$. Amostras de kombucha ($90 \mu\text{L}$) foram misturadas com $270 \mu\text{L}$ de água destilada e $2,7 \text{ mL}$ de reagente FRAP e incubadas a 37° por 30 min em um bloco termodigestor para tubos (Bioplus IT-2002, Barueri, SP, Brasil). Após a incubação, as medidas de absorbância foram feitas a 595 nm . No método βCLA , uma emulsão foi obtida pela mistura de $20 \mu\text{L}$ de ácido linoleico, $530 \mu\text{L}$ de Tween 40, $50 \mu\text{L}$ de β -caroteno (20 mg mL^{-1}) e $1000 \mu\text{L}$ de clorofórmio. A mistura foi rotaevaporada a 40°C para remover o clorofórmio, e o resíduo foi absorvido em água ultrapura saturada com oxigênio até que a absorbância a 450 nm estivesse entre $0,600$ e $0,700$. Em um tubo de ensaio, 5 mL da emulsão foram misturados com $50 \mu\text{L}$ de kombucha. Um controle foi obtido pela mistura 5 mL da emulsão e $50 \mu\text{L}$ de etanol. A mistura foi incubada a 45°C em um bloco termodigestor, e as absorbâncias foram tomadas nos tempos $t=0 \text{ min}$ e $t=120 \text{ min}$. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

1.5. Análise cromatográfica por RP-HPLC/DAD

Os compostos fenólicos individuais das kombuchas foram determinados usando a

metodologia de Dutra *et al.* (2018). As análises foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida Agilent 1260 Infinity LC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). A coluna e a pré- coluna utilizadas foram uma Zorbax Eclipse Plus RP-C18 (100×4,6 mm, 3,5 µm) e uma Zorbax C18 (12,6× 4,6 mm, 5 µm), respectivamente (Agilent Technologies). Antes da injeção da amostra, as kombuchas foram diluídas 1:2 com fase móvel A e filtradas através de uma membrana de 0,45 µm (Millex Millipore, Barueri, SP, Brasil). O solvente A era uma solução de ácido fosfórico 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,0), e o solvente B foi acidificado com metanol com 0,5% de H₃PO₄. O gradiente de eluição foi o seguinte: 0 a 5 min: 5% B; 5 a 14 min: 23% B; 14 a 30 min: 50% B; e 30–33 min: 80% B. O volume de injeção foi de 20 µL, e a detecção foi definida em 220, 280, 320, 360 e 520 nm. A quantificação de polifenóis individuais foi realizada por comparação com padrões externos. O processamento de dados foi feito no software OpenLAB CDS ChemStation Edition (Agilent Technologies). Adicionalmente, a pureza espectral dos picos foi verificada utilizando o limiar da ferramenta para garantir a precisão da identificação de cada composto, segundo Padilha *et al.* (2017).

2.7 Cinética da fermentação alcoólica

Durante as fermentações, a cada 24 h, amostras foram recolhidas para efetuar a monitorização analítica da fermentação.

Foram determinadas, em triplicatas:

- Teor de sólidos solúveis (°Brix), através de leitura em refratômetro portátil digital (Reichert Tecnal AR-200);
- Teor de etanol (%v v⁻¹), extrato aparente (°P), através de leitura em densímetro de bancada (DDM 2911 de Rudolph Analytical Research) segundo Amorim *et al.* (2018).
- Para transformar o teor de etanol (%v v⁻¹) em g L⁻¹, foi utilizada a Equação 2 (EBC, 2005):

$$Etanol \left(\frac{g}{L} \right) = Etanol \left(\% \frac{v}{v} \right) \times 0,789 \times p \quad (\text{Eq. 2})$$

- Para transformar o teor de extrato aparente °Plato em g L⁻¹, foi utilizada a Equação 3 (EBC, 2005):

$$\text{Extrato Aparente} \left(\frac{g}{L} \right) = \text{Ext. ap. (}^{\circ}\text{P)} \times p \times 10 \quad (\text{Eq. 3})$$

Sendo:

0,789 g/cm³, o peso específico de etanol a 20°C e ρ, o peso específico do mosto (g mL⁻¹).

- Fator de conversão substrato em etanol (g g⁻¹), calculado de acordo com a Equação 4 (EBC, 2005):

$$Y \left(\frac{p}{s} \right) = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (\text{Eq. 4})$$

- Produtividade volumétrica em etanol (g L⁻¹h⁻¹), calculado de acordo com a Equação 5 (EBC, 2005):

$$QP = \frac{P - P_0}{t - t_0} \quad (\text{Eq. 5})$$

Sendo:

S₀ e S, concentração aparente inicial e final, respectivamente (g L⁻¹);

P₀ e P: concentração de etanol inicial e final, respectivamente (g L⁻¹);

t₀ e t: tempo inicial e final de fermentação, respectivamente (h).

- Eficiência da fermentação (%), calculada de acordo com a Equação 6 (EBC, 2005):

$$\varepsilon f = \frac{Y \left(\frac{p}{s} \right)}{0,511} \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

1.6. Análise estatística

Os dados (compostos fenólicos) foram submetidos a análise descritiva e os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. As análises foram realizadas utilizando o software R versão 4.2.3 (R Core Team, 2018). Os dados (atividade antioxidante e produção do Scoby) foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas pelo Teste de

Tukey ($P < 0,05$).

2. Resultados e Discussão

2.1. Perfis de Crescimento do *Scoby* em Kombuchas

A Tabela 1 apresenta os valores médios de peso (P), altura (A) e diâmetro (D) das culturas simbióticas de bactérias e leveduras (*Scoby*), tanto da matriz (*Scoby* mãe) quanto da nova biomassa formada (*Scoby* filha) durante o processo de fermentação nos diferentes meios avaliados. Os resultados indicam variações significativas no crescimento do *Scoby* filha em função do tipo de chá e do carboidrato utilizado. O maior acúmulo de biomassa foi observado no meio CP+MA (chá preto com mel de abelha), com um peso médio de $263,91 \pm 0,52$ g, seguido pelo meio CP+CV+XG+MA (mistura de chá preto e chá verde (50-50%) com xarope de guaraná e mel de abelha (50-50%)), que apresentou um *Scoby* filha com peso de $221,63 \pm 0,49$ g. O menor crescimento foi registrado nos meios CP+AC (chá preto com açúcar cristal) e CP+CV+AC (mistura de chá preto e chá verde com açúcar cristal), com pesos de $35,04 \pm 0,05$ g e $41,18 \pm 0,32$ g, respectivamente. Esses resultados sugerem que mel de abelha e xarope de guaraná favorecem a formação de biomassa, devido à presença de compostos bioativos e açúcares fermentáveis adicionais, que podem atuar como substratos secundários para o metabolismo das bactérias e leveduras (Miranda *et al.*, 2022). Por outro lado, Degirmencioglu *et al.* (2020) em estudos sobre a produção de kombucha com mel de abelha (20 °Brix) reportaram que o mel possui bom potencial como ingrediente natural mas nessa concentração pode apresentar um efeito antimicrobiano sobre a microbiota do *Scoby*.

Tabela 1. Valores de peso (P), altura (A) e diâmetro (D) dos Scobys Mãe e filha nas kombuchas produzidas em diferentes meios de fermentação

Ensaio	Scoby Mãe			Scoby filha			Scobys (n)
	P (g)	A (cm)	D (cm)	P (g)	A (cm)	D (cm)	
CP+AC	$65,45 \pm 1,39a$	0,90	8,10 ^a	$35,04 \pm 0,05h$	$0,12 \pm 0,01h$	47 ^a	1
CP+MA	$58,88 \pm 0,19c$	$0,82 \pm 0,01b$	8,10 ^a	$263,91 \pm 0,52a$	$1,21 \pm 0,01c$	47 ^a	7
CP+XG	$59,24 \pm 1,34c$	0,85	8,10 ^a	$58,46 \pm 0,48f$	$0,85 \pm 0,01d$	47 ^a	3
CV+AC	60,62	0,85	8,10 ^a	$74,85 \pm 0,74e$	$0,60 \pm 0,02f$	47 ^a	2
CV+MA	60,68	0,90	8,10 ^a	$176,38 \pm 0,55d$	$0,74 \pm 0,01e$	47 ^a	5

CV+XG	63,49	0,93 ±0,01 ^a	8,10 ^a	181,68 ±0,53c	1,24 ±0,01b	47 ^a	6
CP+CV+AC	58,36 ±1,53c	0,80 ±0,01b	8,10 ^a	41,18 ±0,32g	0,21 ±0,01g	47 ^a	1
CP+CV+XG+MA	64,99 ±0,67a	0,95 ±0,03 ^a	8,10 ^a	221,63 ±0,49b	1,46 ±0,01a	47 ^a	5

Nota: chá preto (CP); chá verde (CV); açúcar cristal (AC); mel de abelha (MA); xarope de guaraná (XG). Letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A altura e o diâmetro dos Scobys filha também apresentaram diferenças em função da composição do meio utilizado. O maior crescimento vertical (altura média de 1,46 ± 0,01 cm) foi observado no meio CP+CV+XG+MA, seguido pelo meio CV+XG (1,24 ± 0,01 cm). O menor crescimento ocorreu no meio CP+AC (0,12 ± 0,01 cm), o que reforça a menor proliferação celular no meio contendo açúcar. O diâmetro do Scoby mãe foi mantido constante em todos os tratamentos, com valor médio de 8,10 cm, indicando que o crescimento ocorreu preferencialmente na espessura da biomassa.

Os resultados evidenciam que o tipo de carboidrato influencia diretamente a produção de biomassa do *Scoby* filha, sendo o mel de abelha e o xarope de guaraná os mais favoráveis à formação de nova biomassa. Esses achados estão alinhados com estudos anteriores que sugerem que a composição dos substratos afeta a atividade microbiana durante a fermentação da kombucha, modulando a conversão de açúcares e a produção de metabólitos secundários (Miranda *et al.*, 2022).

2.2. Qualidade físico-química e eficiência fermentativa

A Figura 1 apresenta a variação dos parâmetros físico-químicos e de desempenho fermentativo da kombucha ao longo de 288 horas de fermentação, nos meios contendo diferentes combinações de chá e fontes de carboidratos fermentáveis. A concentração de sólidos solúveis diminuiu lentamente ao longo do tempo, indicando a metabolização dos açúcares durante a fermentação (Figura 1A). As kombuchas preparadas com açúcar cristal mantiveram valores mais elevados, enquanto as produzidas com xarope de guaraná e mel de abelha apresentaram menores concentrações iniciais e finais.

O pH diminuiu progressivamente em todos os meios, fato que poderia ser resultado da produção de ácidos orgânicos pelos microrganismos do Scoby durante a fermentação (Figura 1B). A maior redução foi observada nos tratamentos com mel de abelha e xarope de guaraná (de 4,6 no dia 0 a 2, no dia 12), sugerindo uma maior atividade microbiana e consequente

acidificação do meio. Por sua vez, a produção de etanol aumentou ao longo da fermentação (Figura 1C). Ao final da fermentação, as kombuchas adoçadas com mel de abelha apresentaram menores concentrações de etanol, o que pode estar relacionado à composição química diferenciada desse carboidrato.

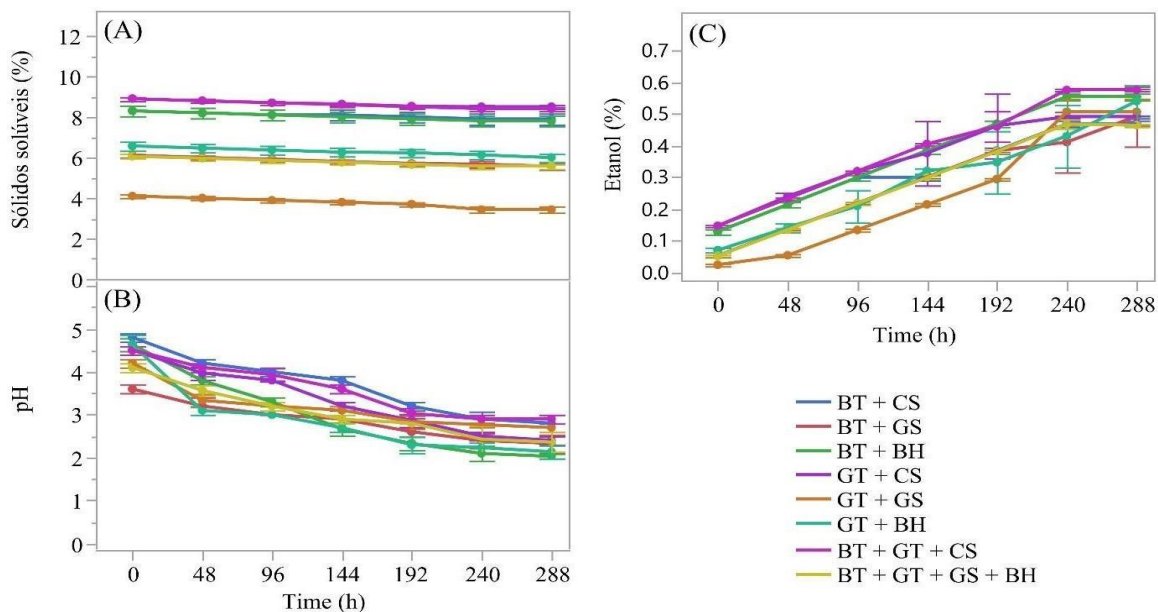


Figura 1. Perfis de sólidos solúveis, pH e etanol da kombucha em diferentes tratamentos ao longo do tempo

O rendimento apresentou uma redução nos primeiros dias de fermentação nas bebidas adoçadas com mel de abelha e xarope de guaraná, ou seja, houve um comportamento inicial decrescente em relação ao tempo de fermentação, indicando que, nas fases iniciais, a conversão do substrato em etanol foi menos eficiente. Esse padrão foi seguido por uma estabilização dos valores, sugerindo o esgotamento gradual dos açúcares disponíveis para a produção de etanol. A fermentação da kombucha preparada com a combinação de chás verde e preto e os fontes de carboidratos fermentáveis naturais (xarope de guaraná e mel de abelha) apresentou os melhores resultados cinéticos. Foram observados valores de fator de rendimento do substrato em etanol entre 0,393 e 0,510 g/g, com eficiência de até 99,81% em 288 h de fermentação. O maior valor de produtividade volumétrica em etanol ($0,039 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) foi registrado na fermentação com chá verde e açúcar cristal.

Os resultados demonstram que os tipos de chá e carboidrato fermentável influenciam diretamente a cinética da fermentação da kombucha. A redução dos sólidos solúveis (com redução média de 1,1°Brix do dia 0 ao dia 12 do processo fermentativo) e do pH indica a conversão dos açúcares em ácidos orgânicos, etanol e outros metabólitos ao longo do processo (Oliveira *et al.*, 2022). O comportamento da produção de etanol e da produtividade mostra que

o açúcar cristal e o xarope de guaraná proporcionam condições mais favoráveis à fermentação alcoólica, enquanto o mel de abelha pode conter compostos que modulam essa conversão. Esses achados reforçam a importância da escolha dos ingredientes na formulação da kombucha, permitindo ajustes que podem otimizar a qualidade final da bebida, tanto em termos de perfil sensorial quanto de composição química.

3.2. Perfis de Compostos Fenólicos Durante a Fermentação da Kombucha

A Figura 2 apresenta a quantificação do teor total de compostos fenólicos (TCF) em diferentes comprimentos de onda (220,4, 280,4, 320,4 e 360,4 nm). O maior valor de TCF (16,66 mg L⁻¹) foi observado em 220,4 nm, seguido por 14,38 mg L⁻¹ em 280,4 nm e 10,97 mg L⁻¹ em 360,4 nm. O menor valor (2,04 mg L⁻¹) de TCF foi registrado em 320,4 nm. A alta intensidade de absorbância em 220,4 nm está associada à presença de estruturas aromáticas simples e ligações conjugadas comuns em ácidos fenólicos e outros compostos com anéis benzênicos, embora esse comprimento de onda não seja específico para nenhum grupo funcional.

A menor intensidade de absorbância em 320,4 nm pode indicar baixa presença de compostos com sistemas conjugados mais extensos ou flavonoides glicosilados, que usualmente absorvem nessa faixa ou próxima a ela, dependendo da posição e tipo de substituintes. No entanto, é importante destacar que a identificação precisa de compostos fenólicos requer o uso combinado de técnicas, como HPLC- DAD, devido à sobreposição espectral e à ausência de especificidade dos sinais UV-Vis (Padilha *et al.*, 2017; Lima *et al.*, 2022).

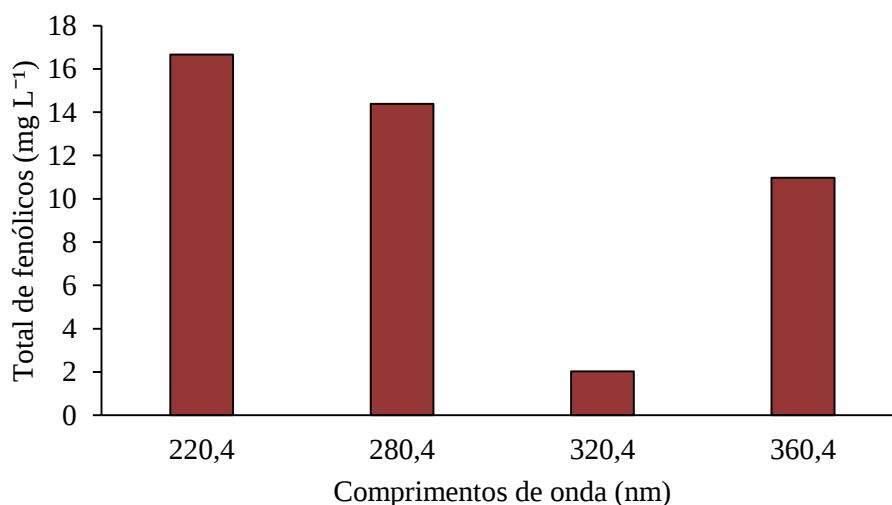


Figura 2. Concentração total de compostos fenólicos (mg L⁻¹) da kombucha em função do comprimento de onda

de detecção.

A variação na absorção dos compostos fenólicos ao longo dos comprimentos de onda avaliados reflete a diversidade química desses metabólitos secundários na kombucha, sendo influenciada pelo tipo de chá e carboidrato utilizados, bem como pelo processo fermentativo (Barbosa *et al.*, 2021). A presença mais expressiva de compostos fenólicos em 220,4 nm sugere que a fermentação favoreceu a liberação ou preservação desses compostos, contribuindo para a bioatividade da bebida. A Tabela 2 apresenta a evolução das concentrações de compostos fenólicos, a 220,4 nm, ao longo da fermentação da kombucha nos diferentes ensaios.

Tabela 2. Concentração de compostos fenólicos (mg L⁻¹) nas kombuchas preparadas com diferentes tipos de chá e fontes de carboidratos fermentáveis durante o tempo de fermentação

Compostos	Starter	CP+AC	CP+MA	CP+XG	CV+AC	CV+MA	CV+XG	CP+CV+AC	CP+CV+XG+MA
Tempo (0 dias)									
Catechin	4,46	1,08	0,92	24,29	4,95	2,37	2,89	3,36	2,21
Epicatechin	21,59	5,42	5,74	5,62	19,60	15,72	19,29	11,68	12,56
Epicatechin gallate	12,41	11,27	30,14	7,51	137,14	90,74	133,78	81,67	81,22
Epigallocatechin gallate	14,74	7,65	6,65	4,00	46,14	35,46	47,53	21,84	27,98
Procyanidin A2	4,08	1,80	2,56	35,18	0,63	7,94	42,89	1,73	23,19
Procyanidin B1	0,05	0,09	0,08	0,08	0,68	0,64	0,79	0,18	0,43
Procyanidin B2	1,34				3,44	0,45	0,55	1,91	1,61
Tempo (6 dias)									
Catechin		6,93	1,56	1,95	1,94	6,10	6,39	3,92	4,57
Epicatechin		27,86	7,77	7,49	7,89	20,88	22,01	15,56	16,41
Epicatechin gallate		20,25	36,33	20,94	24,25	98,57	105,69	66,07	63,05
Epigallocatechin gallate		34,79	8,26	5,08	6,29	38,26	40,91	22,27	22,51
Procyanidin A2		2,26	1,67	39,07	4,06	1,00	46,19	8,34	25,28
Procyanidin B1		1,07	0,21	0,16	0,25	1,45	1,11	0,41	0,73
Procyanidin B2		2,17	1,54	1,10	1,11	1,87	2,47	0,83	1,44
Tempo (12 dias)									
Catechin		2,18	2,41	1,58	7,93	5,47	6,40	4,47	4,79
Epicatechin		10,23	9,33	8,58	34,34	21,22	23,68	19,48	17,4
Epicatechin gallate		15,22	29,18	16,66	61,08	63,4	93,24	45,52	51,25
Epigallocatechin gallate		4,31	6,83	3,97	28,62	26,02	35,68	16,07	18,63
Procyanidin A2		3,88	1,15	41,96	3,33	1,26	46,76	7,25	26,37
Procyanidin B1		0,38	0,42	0,31	2,30	1,50	1,79	0,79	1,25
Procyanidin B2		1,27	2,04	1,01	3,04	2,34	3,42	1,41	2,31

Onde: chá preto (CP); chá verde (CV); açúcar cristal (AC); mel de abelha (MA); xarope de guaraná (XG).

No tempo inicial (0 dias), as kombuchas contendo chá verde adicionadas de açúcar e xarope de guaraná apresentaram maiores concentrações de epicatequina (19,60 mg/L e 19,29 mg/L), epicatequina galato (137,14 mg/L e 133,78 mg/L) e epigallocatequina galato (46,14 mg/L e 47,53 mg/L) (Tabela 2). Maiores concentrações de procyanidin A2 (42,89 mg/L) e B1 (0,79 mg/L) foram constatadas em kombuchas de chá verde e xarope de guaraná. As kombuchas de chá verde e açúcar cristal apresentaram maiores concentrações de catequina (24,29 mg/L) e procyanidin B2 (3,44 mg/L).

Os resultados indicam que as kombuchas com chá verde, especialmente aquelas adoçadas com açúcar ou xarope de guaraná, apresentaram maiores concentrações de compostos fenólicos como epicatequina, epicatequina galato e epigallocatequina galato, além de procianidinas A2, B1 e B2. Esses compostos são reconhecidos pelo alto potencial antioxidante e estão diretamente relacionados à qualidade funcional da bebida. A presença elevada desses fenólicos no início da fermentação reforça o papel do chá verde e dos fontes de carboidratos fermentáveis naturais na preservação e estabilidade desses compostos, contribuindo para o valor nutricional e sensorial da kombucha.

Após 6 dias de fermentação, foi constatada a diminuição de 91% e 60,8% na concentração de catequina nos meios CP+XG e CV+AC, respectivamente (Tabela 2). O aumento entre 1,17 e 6,4 vezes da concentração foi verificado nos outros meios. Com relação à epicatequina, uma diminuição de 59,74% foi verificada nas kombucha com CV+AC com um aumento de 1,14 até 5,14 vezes na concentração nos outros meios. Houve uma diminuição de 112,9 mg/L e 28,1 mg/L nas concentrações de epicatequina galato nos meios CV+AC e CV+XG, respectivamente. No meio CV+MA os níveis de epigallocatequina galato foram similares aos do tempo 0 (40,91 mg L⁻¹). Maiores valores de concentração de procianidina A2 foram constatados nos meios CP+XG (39,07 mg L⁻¹) e CV+MA (46,19 mg L⁻¹), sugerindo que a fermentação favoreceu a conversão e liberação desses compostos na matriz líquida. Houve um aumento nas concentrações de procianidina B1 e B2 exceto no meio CV+AC onde seus valores diminuíram 63,2% e 67,7% respectivamente (Tabela 2).

Os resultados demonstram que a fermentação favoreceu a liberação e/ou conversão de compostos fenólicos na matriz líquida, especialmente das procianidinas. Os maiores valores de procianidina A2 foram observados nos meios com chá preto e xarope de guaraná (CP+XG) e chá verde com mel (CV+MA), indicando que esses substratos potencializam a disponibilidade desse composto. Além disso, houve aumento nas concentrações de procianidina B1 e B2 na maioria dos tratamentos, com exceção do meio CV+AC (chá verde com açúcar cristal), onde foi observada uma redução expressiva de 63,2% e 67,7%, respectivamente. Esses resultados

sugerem que tanto o tipo de chá quanto o carboidrato influenciam diretamente na estabilidade e conversão dos compostos fenólicos durante a fermentação, impactando a qualidade funcional da kombucha.

No 12º dia de fermentação, observou-se uma tendência de redução de 68,5%, 19,0% e 10,3% na concentração de catequina nos meios CP+AC, CP+XG e CV+MA, respectivamente, indicando possível degradação ou conversão em outros metabólitos (Tabela 2). Por outro lado, houve um aumento de 1,5, 4,1, 1,14 e 1,04 vezes na concentração de catequina nos meios CP+MA, CV+AC, CP+CV+AC e CP+CV+XG+MA, respectivamente. A concentração de epicatequina continuou diminuindo (63,3%) no meio CP+AC nos últimos 6 dias enquanto aumentou nos outros meios. Epicatequina galato diminuiu nos últimos 6 dias independentemente do meio, mantendo-se elevada nos tratamentos CV+MA (93,24 mg L⁻¹) e CV+XG (63,4 mg L⁻¹) já no meio CV+AC aumentou 2,52 vezes a sua concentração. Epigallocatequina galate diminuiu na maioria dos meios, com aumento de 4,5 vezes na concentração somente no meio CV+AC. A concentração de procianidina A2 permaneceu com valores similares nos meios contendo xarope de guaraná independentemente do uso de CP (41,96 mg L⁻¹) ou CV (46,76 mg L⁻¹) nos últimos 6 dias de fermentação sendo estas as maiores concentrações. As concentrações de procianidina B1 e B2 diminuíram 64,5% e 41,5%, respectivamente em CP+AC com aumentos verificados nas outras condições. A presença do chá verde no meio pode resultar na maior preservação dos compostos antioxidantes ao longo do tempo de fermentação.

Kombuchas com menores concentrações de epigallocatequina galato e epicatequina galato em comparação ao meio inicial foram constatadas em meios contendo chá verde e misturas de chá verde e preto independentemente do carboidrato. Esse fato poderia estar relacionada à possível conversão de epigallocatequina galato em epicatequina galato e de esta última em epicatequina como relatado por Chakravorty *et al.* (2019). Assim, as concentrações de epicatequina nas kombuchas foram maiores que nos meios iniciais.

Os resultados indicam que o tipo de chá e o carboidrato afetam diretamente a dinâmica dos compostos fenólicos durante a fermentação da kombucha como verificado previamente por Miranda *et al.* (2022). Os meios de fermentação contendo chá verde com açúcar ou xarope de guaraná forneceram kombuchas com maiores concentrações de catequina e procianidina B2; maiores concentrações de epicatequina e procianidina B1 foram verificadas em meios contendo chá verde e açúcar; o uso de chá verde independentemente do tipo de carboidrato forneceu kombuchas com maiores concentrações de epicatequina galato de epigallocatequina galato e, maiores concentrações de procianidina A2 foram produzidas com meios adoçados com xarope

de guaraná independentemente do tipo de chá.

A redução de alguns compostos após o 12º dia pode estar associada à degradação ou polimerização, processos comuns durante as fermentações prolongadas. Além disso, o aumento inicial de alguns compostos, como epicatequina e procianidina A2, pode indicar a conversão de precursores ou a liberação gradual a partir da matriz do chá. Em conjunto, os resultados reforçam a importância da seleção de ingredientes na formulação da kombucha, pois influenciam diretamente a composição fenólica e, conseqüentemente, suas propriedades antioxidantes e benefícios à saúde.

3.4. Avaliação da Atividade Antioxidante da Kombucha

A atividade antioxidante das kombuchas foi determinada por meio dos métodos DPPH (sequestro de radicais livres) e FRAP (capacidade redutora férrica), cujos resultados são apresentados na Tabela 3. Os valores obtidos para o método DPPH variaram significativamente entre os tratamentos, com os maiores valores observados nos meios CP+CV+AC ($6,47 \pm 0,07$ mM Trolox/Kg) e CP+CV+XG+MA ($5,97 \pm 0,11$ mM Trolox/Kg), enquanto o menor valor foi registrado para CP+MA ($3,39 \pm 0,00$ mM Trolox/Kg). No método FRAP, os valores apresentaram menor variação, com valores entre $41,37 \pm 0,46$ (CP+MA) e $44,97 \pm 0,13$ (CP+CV+XG+MA).

Tabela 3. Valores de atividade antioxidante obtidas pelos métodos DPPH (mM Trolox/Kg) e FRAP (AOX mmol/Kg) das kombuchas produzidas pela fermentação em diferentes meios

Ensaio	DPPH (mM Trolox/Kg)	FRAP (AOX mmol/Kg)
CP+AC	$4,66 \pm 0,08$ d	$44,79 \pm 0,11$ a
CP+MA	$3,39 \pm 0,00$ e	$41,37 \pm 0,46$ b
CP+XG	$5,29 \pm 0,10$ c	$44,86 \pm 0,09$ a
CV+AC	$5,83 \pm 0,02$ b	$44,91 \pm 0,18$ a
CV+MA	$3,45 \pm 0,36$ e	$44,82 \pm 0,05$ a
CV+XG	$3,79 \pm 0,21$ e	$44,88 \pm 0,01$ a
CP+CV+AC	$6,47 \pm 0,07$ a	$44,78 \pm 0,10$ a
CP+CV+XG+MA	$5,97 \pm 0,11$ b	$44,97 \pm 0,13$ a

Letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade

A presença de chá verde ou em combinação com chá preto influenciou positivamente no aumento da atividade antioxidante detectada pelo método de DPPH. Maiores valores de atividade oxidante foram obtidas em kombuchas produzidas com chá verde por Gaglia *et al.*

(2018). Por outro lado, a adição de mel de abelha resultou em uma menor atividade antioxidante pelo método DPPH, especialmente quando utilizado no chá preto (CP+MA e CV+MA). De acordo com Degirmencioglu *et al.* (2020), compostos tais como ácidos fenólicos, flavonoides, proteínas, enzimas, ácidos orgânicos e minerais presentes no mel são responsáveis pela atividade antioxidante mais a concentração depende de condições climáticas, origem botânica e processamento do mel. Azfaralariff *et al.* (2022), reportaram que o uso de açúcar ou mel de abelha não teve diferença significativa sobre os valores de atividade antioxidante utilizando o método DPPH. O método FRAP forneceu menor variação entre os valores de atividade antioxidante entre os kombuchas produzidos nos diferentes meios, sugerindo que o potencial redutor férrico permaneceu relativamente constante independentemente do chá ou carboidrato utilizado.

Os resultados indicam que a atividade antioxidante da kombucha está fortemente associada à composição fenólica da bebida, conforme observado na Tabela 2 e reportado na literatura (Antolak *et al.*, 2021). O maior poder antioxidante pelo método DPPH nos tratamentos contendo chá verde pode ser explicado pela elevada concentração de epicatequina galato e epigallocatequina galato nesses tratamentos, especialmente em CV+AC e CV+XG, que apresentaram valores superiores a 35 mg L⁻¹ para esses compostos ao longo da fermentação. As catequinas são amplamente reconhecidas pela alta capacidade de neutralizar radicais livres, contribuindo para a estabilidade antioxidante da kombucha (Anantachoke *et al.*, 2023).

Os menores valores de atividade antioxidante pelo método de DPPH no tratamento CP+MA pode estar relacionado à menor disponibilidade de compostos fenólicos antioxidantes nesse tratamento, uma vez que os teores de epigallocatequina galato e epicatequina galato foram inferiores a 10 mg L⁻¹ em CP+MA após 9 dias de fermentação. Além disso, a presença de mel pode ter influenciado negativamente a estabilidade desses compostos, possivelmente devido à sua composição química complexa, que pode interagir com os compostos fenólicos do chá, reduzindo sua atividade antioxidante.

Os valores relativamente estáveis no método FRAP sugerem que, independentemente das variações nos compostos fenólicos, a kombucha manteve um alto poder redutor férrico, o que pode estar associado à presença de outros antioxidantes secundários formados durante a fermentação. O fato de os tratamentos com chá preto e chá verde combinados (CP+CV+AC e CP+CV+XG+MA) apresentarem os maiores valores de DPPH e FRAP sugere um efeito sinérgico entre os compostos fenólicos dos dois tipos de chá, resultando em uma bebida com maior potencial antioxidante. Assim, a escolha do chá verde em combinação com chá preto, juntamente com fontes de carboidratos fermentáveis como xarope de guaraná ou açúcar cristal,

pode ser uma estratégia eficaz para obter bebidas com maior capacidade antioxidante e estabilidade fenólica ao longo do tempo.

5. Conclusão

Os resultados demonstram que o crescimento do *Scoby* filha foi maior nos meios com mel de abelha e xarope de guaraná, sugerindo que essas fontes de carboidratos fermentáveis podem fornecer substratos adicionais para a proliferação microbiana e a formação da matriz celulósica.

O chá verde promoveu maior preservação dos compostos bioativos avaliados, como epicatequina galato e epigallocatequina galato, enquanto o chá preto, especialmente em combinação com xarope de guaraná, favoreceu a formação de procianidina A2. Além disso, a fermentação modulou a conversão e degradação dos compostos fenólicos ao longo do tempo, evidenciando que a interação entre os substratos e a microbiota presente no *Scoby* desempenha um papel essencial na qualidade final da bebida. A atividade antioxidante foi maior nos tratamentos contendo chá verde, reforçando seu potencial na formulação de bebidas funcionais com alto poder antioxidante.

Dessa forma, este estudo reforça a importância da formulação adequada da kombucha para otimizar sua composição bioativa e funcionalidade. Os achados fornecem insights valiosos para a indústria de bebidas fermentadas, permitindo o desenvolvimento de produtos com maior estabilidade antioxidante e benefícios à saúde. Pesquisas futuras podem explorar a interação entre diferentes tempos de fermentação e a microbiota do *Scoby*, bem como os impactos sensoriais das formulações para ampliar a aplicabilidade comercial da kombucha.

Declaração de contribuição de autoria do Crédito

Hevelynn Martins: Conceitualização, Curadoria de dados, Análise formal, Investigação, Metodologia e Redação - rascunho original. **Renato Lima:** Software, Visualização, Redação. **Marcos Lima:** Análise formal. **Ana Araújo:** Análise formal. **Leila Santos:** Investigação e Supervisão. **Giovanni de Carvalho:** Investigação e Supervisão. **Ernesto Martinez:** Aquisição de financiamento, Administração do projeto, Recursos, Supervisão e Redação - revisão e edição.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Agradecimentos

Este trabalho contou com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), Código Financeiro – 001. Agradecemos ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e ao Programa Interno Financeiro a dos Programas de Pós-Graduação Stricto Sensu (AUXPPG) - Termo de Bolsa nº 008/2024.

Referências

- Anantachoke, N., Duangrat, R., Sutthiphakul, T., Ochaikul, D., & Mangmool, S. (2023). Kombucha beverages produced from fruits, vegetables, and plants: a review on their pharmacological activities and health benefits. **Foods**, 12(9):1818. <https://doi.org/10.3390/foods12091818>
- Antolak, H., Piechota, D., & Kucharska, A. (2021). Kombucha tea—A double power of bioactive compounds from tea and symbiotic culture of bacteria and yeasts (SCOBY). **Antioxidants**, 10(10):1541. <https://doi.org/10.3390/antiox10101541>
- Azfaralariff, A.; Vohra, B.; Fazry, S.; Law, D.; Sairi, F.; Othman, B. A. (2022). Effects of Starter Culture and Sweetener on Biochemical Compounds and Microbial Diversity of Kombucha Tea. **Sains Malaysiana**, 51(11): 3715-3729. <http://doi.org/10.17576/jsm-2022-5111-16>
- Barbosa, C. D., Baqueta, M. R., Santos, W. C. R., Gomes, D., Alvarenga, V. O., Teixeira, P., ... & Lacerda, I. C. (2020). Data fusion of UPLC data, NIR spectra and physicochemical parameters with chemometrics as an alternative to evaluating kombucha fermentation. **LWT**, 133:109875. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109875>
- Barbosa, C. D., Uetanabaro, A. P. T., Santos, W. C. R., Caetano, R. G., Albano, H., Kato, R., ... & Lacerda, I. C. A. (2021). Microbial–physicochemical integrated analysis of kombucha fermentation. **LWT**, 148, 111788. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111788>
- Batista, M. E. (2019) **Influência dos tipos de substratos na cinética mássica de produção da película celulósica do Kombucha**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
- Borzani, W. (1986). Cinética de processos fermentativos. **Revista Brasileira de Engenharia**.
- Chakravorty, S.; Bhattacharya, S.; Bhattacharya, D.; Sarkar, S.; Gachhui, R. (2019) Kombucha: A promising functional beverage prepared from tea. In: **Nonalcoholic Beverages**; Grumezescu, A.M., Holban, A.M., Eds.; Woodhead Publishing: Sawston, UK; pp. 285–327. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815270-6.00010-4>
- Dartora, B., Hickert, L. R., Fabricio, M. F., Ayub, M. A. Z., Furlan, J. M., Wagner, R., Perez,

K. J., & Sant'Anna, V. (2023). Understanding the effect of fermentation time on physicochemical characteristics, sensory attributes, and volatile compounds in green tea kombucha. **Food Research International**, 174:113569.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113569>

Degirmencioglu, N.; Yildiz, E.; Guldaz, M.; Gurbuz, O. (2020) Health benefits of kombucha tea enriched with olive leaf and honey. **Journal of Obesity and Chronic Disease**, 4:1–5. <https://doi.org/10.17756/jocd.2020-031>

dos Santos, L. M.; Ferreira, E. T. J.; de Souza, M. E. A. O.; Pereira, G. E.; Fedrigo, I. M. T. (2022) Artificial neural network: a powerful tool in associating phenolic compounds with antioxidant activity of grape juices. **Food Analytical Methods**, 15:527-540.

<https://doi.org/10.1007/s12161-021-02144-8>

Dutra, M. C. P.; Rodrigues, L. L.; Viana, A. C.; De Oliveira, D.; Pereira, G. E.; Dos Santos, L. M. (2018) Integrated analyses of phenolic compounds and minerals of Brazilian organic and conventional grape juices and wines: Validation of a method for determination of Cu, Fe and Mn. **Food Chemistry**, 269:157–165. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.014>

Gaggia, F.; Baffoni, L.; Galiano, M.; Nielsen, D.S.; Jakobsen, R.R.; Castro-Mejia, J.L.; Bosi, S.; Truzzi, F.; Musumeci, F.; Dinelli, G.; et al. (2018) Kombucha beverage from green, black and rooibos teas: A comparative study looking at microbiology, chemistry and antioxidant activity. **Nutrients**, 11, 1. <https://doi.org/10.3390/nu11010001>

Jardim, L. P.; Maynard, D. da C. (2022) **Os efeitos dos probióticos contidos na bebida fermentada kombucha na saúde e na microbiota intestinal**. <https://repositorio.uniceub.br/jspui/handle/prefix/16248>

Kaashyap, M., Cohen, M., & Mantri, N. (2021). Microbial diversity and characteristics of kombucha as revealed by metagenomic and physicochemical analysis. **Nutrients**, 13(12), 4446. <https://doi.org/10.3390/nu13124446>

Landis, E. A., Fogarty, E., Edwards, J. C., Popa, O., Eren, A. M., & Wolfe, B. E. (2022). Microbial diversity and interaction specificity in kombucha tea fermentations. **Msystems**, 7(3), e00157-22. <https://doi.org/10.1128/msystems.00157-22>

Lima, M. S., Ferreira, E. T. J., de Souza, M. E. A. O., Pereira, G. E., & Fedrigo, I. M. T. (2022).

Artificial neural network: a powerful tool in associating phenolic compounds with antioxidant activity of grape juices. **Food Analytical Methods**, 15:527–540. <https://doi.org/10.1007/s12161-021-02144-8>

Martins, H. F., Santos, L. T. S. O. de, Carvalho, G. B. M., & Martinez, E. A. (2023). Kombucha: a literature review. **Cuadernos de Educación y Desarrollo**, 15(10), 11175–11197. <https://doi.org/10.55905/cuadv15n10-065>

Massoud, R., Jafari-Dastjerdeh, R., Naghavi, N., & Khosravi-Darani, K. (2022). All aspects of antioxidant properties of kombucha drink. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, 12:4018-4027. <https://doi.org/10.33263/BRIAC123.40184027>

Mendonça, G. R., Pereira, A. L. F., Ferreira, A. G. N., Santos Neto, M., Dutra, R. P., & Abreu, V. K. G. (2020). Propriedades e Efeitos Antimicrobianos da Kombucha: Revisão da Evidência Científica. **Revista Contexto & Saúde**, 20(40):244–251. <https://doi.org/10.21527/2176-7114.2020.40.244-251>.

Miller, H. E. (1971) A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists Society** 48:91. <https://doi.org/10.1007/BF02635693>

Miranda, J. F., Ruiz, L. F., Silva, C. B., Uekane, T. M., Silva, K. A., Gonzalez, A. G. M., Fernandes, F. F., & Lima, A. R. (2022). Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. **Journal of Food Science**, 87(2):503-527. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16029>

Massoud, R., Jafari-Dastjerdeh, R., Naghavi, N., & Khosravi-Darani, K. (2022). All aspects of antioxidant properties of kombucha drink. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, 12(3): 40184027. <https://doi.org/10.33263/BRIAC123.40184027>

Moser, A. (1988). **Bioprocess Technology**. Kinetics and Reactors. Springer – Verlag, New York.

Nyhan, L.M.; Lynch, K.M.; Sahin, A.W.; Arendt, E.K. (2022) Advances in Kombucha Tea Fermentation: A Review. **Applied Microbiology**, 2(1):73–103. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol2010005>

Oliveira, Í. A. C. L. D., Rolim, V. A. D. O., Gaspar, R. P. L., Rossini, D. Q., de Souza, R., &

Bogsan, C. S. B. (2022). The technological perspectives of kombucha and its implications for production. **Fermentation**, 8(4):185. <https://doi.org/10.3390/fermentation8040185>

Padilha, C. V. S.; Miskinis, G. A.; Souza, M. E. O. S.; Pereira, G. E.; Oliveira, D.; Bordignon-Luiz, M. T.; Lima, dos S. M. (2017) Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. **Food Chemistry**, 228:106–115. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.137>

Ruch, R. J.; Cheng, S. J.; Klaunig, J. E. (1989) Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from chinese green tea. **Carcinogenesis**, 10(6):1003–1008. <https://doi.org/10.1093/carcin/10.6.1003>

Rufino, M. D. S. M.; Alves, R. E.; de Brito, E. S.; de Moraes, S.M.; Sampaio, C. D. G.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Colixto, F. D. (2006) Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **Comunicado Técnico Embrapa**, 125:1–4. <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/664098>

Vázquez-Cabral, B. D., Larrosa-Pérez, M., Gallegos-Infante, J. A., Moreno-Jiménez, M. R., González-Laredo, R. F., Rutiaga-Quñones, J. G., & Rocha-Guzmán, N. E. (2017) Oak kombucha protects against oxidative stress and inflammatory processes. **Chemico-Biological Interactions**, 272(25): 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.05.001>

Venegas, C. A., Saona, L. A., Urbina, K., Quintrel, P., Peña, T. A., Mardones, W., & Cubillos, F. A. (2023). Addition of *Saccharomyces eubayanus* to SCOBY fermentations modulates the chemical and volatile compound profiles in kombucha. **Food Microbiology**, 116:104357. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104357>

Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J. P., & Taillandier, P. (2018). Understanding kombucha tea fermentation: a review. **Journal of Food Science**, 83(3):580-588. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>

Vohra, B.M.; Fazry, S.; Sairi, F.; Babul-Airianah, O. (2019) Effects of medium variation and fermentation time on the antioxidant and antimicrobial properties of kombucha. **Malaysian Journal of Fundamental and Applied Science**, 15:298–302. <https://doi.org/10.11113/mjfas.v15n2-1.1536>

Zhou, D.D.; Saimaiti, A.; Luo, M.; Huang, S.Y.; Xiong, R.G.; Shang, A.; Gan, R.Y. (2022) Fermentation with tea residues enhances antioxidant activities and polyphenol contents in kombucha beverages. **Antioxidants**, 11:155. <https://doi.org/10.3390/antiox110101>

CAPÍTULO 5

Variação temporal das características físico-químicas e da comunidade bacteriana (metabarcoding) de kombuchas produzidas com distintos tipos de chás e fontes de carboidratos fermentáveis

**VARIAÇÃO TEMPORAL DA COMUNIDADE BACTERIANA (*METABARCODING*)
E DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE KOMBUCHAS PRODUZIDAS
COM DISTINTOS TIPOS DE CHÁS E FONTES DE CARBOIDRATOS
FERMENTÁVEIS**

Hevelynn Franco Martins¹, Renato Pereira de Lima², Cosme Damião Barbosa³, Glen Jasper Yupanqui García⁴, Luíz Marcelo Ribeiro Tomé⁵, Aristóteles Góes Neto⁶, Marcos dos Santos Lima⁷, Ana Júlia de Brito Araújo⁸, Leila Thaise Santana de Oliveira Santos⁹, Giovanni Brandão Mafra de Carvalho¹⁰, Ernesto Acosta Martinez^{11*}

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, Bahia, Brasil. hevelynn_martins@hotmail.com

²Instituto Nacional do Semiárido, Campina Grande, Paraíba, Brasil. renatolima.p@gmail.com

³Departamento de Análises Bromatológicas. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal da Bahia, Campus Ondina, Salvador, Bahia, Brasil. cosmebarbosa@ufba.br

⁴Programa de Pós-Graduação em Bioinformática. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. glen.yupanqui@gmail.com

⁵Instituto Rene Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Minas Gerais, Brasil. marcelofsa_rt@hotmail.com

⁶Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais, Brasil. arigoesneto@icb.ufmg.br

^{7,8}Departamento de Tecnologia. Instituto Federal do Sertão Pernambucano, Campus Petrolina. Petrolina, Pernambuco. Brasil. marcos.santos.lima@ifsertao-pe.edu.br; ana.julia@ifsertao-pe.edu.br

⁹Centro Universitário Nobre (UNIFAN). Feira de Santana, Bahia, Brasil. leilathaise@yahoo.com.br

^{10,11}Departamento de Tecnologia. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, Bahia. brandao.phd@gmail.com; ernesto.amartinez@uefs.br.

Resumo

A kombucha é uma bebida fermentada rica em probióticos, ácidos orgânicos e antioxidantes que oferecem inúmeros benefícios à saúde. Este estudo investigou a influência da combinação de chás preto e verde com os fontes de carboidratos fermentáveis xarope de guaraná e mel de abelha nas características microbiológicas e físico-químicas da kombucha. Para a análise da comunidade bacteriana por *metabarcoding*, utilizou-se os métodos de *Amplicon Sequence Variants* (ASV) e *Operational Taxonomic Units* (OTU). Kombuchas com chá verde, especialmente aquelas adoçadas com mel de abelha, mostraram maior diversidade microbiana, sugerindo que o chá verde pode fornecer um ambiente mais favorável para uma diversidade mais ampla de bactérias e, a combinação com o mel de abelha também favoreceu certos gêneros de bactérias. O gênero *Komagataeibacter* mostrou-se dominante em todas as distintas combinações de chás e fontes de carboidratos fermentáveis. O número de prováveis espécies dos gêneros *Komagataeibacter* e *Acetobacter* foi influenciado tanto pelo tipo de chá quanto pelo tipo de carboidrato, com variações significativas ao longo do tempo de fermentação. A bebida com chá preto e mel de abelha manteve um alto teor de maltose enquanto que kombuchas com chá verde apresentaram um aumento mais acentuado nos ácidos orgânicos ao longo do tempo. A kombucha feita com chá verde e mel de abelha apresentou os níveis mais elevados de ácido acético, especialmente após 12 dias de fermentação, estando diretamente relacionada à diminuição dos açúcares ao longo do processo fermentativo, evidenciando uma conversão eficiente de açúcares em ácidos pela microbiota. Além disso, a análise das características físico-químicas das kombuchas durante o tempo de fermentação indicou que as transformações metabólicas dos micro-organismos influenciam diretamente a composição de açúcares, ácidos orgânicos e o grau alcoólico da bebida. O método OTU revelou uma diversidade microbiana mais abrangente, enquanto que o método ASV ofereceu uma compreensão mais detalhada das prováveis espécies específicas.

Palavras-chave: scoby, *Komagataeibacter*, bebida fermentada, ácido acético, mel de abelha, kombucha.

1. Introdução

Kombucha é uma bebida fermentada milenarmente consumida em diversas partes do mundo, conhecida por seus potenciais benefícios à saúde e pelo sabor refrescante e agradável (MENDELSON *et al.*, 2023). A produção da kombucha envolve a fermentação do chá adoçado por uma associação de bactérias e leveduras conhecida como SCOBY – *Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast* (KAASHYAP *et al.*, 2021). Durante esse processo, as bactérias e leveduras metabolizam os açúcares presentes nos chás, produzindo uma variedade de compostos bioativos, como ácidos orgânicos, polissacarídeos, os quais, associados aos compostos fenólicos, conferem à kombucha suas propriedades únicas de sabor e benefícios à saúde (ANTOLAK *et al.*, 2021, MASSOUD *et al.*, 2022).

A kombucha possui uma ampla variedade de experimentações, incluindo sua versão tradicional derivada das folhas de chá preto ou verde e diferentes tipos de fontes de carboidratos fermentáveis (ANDRESON *et al.*, 2022). Essas escolhas podem impactar significativamente a microbiota envolvida na fermentação e a qualidade físico-química da bebida resultante. No entanto, as informações sobre a diversidade de condições de fermentação da kombucha ainda não estão bem caracterizadas. De acordo com Martins *et al.* (2023), a composição química da kombucha é muito variável, estando dependente de vários fatores como o tempo da fermentação, o tipo de micro-organismos presentes no inóculo e as características da base de chá, as quais dependem da água utilizada, tipo e concentração de chá e açúcar. Neste sentido, há a necessidade de estudos que explorem um espectro mais amplo de tipos de chás, tipos e concentrações de açúcar e condições ambientais, aumentando a representatividade dos ambientes de fermentação a fim de potencializar o máximo os benefícios da kombucha (LANDIS *et al.*, 2022).

A composição da microbiota encontrada no scoby e na kombucha é um fator crítico que influencia diretamente a qualidade e as características sensoriais da bebida fermentada (TU *et al.*, 2024; VENEGAS *et al.*, 2023). Portanto, a compreensão da composição da microbiota, especialmente das bactérias, e sua influência na produção de compostos bioativos é essencial para garantir a qualidade e a consistência da kombucha, ao mesmo tempo em que se exploram possibilidades de diversificação de sabores e potenciais benefícios nutricionais.

Para aprofundar o entendimento sobre a complexa microbiota da kombucha, utilizaram-se os métodos de *Amplicon Sequence Variants* (ASV) e *Operational Taxonomic Units* (OTU) na identificação das bactérias presentes. O método ASV oferece uma abordagem mais precisa e granular na identificação de variações genéticas, permitindo uma caracterização detalhada das espécies microbianas. Já o método OTU agrupa sequências semelhantes, fornecendo uma visão mais ampla da diversidade microbiana (JOOS *et al.*, 2020).

Esse estudo se baseia na hipótese de que a combinação específica de chás e fontes de carboidratos fermentáveis pode afetar a composição e abundância das comunidades bacterianas envolvidas na fermentação. Logo, o objetivo deste estudo foi investigar a influência da combinação de chás preto e verde com xarope de guaraná e mel de abelha, nas características microbiológicas, a partir da análise da comunidade bacteriana, utilizando o *metabarcoding* como abordagem metodológica tanto por *Amplicon Sequence Variants* (ASV) como por *Operational Taxonomic Units* (OTU).

2. Material e métodos

2.1 Insumos e material biológico

As folhas dos chás preto e verde (*Camelia sinensis*), o xarope de guaraná (*Paullinia cupana*) e o mel de abelha (*Apis mellifera*) foram adquiridos no mercado local, em Feira de Santana, Bahia, Brasil. As culturas iniciadoras (caldo fermentado e película celulósica - biofilme) foram fornecidas por um produtor artesanal local. As infusões e condições de fermentação foram realizadas de acordo com as instruções de Barbosa *et al.* (2020).

2.2 Processo de fermentação e amostragem

A kombucha foi preparada pela fermentação em chás verde e preto. Os extratos dos chás foram produzidos com 5 g de chá para 1 litro de água durante 10 minutos em infusão e adicionado 50 g de xarope de guaraná e/ou mel e agitada até sua dissolução. Após a redução da temperatura dos chás (em torno de 28°C), a scoby-filha foi inoculada juntamente com 100 mL de *starter*. Esse procedimento foi previamente descrito por Suciati *et al.* (2019). A fermentação ocorreu por 12 dias, pelo método artesanal, em um recipiente de vidro de 3 litros com abertura de 9 centímetros de diâmetro, coberto com papel toalha, que possibilita a passagem de ar sem que ocorra contaminação por insetos ou partículas.

Os fatores em estudo foram arranjados em esquema fatorial de $5 \times 3 + 1$, correspondendo a cinco diferentes bebidas mistas (K1 – xarope de guaraná + chá preto; K2 – mel de abelha + chá preto; K3 – xarope de guaraná + chá verde; K4 – mel de abelha + chá verde; K5 – xarope de guaraná + mel de abelha + chás verde e preto), três períodos de amostragem (0, 6 e 12 dias de fermentação). O dia 0 de amostragem correspondeu à infusão logo após a adição do inóculo de kombucha. Foi utilizado um delineamento inteiramente ao acaso, com três réplicas biológicas.

2.3 Abordagem independente de cultura – metagenômica de amplicon (*metabarcoding*)

2.3.1 Extração de DNA metagenômico

O DNA foi extraído conforme adaptado por Marsh *et al.* (2014), com algumas modificações: (i) uso do kit DNeasy® PowerFood® Microbial Kit (Qiagen, Hilden - Alemanha); (ii) 1 mL de celulase; (iii) lise mecânica por dois ciclos de 40 s em um homogenizador de tecidos (FastPrep, MP Biomedicals); (iv) a solução foi incubada por 2 h a 40°C; (v) digestão

enzimática com as enzimas mutanolysin ($100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) e lisozima (50 mg mL^{-1}) a 37°C por 1 h. A extração foi otimizada por 10 min. a 70°C de incubação.

2.3.2 Sequenciamento Metagenômico (amplicons do Gene 16S rRNA; *metabarcoding*)

Para realizar o sequenciamento das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA das comunidades bacterianas nos diferentes tempos, as bibliotecas foram preparadas conforme o protocolo proprietário da Neopropecta Microbiome Technologies. As regiões foram amplificadas utilizando os primers específicos para a região V3-V4 do gene rRNA 16S, sendo o 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG) e o 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT). As bibliotecas resultantes foram sequenciadas utilizando o equipamento Illumina MiSeq, empregando o kit V2 (paired-end), configurado para 500 ciclos (2 x 250 pb).

2.3.3 Análise metagenômica

Utilizou-se o pipeline customizado para análise de amplicons 16S cujo código fonte encontra-se depositado no GitHub: <https://github.com/LBMCF/pipeline-for-amplicon-analysis>. O pipeline é multiplataforma e foi desenvolvido em Python 3, permitindo a análise das leituras dos amplicons 16S utilizando as abordagens tanto de ASV (*Amplicon Sequence Variant*) como de OTU (*Operational Taxonomic Unit*), sequenciados pelas plataformas Illumina, retornando uma tabela de abundâncias dos OTU/ASV com as linhagens preditas baseadas no banco de dados SILVA SSU NR 138.1 (QUAST *et al.*, 2012). O pipeline utiliza os programas: USEARCH (EDGAR, 2010) de 32-bits, VSEARCH (ROGNES *et al.*, 2016), Cutadapt (MARTIN, 2011), FastQC (ANDREWS, 2010) e BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

Para a análise utilizando a abordagem de ASV, inicialmente foi feita uma avaliação do controle de qualidade das leituras utilizando FastQC, e, posteriormente, realizou-se a junção de todas as leituras diretas e reversas através de VSEARCH com a opção `--fastq_mergepairs`, o corte dos adaptadores com Cutadapt, o controle de qualidade com VSEARCH (utilizando as opções `--fastq_filter`, `--fastq_maxee = 0.8` e `--filter_minlen = 350`), e para a eliminação das duplicatas utilizou-se VSEARCH com a opção `--derep_fulllength`. A geração da tabela de ASV foi realizada com USEARCH através da opção `--unoise3` e a geração da tabela de abundâncias foi realizada com as opções `--usearch_global` e `id = 0.99` do VSEARCH, com as classificações taxonômicas dos ASVs realizadas com o algoritmo SINTAX (EDGAR, 2016) do USEARCH e o banco de dados taxonômico SILVA, e finalmente, a consolidação da tabela de abundâncias

das ASV com as classificações taxonômicas foi realizada com o script local `get_abundances_table_asv.py` incluso no código fonte.

Para a análise utilizando a abordagem de OTU, inicialmente foi realizada uma avaliação do controle de qualidade das leituras utilizando FastQC, e, posteriormente, a junção de todas as leituras diretas e reversas através de VSEARCH com a opção `--fastq_mergepairs`. O corte dos adaptadores foi realizado com Cutadapt e o controle de qualidade foi feito com VSEARCH, utilizando-se as opções `--fastq_filter`, `--fastq_maxee = 0.8` e `--filter_minlen = 350`. Para a eliminação das duplicatas, também se utiliza VSEARCH com a opção `--derep_fulllength` e a eliminação das quimeras foi realizada utilizando-se o VSEARCH em duas etapas: uma eliminação *de novo* (sem referência) com a opção `--uchime_denovo` e uma eliminação por referência usando a opção `--uchime_ref` junto com o banco de dados SILVA. O agrupamento das leituras em OTU foi realizada utilizando VSEARCH com a opção `--id = 0.97` (97% de identidade) e para a identificação taxonômica utilizou-se o módulo BLASTn do BLAST com o banco de dados SILVA. Finalmente, a consolidação da tabela de abundâncias dos OTU com as classificações taxonômicas foi realizada com o script local `get_abundances_table_otu.py` incluso no código fonte.

2.4 Caracterização físico-química

Todas as amostras foram centrifugadas (Centrífuga Excelsa Baby I FANEM) a 2240×g por 5 min, e o sobrenadante foi usado para análises posteriores. As concentrações de etanol (E), açúcares redutores totais (TRS), acidez titulável total (TTA), sólidos solúveis totais, foram realizados conforme descrito por Barbosa *et al.* (2020). As análises de ácidos orgânicos foram realizadas em um sistema de cromatógrafo líquido Agilent 1260 Infinity LC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). A coluna e a pré-coluna utilizadas foram uma Zorbax Eclipse Plus RP-C18 (100×4,6 mm, 3,5μ) e uma Zorbax C18 (12,6× 4,6 mm, 5μ), respectivamente (Agilent Technologies). Antes da injeção das amostras, as kombuchas foram diluídas 1:2 com fase móvel A e filtrados através de membrana de 0,45μ (Millex Millipore, Barueri, SP, Brasil).

O solvente A era uma solução de ácido fosfórico 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,0), e o solvente B foi acidificado com metanol com 0,5% de H₃PO₄. O gradiente de eluição foi o seguinte: 0 a 5 min: 5% B; 5 a 14 min: 23% B; 14 a 30 min: 50% B; e 30-33 min: 80% B. O volume de injeção foi de 20 μL e a detecção foi ajustada em 220, 280, 320, 360 e 520 nm. A quantificação de polifenóis individuais foi realizada por comparação com padrões externos. O processamento de

dados foi realizado no software OpenLAB CDS ChemStation Edition (Agilent Technologies). Adicionalmente, a pureza espectral dos picos foi verificada utilizando a ferramenta limiar para garantir a precisão da identificação de cada composto, conforme Padilha *et al.* (2017).

2.5 Análise e visualização dos dados

A técnica Word Cloud foi utilizada para apresentar o número de táxons em cada categoria taxonômica. O número total de bactérias e os dados de qualidade físico-química foram apresentados em função do tempo de exposição para a kombucha e o Scoby, para cada ensaio e método de identificação. Os dados foram apresentados por média $\pm$ desvio padrão (SD). A análise de componentes principais (ACP) foi utilizada para explorar as relações entre as características físico-químicas dos chás e a presença de bactérias ao longo do processo fermentativo. Em combinação com a análise de agrupamento, a ACP permitiu identificar padrões e fornecer uma caracterização detalhada das variações na qualidade das kombuchas e dos SCOBYS em diferentes tempos de fermentação. O número de componentes principais foi selecionado com base na variância acumulada mínima de 70%. Para reduzir a dimensionalidade dos dados, as variáveis participantes em cada componente principal foram determinadas com base na correlação de $\pm 0,6$ do autovetor com o componente em questão. Todas as análises foram realizadas com auxílio do software estatístico R v. 4.2.3 (R Core Team, 2018).

3. Resultados

3.1. Diversidade bacteriana nas kombuchas e scobys

Os métodos ASV (*Amplicon Sequence Variants*) e OTU (*Operational Taxonomic Units*) foram utilizados para identificar as bactérias presentes nas kombuchas produzidas com diferentes combinações de chás e açúcares. Através da abordagem de OTU foi possível identificar uma riqueza substancialmente maior de bactérias em todas as categorias taxonômicas quando comparada à abordagem de ASV. Enquanto que a abordagem de ASV revelou a presença de 7 diferentes filos, 11 classes, 36 ordens, 53 famílias, 80 gêneros e apenas 1 espécie, a abordagem do OTU resgatou 11 diferentes filos, 21 classes, 57 ordens, 110 famílias, 209 gêneros e 146 espécies (correspondentes a valores 1,57; 1,91; 1,58; 2,08; 2,61 e 146 vezes maiores que com ASV). Essa diferença substancial demonstra a sensibilidade da abordagem de OTU em capturar a diversidade bacteriana presente nas kombuchas.

O índice de diversidade de Shannon, uma medida amplamente utilizada em ecologia

microbiana, leva em consideração tanto a riqueza (número de espécies) quanto a equitatividade (distribuição das abundâncias entre as espécies) de uma comunidade. Esse índice indicou que a abordagem de ASV (Figura 1A e 1B) revelou uma maior diversidade bacteriana em comparação à abordagem de OTU (Figura 1C e 1D), em uma mesma amostra e tempo de fermentação. A bebida que combina mel de abelha e chá verde (K4) mostrou, em geral, maior diversidade do que aquelas com xarope de guaraná (K1 e K3) ou mel de abelha e chá preto (K2), especialmente nos dias 0 e 12. A bebida que combina xarope de guaraná, mel de abelha e ambos os chás (K5) exibe um padrão único, com uma diversidade microbiana que aumenta continuamente até o dia 12, o que pode indicar que essa combinação promove um ambiente mais propício para as comunidades bacterianas.

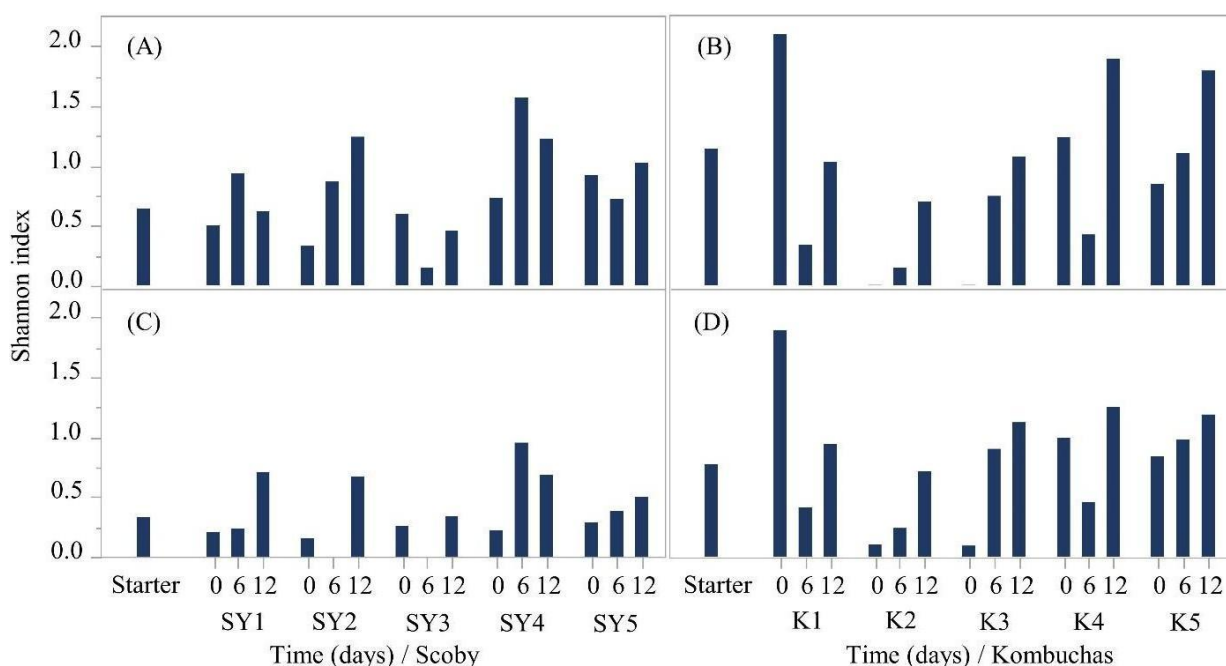


Figura 1. Índice de diversidade de Shannon identificados pelos métodos ASV (A e B) e OTU (C e D) no scoby (SY) e kombuchas (K) produzidas com combinações de chás e açúcares e em função do tempo de fermentação. SY1 ou K1: xarope de guaraná + chá preto; SY2 ou K2: mel de abelha + chá preto; SY3 ou K3: xarope de guaraná + chá verde; SY4 ou K4: mel de abelha + chá verde; SY5 ou K5: xarope de guaraná + mel de abelha + chás verde e preto.

De acordo com o método ASV, o Filo mais frequente nas kombuchas e scobys foi Proteobacteria, seguido por Firmicutes (Figura 2A). Outros filós mais abundantes incluíram Cyanobacteria e Actinobacteria. Através da abordagem de OTU (Figura 2B), a ordem de abundância relativa foi invertida estando Firmicutes, em primeiro lugar, seguido por Proteobacteria. Essa discrepância sugere a necessidade de se considerar cuidadosamente a

Figura 5. Comparação das comunidades bacterianas ao nível de espécie segundo as abordagens de ASV (A) e OTU (B).

3.2. Variação temporal da abundância relativa das principais bactérias nas Kombuchas e Scobys ao longo do tempo

Para compreender melhor as mudanças na abundância relativa das bactérias em função dos tipos de chá, açúcares e tempo de fermentação, abordamos como principais bactérias aquelas com abundância relativa igual ou superior à 3% da bactéria mais abundante. *Komagataeibacter* foi o gênero com o maior número de leituras em todos os ensaios. O número de leituras dos gêneros *Komagataeibacter* e *Acetobacter* foi semelhante independentemente da abordagem utilizada, ou seja, com ASV ou OTU. No entanto, *Pseudomonas* foi detectada com abundância significativa de leituras na abordagem de ASV (Figura 6A, 6B) em comparação com a abordagem de OTU (Figura 6C, 6D). A abundância absoluta de leituras desses gêneros mais abundantes foi geralmente superior nas kombuchas em comparação com os scobys em ambos os ensaios, independentemente da abordagem analisada.

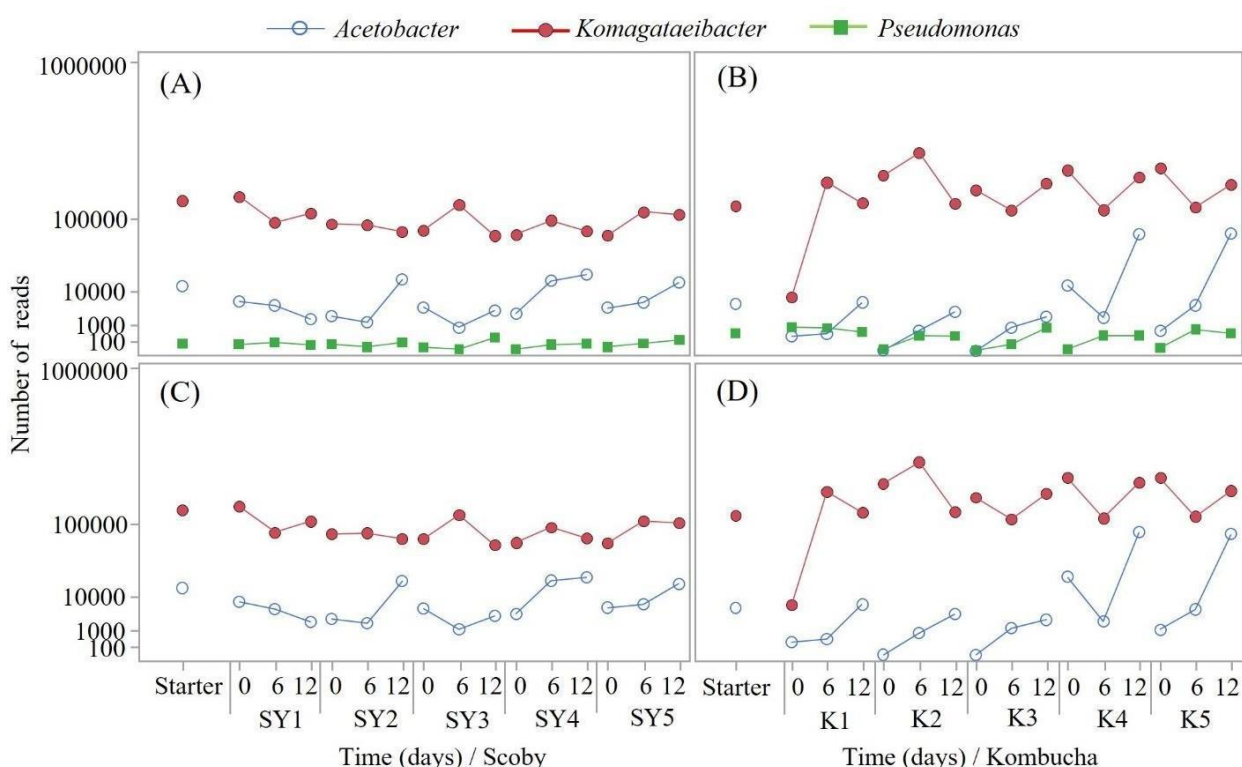


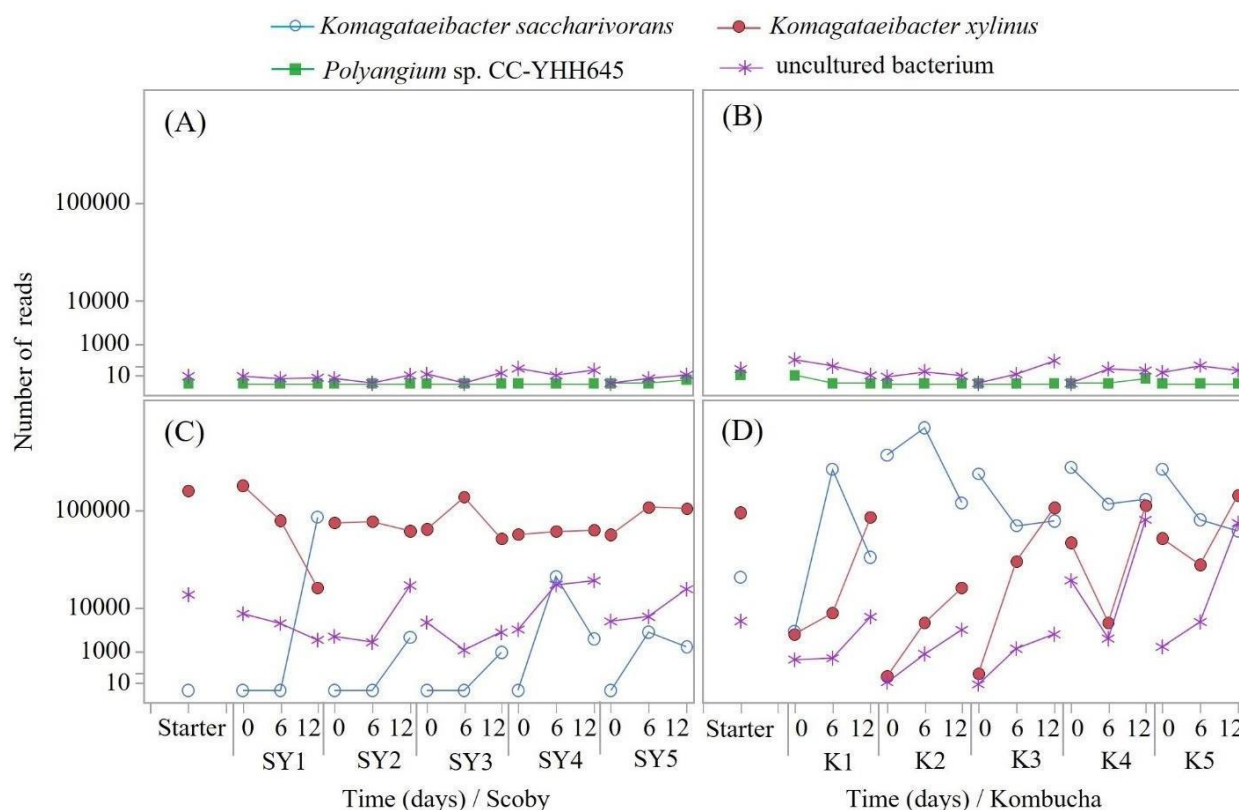
Figura 6. Abundância absoluta de reads dos principais gêneros de bactérias identificados no scoby (SY) e

kombucha (K) segundo os métodos ASV (A e B) e OTU (C e D) e em função do tipo de chá e carboidrato. SY1 ou K1: xarope de guaraná + chá preto; SY2 ou K2: mel de abelha + chá preto; SY3 ou K3: xarope de guaraná + chá verde; SY4 ou K4: mel de abelha + chá verde; SY5 ou K5: xarope de guaraná + mel de abelha + chás verde e preto.

Nos scobys, a abundância absoluta de leituras de *Komagataeibacter* e *Pseudomonas* dos diferentes ensaios foram ligeiramente similares ou inferiores ao registrado no Starter. Entretanto, o número de *Acetobacter* aumentou ao longo dos 12 dias de fermentação nos Scobys SY2, SY4 e SY5. Nas kombuchas, a abundância absoluta de leituras de *Komagataeibacter* dos diferentes ensaios foi ligeiramente similar ou superior ao registrado no Starter. Isso foi particularmente evidente nos ensaios K1 e K2 após 6 dias de fermentação e nos demais ensaios aos 0 e 12 dias de fermentação, quando foram registrados as maiores abundâncias absolutas de *reads* desses gênero de bactérias. A abundância absoluta de leituras de *Acetobacter* aumentou nas kombuchas K4 e K5 após 12 dias de fermentação.

Com relação às espécies, pela abordagem de ASV foram identificados apenas *Polyangium* sp. CC-YHH645 e uncultured bacterium (Figura 7A, 7B), ambos com baixas abundâncias absolutas de *reads* quando comparados aos identificados pelo método OTU (Figura 7C, 7D). Pela abordagem de OTU foram identificados predominantemente *K. saccharivorans*, *K. xylinus* e uncultured bacterium. O *K. saccharivorans* foi a espécie de bactéria dominante nas kombuchas enquanto que *K. xylinus* dominou nos scobys. A maior dominância de *K. saccharivorans* nas kombuchas foi registrado para K2 aos 6 dias de fermentação. Nas kombuchas, a dominância de *K. xylinus* foi maior aos 12 dias de fermentação (Figura 7D) enquanto nos scobys, o número de *K. xylinus* permaneceu praticamente estável durante o período de fermentação, exceto para SY1, quando houve uma redução ao longo do tempo (Figura 7C).

Figura 7. Abundância absoluta de reads das principais espécies de bactérias identificadas no scoby (SY) e kombucha (K) segundo as abordagens de ASV (A e B) e OTU (C e D) e em função do tipo de chá e carboidrato. SY1 ou K1: xarope de guaraná + chá preto; SY2 ou K2: mel de abelha + chá preto; SY3 ou K3: xarope de guaraná + chá verde; SY4 ou K4: mel de abelha + chá verde; SY5 ou K5: xarope de guaraná + mel de abelha + chás verde e preto.



Estes resultados destacam a complexidade da dinâmica das comunidades bacterianas em scobys e kombuchas, com variações significativas em relação ao tempo de fermentação, tipos de chás e fontes de carboidratos fermentáveis e abordagens distintas de identificação por *metabarcoding*.

3.3 Qualidade das Kombuchas ao Longo do Tempo de Fermentação

A concentração de maltose não mostrou grandes variações com o tempo de fermentação (Figura 8A). Notavelmente, K2 apresentou a maior concentração de maltose, seguido por K4 e, em seguida, pelo K5. Enquanto K1 e K3 contém concentração semelhante ao do Starter. Em relação à glicose (Figura 8B), frutose (Figura 8C), açúcares redutores (Figura 8D) e açúcares totais (Figura 8E), suas concentrações diminuíram com o tempo de fermentação. No entanto, após 12 dias de fermentação, os açúcares totais ainda eram superiores ao Starter, exceto para K3. Além disso, os açúcares redutores das Kombuchas K5, K4, K2 e K1 após 12 dias também eram superiores ao Starter. Os maiores conteúdos de açúcares redutores foram registrados nas Kombuchas K2 e K4 durante todo o processo de fermentação.

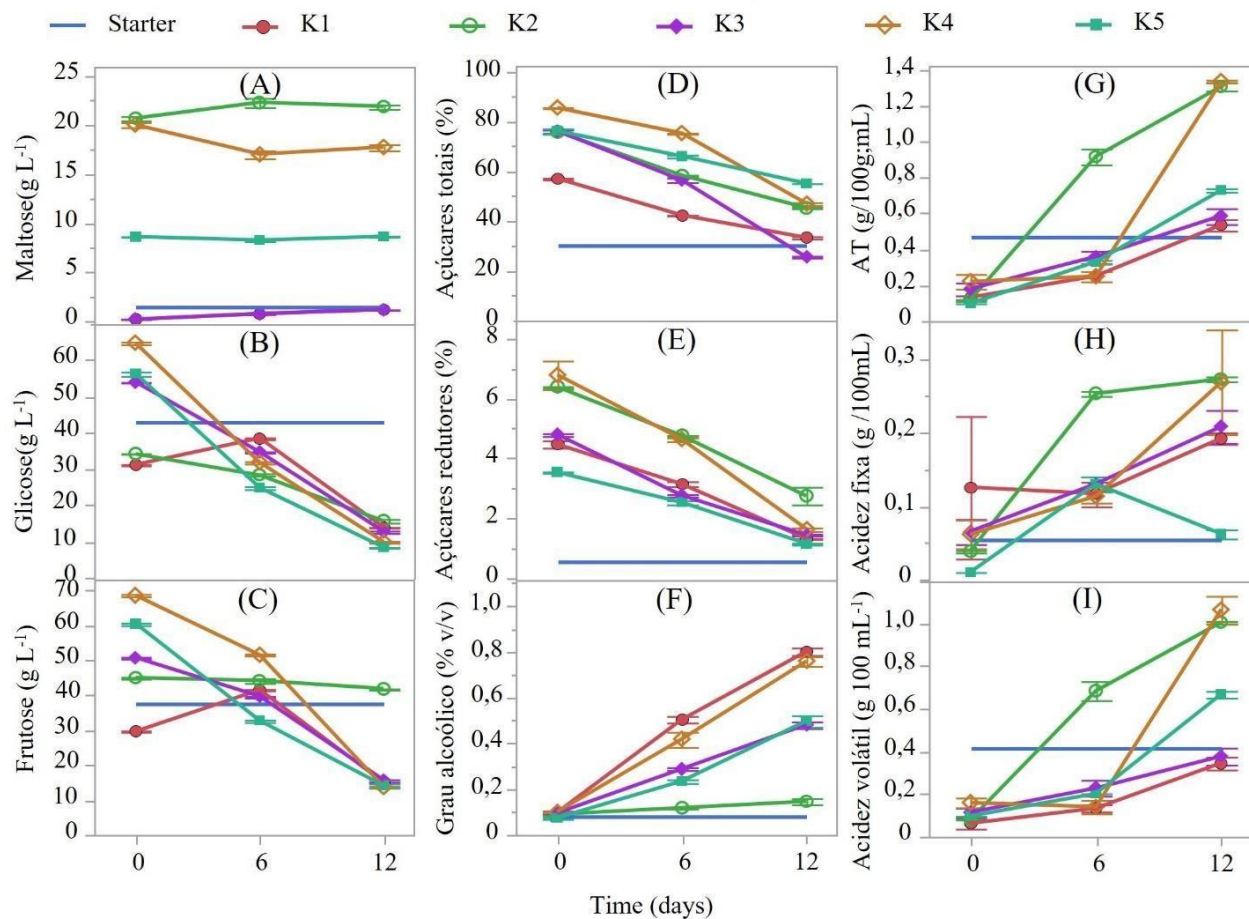


Figura 8. Perfis de açúcares, acidez e grau alcoólico nas kombuchas em função dos diferentes ensaios e tempo de fermentação. K1: xarope de guaraná + chá preto; K2: mel de abelha + chá preto; K3: xarope de guaraná + chá verde; K4: mel de abelha + chá verde; K5: xarope de guaraná + mel de abelha + chás verde e preto.

O grau alcoólico (Figura 8F) aumentou com o tempo de fermentação, principalmente nas kombuchas K1 e K4, seguidas de K5 e K3, enquanto o grau alcoólico em K2 permaneceu praticamente constante e próximo ao Starter. Os valores de acidez titulável (Figura 8G), acidez fixa (Figura 8H) e a acidez volátil (Figura 8I) de todos os ensaios eram baixas no início do processo de fermentação, sendo inferiores ou próximos ao Starter. Ambas as acidez aumentaram com o tempo de fermentação, especialmente nas kombuchas K2 aos 6 e 12 dias e K4 aos 12 dias, quando apresentaram valores de acidez superiores às demais kombuchas.

Os teores dos ácidos cítrico (Figura 9A), tartárico (Figura 9B), succínico (Figura 9D), láctico (Figura 9E) e acético (Figura 9G) nas kombuchas de todos os ensaios aumentaram significativamente em função do tempo de fermentação. Aos 12 dias, o maior conteúdo de ácido cítrico foi registrado em K5, K1 e K3, sendo superior ao Starter; o maior conteúdo de ácido tartárico foi registrado em K3, também superior ao Starter. Os conteúdos de ácido málico

(Figura 9C) e succínico no Starter foram superiores àqueles registrados nas kombuchas ao longo do tempo de fermentação. As maiores concentrações de ácido fórmico e ácido acético foram verificadas nas kombuchas K4 e K2 aos 6 dias (Figura 9F) e 12 dias de fermentação (Figura 9G), respectivamente, enquanto que os menores conteúdos destes ácidos foram registrados em K1 e K3, mesmo após 12 dias de fermentação. A concentração de ácido butírico foi constatada apenas no tempo 0 da kombucha K2; para as demais kombuchas, sua concentração foi indetectável (Figura 9H).

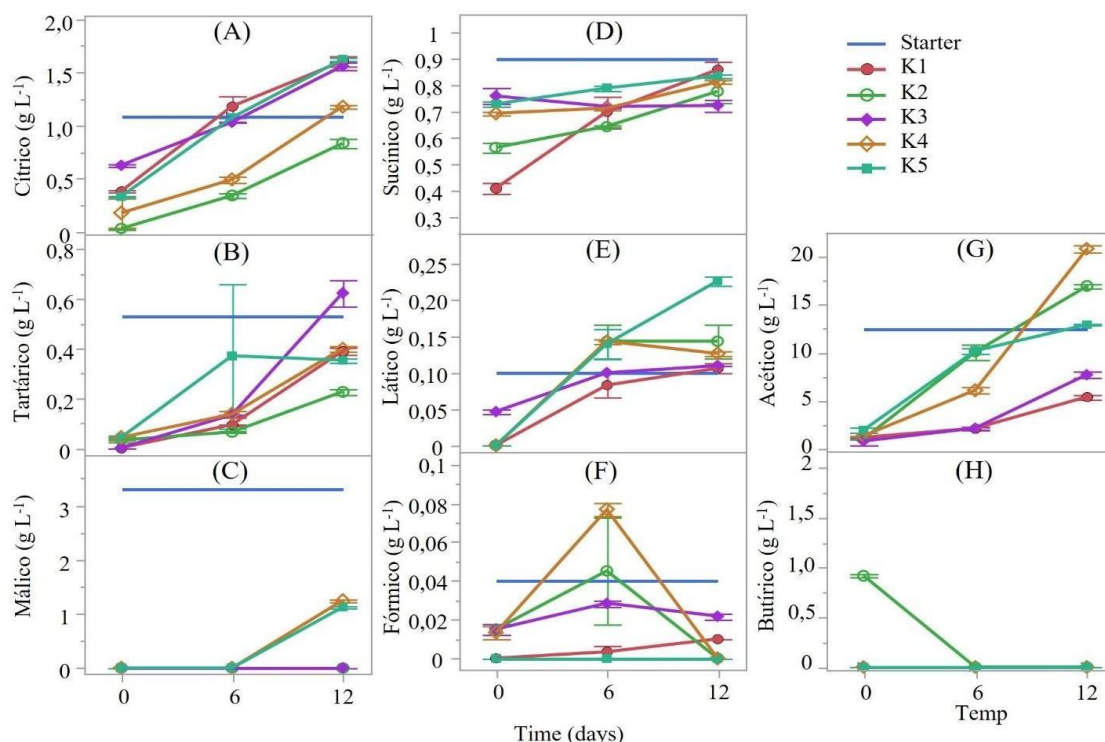


Figura 9. Teores de ácidos nas kombuchas em função dos diferentes ensaios e tempo de fermentação. K1: xarope de guaraná + chá preto; K2: mel de abelha + chá preto; K3: xarope de guaraná + chá verde; K4: mel de abelha + chá verde; K5: xarope de guaraná + mel de abelha + chás verde e preto.

3.4 Análise Integrada das características físico-químicas e das comunidades bacterianas

Na ACP, o componente principal 1 (CP1) explica 39.79% da variância total dos dados e está relacionado a vários parâmetros físico-químicos (Tabela 1). Os ácidos cítrico, tartárico, málico, succínico, lático, fórmico e acético, os sólidos solúveis totais e açúcares redutores, *ASV-Komagataeibacter*, *OTU-Komagataeibacter* e *ASV-Acetobacter* estão positivamente correlacionados com CP1. Por outro lado, glicose, frutose, acidez total, acidez fixa, acidez volátil e grau alcoólico têm correlações negativas com CP1.

Tabela 1. Autovetores dos três primeiros componentes principais (CP) relacionados com a qualidade dos chás e a quantidade de microrganismos presentes nas kombuchas.

Parâmetro	CP1	CP2	CP3
Maltose	-0.048	0.239	-0.152
Glicose	-0.255	0.047	0.226
Frutose	-0.258	0.089	0.106
Cítrico	0.270	-0.034	0.009
Ácido tartárico	0.250	-0.030	0.180
Ácido málico	0.124	-0.017	0.456
Ácido succínico	0.175	0.153	0.284
Ácido láctico	0.269	0.063	0.020
Ácido fórmico	0.014	-0.104	0.423
Ácido acético	0.235	0.080	0.036
Ácido butírico	-0.142	0.068	-0.072
Sólidos solúveis totais	0.186	-0.058	-0.353
Açúcares redutores	0.177	0.015	-0.328
Acidez total	-0.252	-0.022	0.054
Acidez fixa	-0.244	0.068	0.057
Acidez volátil	-0.241	-0.038	0.044
Grau Alcoólico	-0.238	0.046	-0.049
ASV- <i>Polyangium</i> sp.CC-YHH645	0.021	-0.237	0.332
ASV-uncultured-bacterium	0.053	-0.252	-0.067
OTU- <i>Komagataeibacter saccharivorans</i>	-0.188	0.263	-0.071
OTU- <i>Komagataeibacter xylinus</i>	0.239	0.102	0.177
OTU-uncultured-bacterium	0.184	0.205	-0.005
ASV- <i>Acetobacter</i>	0.191	0.195	-0.006
ASV- <i>Komagataeibacter</i>	-0.040	0.334	0.056
ASV- <i>Pseudomonas</i>	0.158	-0.267	-0.077
OTU- <i>Acetobacter</i>	0.184	0.205	-0.005
OTU- <i>Komagataeibacter</i>	-0.034	0.342	0.047
ASV- <i>Acetobacteraceae</i>	0.053	0.351	0.041
OTU- <i>Acetobacteraceae</i>	0.040	0.354	0.036
Variance	11.54	7.439	3.377
Percentage of variance	39.794	25.652	11.645
Cumulative percentage of variance	39.794	65.446	77.091

Valores de fonte em negrito são considerados altamente ponderados (correlação maior que $\pm 0,6$ com PC).

O CP2 explica 25.65% da variação total. Este componente tem correlação positiva com maltose, OTU-*K. xylinus*, OTU-uncultured-bacterium, ASV-*Komagataeibacter*, OTU-*Komagataeibacter* e ASV-*Acetobacteraceae*. Por outro lado, a CP2 tem uma correlação negativa com ASV-*Polyangium* sp. CC-YHH645, ASV-uncultured-bacterium e ASV-*Pseudomonas*, indicando que a presença dessas bactérias está associada a valores menores de CP2 (Tabela 1). A correlação positiva de maltose, OTU-*K. xylinus* e ASV-*Komagataeibacter* sugere que CP2 esse está relacionado à degradação e ao consumo de maltose durante a fermentação. Por outro lado, a correlação negativa com ASV-*Pseudomonas* e ASV-*Polyangium* sp. CC-YHH645 indica que o CP2 caracteriza ambientes onde a presença desses microrganismos é limitada, favorecendo a dominância de bactérias produtoras de ácidos orgânicos e promotoras da formação de biofilmes.

O CP3, que explica 11.64% da variância total, mostra uma correlação positiva com ácido málico, ácido fórmico e ASV-*Polyangium* sp. CC-YHH645. Por outro lado, apresenta uma correlação negativa com sólidos solúveis totais e açúcares redutores. Assim, o CP3 parece estar relacionado principalmente à presença de ácidos orgânicos específicos e à composição de açúcares.

A Figura 10 apresenta a ACP com base nos valores das variáveis e pontuações para as kombuchas nos dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2), juntamente com a análise de agrupamento. Observou-se a formação de quatro grupos distintos. O Grupo 1 foi composto pela kombucha Starter e as kombuchas K1, K2 e K3 após 12 dias de fermentação. Este grupo está localizado mais próximo ao centroide, indicando características intermediárias. Notavelmente, este grupo apresenta maior presença de ASV-*Pseudomonas* e maior teor de sólidos solúveis totais, mas menor presença de OTU-*K. saccharivorans*.

O Grupo 2 foi formado pelas kombuchas K4 e K5 após 12 dias de fermentação. Este grupo está localizado nos eixos positivos de CP1 e CP2, indicando uma tendência a maiores teores dos ácidos succínico, acético e láctico, maiores abundância de *Acetobacter* e uncultured-bacterium e menores teores de acidez volátil e acidez titulável.

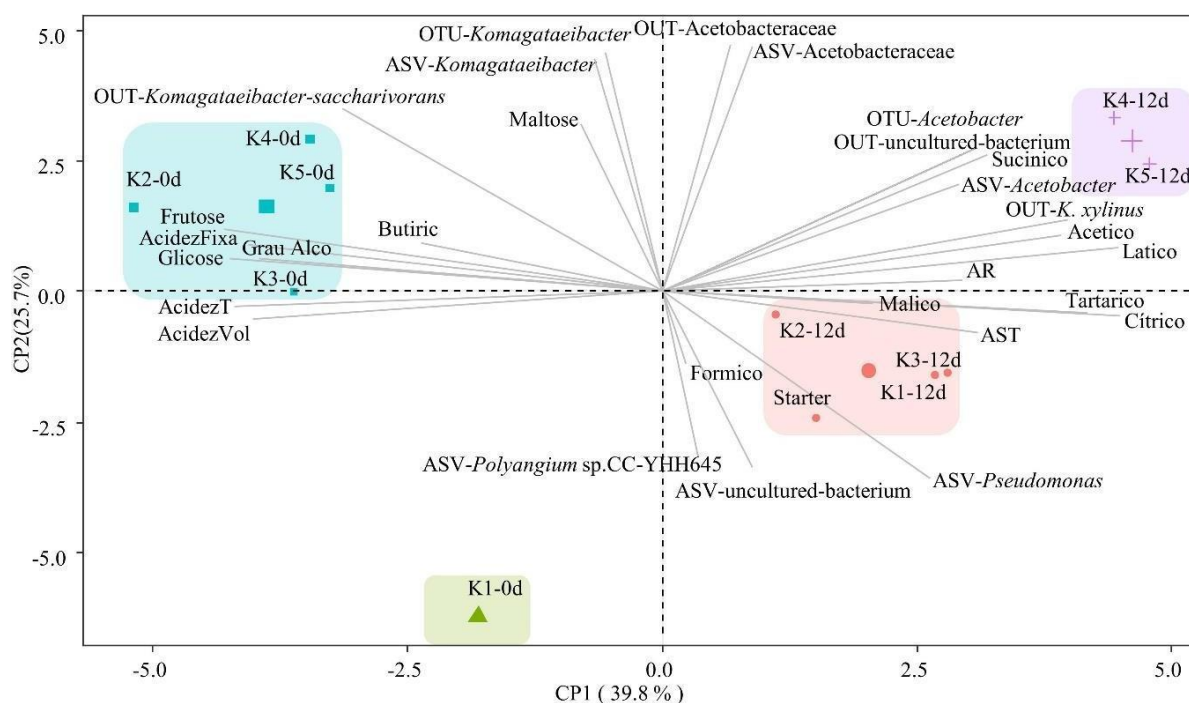


Figura 10. ACP com base nos valores das variáveis e pontuação para os tratamentos dos dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2). K1: xarope de guaraná + chá preto; K2: mel de abelha + chá preto; K3: xarope de guaraná + chá verde; K4: mel de abelha + chá verde; K5: xarope de guaraná + mel de abelha + chás verde e preto.

O Grupo 3 foi composto pelas kombuchas K2, K3, K4 e K5 no tempo 0 de fermentação. Este grupo está localizado no eixo negativo de CP1 e positivo de CP2. Isso sugere que essas kombuchas possuem características ligeiramente opostas as kombuchas do Grupo 2. No entanto, as principais características do Grupo 3 são maiores teores de frutose e glicose, maiores teores de acidez fixa, além de acidez volátil e acidez titulável, elevado grau alcoólico e presença de OTU-*K. saccharivorans*. Destaca-se também uma menor abundância de ASV-*Pseudomonas*.

O Grupo 4 foi formado pela kombucha K1 no tempo 0 de fermentação. Este grupo se diferencia de todos os outros e está localizado nos eixos negativos de ambos CP1 e CP2. As principais características do Grupo 4 incluem menor abundância de *Acetobacteraceae* e *Komagataeibacter*. Os microrganismos mais presentes no Grupo 4 foram ASV-*Polyangium* sp. CC-YHH645 e uncultured-bacterium.

4 Discussão

O presente estudo buscou aprofundar a compreensão das características físico-químicas e das comunidades bacterianas de kombuchas produzidas com diferentes combinações de chás, açúcares e tempos de fermentação, utilizando *metabarcoding* analisando-se por duas abordagens, ASV e OTU, para identificar e comparar a diversidade bacteriana nas amostras. A abordagem de ASV identificou *Acinetobacter* como o gênero dominante, seguido por *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Pseudomonas*, enquanto que a abordagem de OTU destacou *Bacillus* como o mais dominante, seguido por uncultured-bacterium, *Bacteroides*, *Pseudomonas* e *Corynebacterium*. Em contraste, o estudo de Kaashyap *et al.* (2021) sobre a base original da kombucha 'The Good Brew' revelou uma predominância de *Acetobacter* (57%), *Komagataeibacter* (34%) e *Gluconobacter* (7%) em nível de gênero, indicando uma composição microbiana distinta em comparação com nossos resultados. A diferença na diversidade bacteriana entre os estudos pode ser atribuída a fatores como o tipo de amostra, as condições de fermentação e os métodos de sequenciamento utilizados. Essas descobertas ressaltam a importância de considerar a variabilidade da diversidade bacteriana ao interpretar resultados de estudos metagenômicos e ao explorar o potencial de microrganismos em aplicações biotecnológicas.

A escolha do método de identificação microbiana influenciou significativamente a percepção da diversidade microbiana nos scobys e kombuchas. A diferença substancial na riqueza taxonômica identificada entre os métodos ASV e OTU destacou a sensibilidade do método OTU em capturar uma diversidade microbiana mais ampla tanto nos scobys quanto nas kombuchas. A comparação entre as duas abordagens revela a importância de se considerar as diferenças entre essas metodologias. Embora ambas as abordagens forneçam resultados comparáveis e permitam interpretações semelhantes, também é evidente que podem resultar em diversidades de comunidades ligeiramente diferentes (JESKE & GALLERT, 2022). Essas diferenças podem ser particularmente relevantes ao se avaliar a presença ou ausência de táxons, mas também a abundância dos microrganismos (CHIARELLO *et al.*, 2022; JESKE & GALLERT, 2022).

Em geral, a diversidade de bactérias identificados nas kombuchas e scobys são coerentes com as comunidades microbianas relatadas em outras pesquisas (BARBOSA *et al.*, 2021; KAASHYAP *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2022). O mel de abelha parece ser um fator mais influente na promoção da diversidade bacteriana do que o xarope de guaraná, especialmente quando combinado com chá verde. Isso pode sugerir que o mel de abelha

contribui para uma comunidade bacteriana mais diversa ao longo do tempo, embora o xarope de guaraná também mostra um aumento significativo na diversidade em alguns pontos, como em K1 do dia 6 para o dia 12. A combinação de todos os ingredientes (K5) resulta em um aumento progressivo e acentuado da diversidade bacteriana, indicando que a interação complexa entre chás e fontes de carboidratos fermentáveis pode criar condições favoráveis para uma comunidade bacteriana rica e diversificada ao longo da fermentação.

Os resultados mostraram variações significativas na abundância de microrganismos ao longo do tempo de fermentação, com diferenças entre kombuchas e scobys. Isso sugere uma dinâmica complexa entre os microrganismos durante a fermentação (MARSH *et al.*, 2014). A presença de *Komagataeibacter* em maior quantidade em kombuchas pode estar relacionada à produção de ácido acético, um dos principais metabólitos da fermentação (CHEN *et al.*, 2020). Os parâmetros físico-químicos das kombuchas variaram ao longo do tempo de fermentação, com diminuição dos açúcares e aumento da acidez e teores de ácidos orgânicos. Isso está em concordância com o processo de fermentação microbiana, no qual os microrganismos consomem os açúcares e produzem ácidos (ANTOLAK *et al.*, 2021). Particularmente, a glicose é convertida em etanol e dióxido de carbono pelas leveduras (MIRANDA *et al.*, 2022). Em seguida, o etanol é convertido em ácido acético pelas acetobactérias (ANTOLAK *et al.*, 2021; MASSOUD *et al.*, 2022).

Portanto, o aumento do grau alcoólico em função do tempo pode ser atribuído à fermentação alcoólica realizada por leveduras que convertem açúcares em etanol (MASSOUD *et al.*, 2022). Por sua vez, a presença de ácidos orgânicos, como cítrico, tartárico, láctico e acético, que também aumentou ao longo do tempo de fermentação, refletiu a produção metabólica por bactérias como *Komagataeibacter* e *Acetobacter* (ANTOLAK *et al.*, 2021). A elevação na acidez titulável também é um resultado esperado, uma vez que a produção de ácidos orgânicos está diretamente relacionada à acidez da bebida (KRUK *et al.*, 2012). Essas transformações químicas impactam diretamente o sabor da kombucha, tornando-a mais ácida e menos doce à medida que a fermentação avança. O aumento da acidez confere um perfil refrescante, enquanto a redução dos açúcares e a presença de etanol, mesmo em baixas concentrações, adicionam complexidade ao aroma e ao corpo da bebida (DARTORA *et al.*, 2023). Assim, o controle do tempo de fermentação é essencial para ajustar o equilíbrio de sabores desejado (DARTORA *et al.*, 2023; MARTINS *et al.*, 2023).

A análise de componentes principais permitiu identificar as relações entre os fatores-chave que influenciam a dinâmica fermentativa e a composição físico-química das kombuchas

ao longo do tempo. O CP1 está relacionado ao consumo de açúcares simples e ao aumento dos ácidos orgânicos, como cítrico, láctico e acético, indicando a intensa atividade metabólica de microrganismos como *Komagataeibacter* e *Acetobacter* durante a fermentação. O CP2 reflete a degradação de açúcares complexos, como a maltose, e a presença de *K. xylinus* e *Komagataeibacter*, sugerindo uma fermentação mais estável e controlada, com menor participação de microrganismos oportunistas como *Pseudomonas*. Já o CP3 está associado à presença de ácidos específicos, como málico e fórmico, e à redução de sólidos solúveis, representando uma fase avançada da fermentação e a produção de metabólitos secundários.

O Grupo 1, que inclui o Starter e kombuchas K1, K2 e K3 após 12 dias, apresentou características intermediárias, com maior teor de sólidos solúveis totais e presença de ASV-*Pseudomonas*, mas menor abundância de OTU-*K. saccharivorans*. Isso indica uma fermentação mais lenta, onde a conversão de açúcares em ácidos orgânicos ainda não está completa, mantendo açúcares residuais elevados. O Grupo 2, formado por K4 e K5 após 12 dias, mostrou maiores teores de ácidos orgânicos, como sucínico e láctico, e alta abundância de *Acetobacter*, evidenciando uma fermentação avançada e eficiente na produção de ácidos, o que confere maior acidez e menor teor de açúcares residuais. O Grupo 3, com kombuchas no início da fermentação (tempo 0), caracterizou-se por altos níveis de glicose e frutose, acidez fixa e grau alcoólico elevado, destacando-se pela abundância de OTU-*K. saccharivorans*, o que sugere que essas amostras ainda estavam no início do processo fermentativo. O Grupo 4, representado apenas por K1 no tempo 0, apresentou menor abundância de *Acetobacteraceae* e *Komagataeibacter*, mas maior presença de microrganismos menos comuns, como ASV-*Polyangium* sp. CC-YHH645, indicando uma microbiota inicial distinta. Esses resultados confirmam que a combinação de chás e fontes de carboidratos fermentáveis, associada ao tempo de fermentação, influencia diretamente a composição microbiológica e físico-química, permitindo ajustes específicos para se obter kombuchas com diferentes perfis sensoriais e funcionais.

5 Conclusão

As combinações de chás, açúcares e tempo de fermentação influenciam na composição e abundância da comunidade bacteriana das kombuchas. A escolha do método de identificação microbiana é crucial, pois influencia significativamente na percepção da riqueza e abundância microbiana.

A composição bacteriana, dominada por cepas de *Komagataeibacter*, mostrou-se altamente sensível às condições de fermentação. A presença de *K. saccharivorans* e *K. xylinus*

revelou-se essencial na determinação da qualidade da kombucha, com implicações na produção de ácidos orgânicos, como o ácido acético. Além disso, a análise das características físico-químicas das kombuchas durante o tempo de fermentação indicou que as transformações metabólicas dos microrganismos influenciam diretamente a composição de açúcares, ácidos orgânicos e o grau alcoólico da bebida.

Kombuchas produzidas com chá verde, especialmente quando adoçadas com mel de abelha, apresentaram maior diversidade microbiana e maiores teores de ácidos orgânicos, como o ácido acético, evidenciando uma fermentação mais eficiente e equilibrada. O mel de abelha mostrou-se mais eficaz na promoção da diversidade bacteriana em comparação ao xarope de guaraná, especialmente quando combinado com chá verde, sugerindo que seus compostos bioativos e açúcares naturais contribuem para um ambiente favorável ao desenvolvimento de microrganismos benéficos.

As descobertas deste estudo podem orientar produtores de kombucha na elaboração de bebidas com perfis sensoriais e nutricionais específicos, além de abrir caminhos para futuras pesquisas que explorem ainda mais as possibilidades de personalização da kombucha e a exploração de seus benefícios para a saúde.

Contribuição dos autores

Hevelynn Martins: Conceitualização, Curadoria de dados, Análise formal, Investigação, Metodologia e Redação - rascunho original. **Renato Lima:** Software, Visualização, Escrita - revisão e edição. **Cosme Barbosa:** Redação - revisão e edição. **Glen García:** Redação - revisão e edição. **Luíz Tomé:** Análise formal. **Aristóteles Góes Neto:** Análise formal e Metodologia. **Marcos Lima:** Análise formal. **Ana Araújo:** Análise formal. **Leila Santos:** Investigação e Metodologia. **Giovanni Carvalho:** Investigação. **Ernesto Martinez:** Aquisição de financiamento, administração do projeto, recursos, supervisão e redação - revisão e edição.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), Código Financeiro – 001. Agradecemos ao Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e ao Programa Interno de Auxílio Financeiro aos Programas de Pós-Graduação Stricto Sensu (AUXPPG) - termo de bolsa nº 008/2024.

Referências

1. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
2. Andreson, M., Kazantseva, J., Kuldjäär, R., Malv, E., Vaikma, H., Kaleda, A., ... & Vilu, R. (2022). Characterisation of chemical, microbial and sensory profiles of commercial kombuchas. *International Journal of Food Microbiology*, 373, 109715. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109715>
3. Andrews, S. (2010). A quality control tool for high throughput sequence data. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
4. Antolak, H., Piechota, D., & Kucharska, A. (2021). Kombucha tea—A double power of bioactive compounds from tea and symbiotic culture of bacteria and yeasts (SCOBY). *Antioxidants*, 10(10), 1541. <https://doi.org/10.3390/antiox10101541>
5. Barbosa, C. D., Baqueta, M. R., Santos, W. C. R., Gomes, D., Alvarenga, V. O., Teixeira, P., ... & Lacerda, I. C. (2020). Data fusion of UPLC data, NIR spectra and physicochemical parameters with chemometrics as an alternative to evaluating kombucha fermentation. *LWT*, 133, 109875. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109875>
6. Barbosa, C. D., Uetanabaro, A. P. T., Santos, W. C. R., Caetano, R. G., Albano, H., Kato, R., ... & Lacerda, I. C. A. (2021). Microbial–physicochemical integrated analysis of kombucha fermentation. *LWT*, 148, 111788. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111788>
7. Chiarello, M., McCauley, M., Villéger, S., & Jackson, C. R. (2022). Ranking the biases: The choice of OTU vs. ASV in 16S rRNA amplicon data analysis has stronger effects on diversity measures than rarefaction and OTU identity threshold. *PLoS One*, 17(2), e0264443. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264443>
8. Dartora, B., Hickert, L. R., Fabricio, M. F., Ayub, M. A. Z., Furlan, J. M., Wagner, R., Perez, K. J. and Sant'Anna, V. (2023). Understanding the effect of fermentation time on physicochemical characteristics, sensory attributes, and volatile compounds in green tea kombucha. *Food Research International*, 174, p.113569. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113569>
9. Edgar R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST.

- Bioinformatics, 26(19), 2460-2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
10. Edgar, R. C. (2016). SINTAX: a simple non-Bayesian taxonomy classifier for 16S and ITS sequences. *bioRxiv*, 074161. <https://doi.org/10.1101/074161>
 11. Jeske, J. T., & Gallert, C. (2022). Microbiome Analysis via OTU and ASV-Based Pipelines—A Comparative Interpretation of Ecological Data in WWTP Systems. *Bioengineering*, 9(4), 146. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9040146>
 12. Joos, L., Beirinckx, S., Haegeman, A., Debode, J., Vandecasteele, B., Baeyen, S., et al., (2020). Daring to be differential: metabarcoding analysis of soil and plant-related microbial communities using amplicon sequence variants and operational taxonomical units. *BMC genomics*, 21(1), 1-17. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07126-4>
 13. Kaashyap, M., Cohen, M., & Mantri, N. (2021). Microbial diversity and characteristics of kombucha as revealed by metagenomic and physicochemical analysis. *Nutrients*, 13(12), 4446. <https://doi.org/10.3390/nu13124446>
 14. Kruk, M., Trzaskowska, M., Ścibisz, I., & Pokorski, P. (2021). Application of the “scooby” and kombucha tea for the production of fermented milk drinks. *Microorganisms*, 9(1), 123. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010123>
 15. Landis, E. A., Fogarty, E., Edwards, J. C., Popa, O., Eren, A. M., & Wolfe, B. E. (2022). Microbial diversity and interaction specificity in kombucha tea fermentations. *Msystems*, 7(3), e00157-22. <https://doi.org/10.1128/msystems.00157-22>
 16. Lima, M. S., Ferreira, E. T. J., de Souza, M. E. A. O., Pereira, G. E. and Fedrigo, I. M. T. (2022). Artificial neural network: a powerful tool in associating phenolic compounds with antioxidant activity of grape juices. *Food Analytical Methods*, 15. 527–540. <https://doi.org/10.1007/s12161-021-02144-8>
 17. Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2014). Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food microbiology*, 38, 171-178. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.003>
 18. Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. journal*, 17(1), 10-12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
 19. Martins, H. F., Santos, L. T. S. O. de., Carvalho, G. B. M., Martinez, E. A. Kombucha: a literature review. *Cuadernos de Educacion y Desarrollo*. Europub. 2023. <https://doi.org/10.55905/cuadv15n10-065>
 20. Massoud, R., Jafari-Dastjerdeh, R., Naghavi, N., & Khosravi-Darani, K. (2022). All aspects of antioxidant properties of kombucha drink. *Biointerface Res. Appl. Chem*, 12, 4018- 4027.

<https://doi.org/10.33263/BRIAC123.40184027>

21. Mendelson, C., Sparkes, S., Merenstein, D. J., Christensen, C., Sharma, V., Desale, S., Auchtung, J. M., Kok, C. R., Hallen-Adams, H. E. and Hutkins, R. (2023). Kombucha tea as an anti-hyperglycemic agent in humans with diabetes—a randomized controlled pilot investigation. *Frontiers in Nutrition*, 10, p.1190248. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1190248>
22. Miranda, J. F., Ruiz, L. F., Silva, C. B., Uekane, T. M., Silva, K. A., Gonzalez, A. G. M., Fernandes, F. F. & Lima, A. R. (2022). Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. *Journal of food science*, 87(2), 503-527. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16029>
23. Oliveira, Í. A. C. L. D., Rolim, V. A. D. O., Gaspar, R. P. L., Rossini, D. Q., de Souza, R., & Bogsan, C. S. B. (2022). The technological perspectives of kombucha and its implications for production. *Fermentation*, 8(4), 185. <https://doi.org/10.3390/fermentation8040185>
24. Padilha, C. V. S., Miskinis, G. A., de Souza, M. E. A. O., Pereira, G. E., de Oliveira, D., Bordignon-Luiz, M. T. and dos Santos Lima, M. (2017). Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. *Food chemistry*, 228, 106-115. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.137>
25. Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. and Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, 41(D1), pp. D590-D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
26. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2018.
27. Rognes, T., Flourie, T., Nichols, B., Quince, C. and Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, p.e2584. <https://doi.org/10.5445/IR/1000062113>
28. Smith, D. P., & Peay, K. G. (2014). Sequence depth, not PCR replication, improves ecological inference from next generation DNA sequencing. *PloS one*, 9(2), e90234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090234>
29. Suciati, F.; nurliyanj; Indratningsih. Physicochemical, Microbiological and Sensory Properties of Fermented Whey using Kombucha Inoculum. *Buletin Peternakan* 43 (1): 52-

57, February 2019.

30. Tu, C., Yu, T., Feng, S., Xu, N., Massawe, A., Shui, S. and Zhang, B., 2024. Dynamics of microbial communities, flavor, and physicochemical properties of kombucha-fermented *Sargassum fusiforme* beverage during fermentation. *LWT*, 192, p.115729. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.115729>
31. Venegas, C. A., Saona, L. A., Urbina, K., Quintrel, P., Peña, T. A., Mardones, W., & Cubillos, F. A. (2023). Addition of *Saccharomyces eubayanus* to SCOBY fermentations modulates the chemical and volatile compound profiles in kombucha. *Food Microbiology*, 116, 104357. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104357>
32. Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J. P., & Taillandier, P. (2018). Understanding kombucha tea fermentation: a review. *Journal of food science*, 83(3), 580-588. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>

CAPÍTULO 6

Viabilidade econômica da produção de kombucha com xarope de guaraná e mel de abelha

Economic viability of the production of kombucha with guarana syrup and bee honey

Viabilidade econômica da produção de kombucha com xarope de guaraná e mel de abelha

Viabilidad económica de la producción de kombucha con jarabe de guaraná y miel de abeja

DOI: 10.55905/oelv22n10-250

09/20/2024 EN

Acceptance for publication: 10/11/2024

Hevelynn Franco Martins

PhD candidate from the Graduate Program in Biotechnology

Institution: Universidade Estadual de Feira de Santa

Address: Feira de Santana, Bahia, Brazil

E-mail: hevelynn_martins@hotmail.com

Leila Thaise Santana de Oliveira Santos

PhD in Biotechnology

Institution: Centro Universitário Nobre (UNIFAN)

Address: Feira de Santana, Bahia, Brazil

E-mail: leilathaise@yahoo.com.br

Giovani Brandão Mafra de Carvalho

Doctor in Industrial Biotechnology

Institution: Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

Address: Feira de Santana, Bahia, Brazil

Email: brandao.phd@gmail.com

Ernesto Acosta Martinez

Doctor in Industrial Biotechnology

Institution: Department of Technology, Post-Graduation Program in Biotechnology at the Universidade Estadual de Feira de Santana

Address: Feira de Santana, Bahia, Brazil

E-mail: ernesto.amartinez@uefs.br

ABSTRACT

The objective of this study is to evaluate the technical and economic feasibility of producing kombucha sweetened with honey and supplemented with guarana syrup in a micro-industry located in Feira de Santana, Bahia. The analysis included the estimation of fixed and variable costs, the initial investment and the calculation of economic

indicators such as the Net Present Value (NPV), the Internal Rate of Return (IRR) and the payback period. The results indicated that the initial investment required to implement the micro industry would be R\$221,700.00, with a unit production cost of R\$4.77 per 500 mL bottle and a profit of 50% per unit sold. The estimated monthly production was 10,000 bottles, with a minimum sale of 5,000 products, at a sales price of R\$16.00 per unit, resulting in an annual revenue of up to R\$1,920,000. The calculated NPV was positive, at R\$ 39,906, and the IRR was 21%, higher than the minimum attractive rate of 18%. The simple payback was estimated at 4 years, while the discounted payback was 7.5 years. It is concluded that the kombucha production with regional ingredients is economically viable, representing a promising opportunity for family farming and micro-industries seeking to add value to the healthy beverage market.

Keywords: Fermented Beverages, Honey, Scoby, Internal Rate of Return, Net Present Value.

RESUMO

O objetivo deste estudo é avaliar a viabilidade técnica e econômica da produção de kombucha adoçada com mel de abelha e suplementada com xarope de guaraná em uma microindústria localizada em Feira de Santana, Bahia. A análise incluiu a estimativa de custos fixos e variáveis, o investimento inicial e o cálculo de indicadores econômicos como o Valor Presente Líquido (VPL), a Taxa Interna de Retorno (TIR) e o período de retorno do investimento (payback). Os resultados indicaram que o investimento inicial necessário para a implantação da microindústria será de R\$ 221.700,00 com um custo de produção unitário de R\$ 4,77 por garrafa de 500 mL e lucro de 50% por unidade vendida. A produção mensal estimada foi de 10.000 garrafas, com venda mínima de 5.000 produtos, a um preço de venda de R\$ 16,00 por unidade, resultando em um faturamento anual de até R\$ 1.920.000. O VPL calculado foi positivo, no valor de R\$ 39.906, e a TIR foi de 21%, superior à taxa mínima de atratividade de 18%. O payback simples foi estimado em 4 anos, enquanto o payback descontado foi de 7,5 anos. Conclui-se que a produção de kombucha com ingredientes regionais é economicamente viável, representando uma oportunidade promissora para a agricultura familiar e microindústrias que buscam agregar valor ao mercado de bebidas saudáveis.

Palavras-chave: Bebidas Fermentadas, Mel de Abelha, Scoby, Taxa Interna de Retorno, Valor Presente Líquido.

RESUMEN

El objetivo de este estudio es evaluar la viabilidad técnica y económica de producir kombucha endulzada con miel de abeja y suplementada con jarabe de guaraná en una microindustria ubicada en Feira de Santana, Bahía. El análisis incluyó la estimación de costos fijos y variables, la inversión inicial y el cálculo de indicadores económicos como el Valor Actual Neto (VAN), la Tasa Interna de Retorno (TIR) y el período de recuperación. Los resultados indicaron que la inversión inicial necesaria para implementar la microindustria será de R\$ 221.700,00 con un costo unitario de producción de R\$ 4,77 por botella de 500 mL y una ganancia del 50% por unidad vendida. La

producción mensual estimada fue de 10.000 botellas, con una venta mínima de 5.000 productos, a un precio de venta de R\$ 16,00 por unidad, resultando en ingresos anuales de hasta R\$ 1.920.000. El VPN calculado fue positivo, valorado en R\$ 39.906, y la TIR fue del 21%, superior a la tasa mínima de atractivo del 18%. La recuperación simple se estimó en 4 años, mientras que la recuperación descontada fue de 7,5 años. Se concluye que la producción de kombucha con ingredientes regionales es económicamente viable, representando una oportunidad prometedora para la agricultura familiar y las microindustrias que buscan agregar valor al mercado de bebidas saludables.

Palabras clave: Bebidas Fermentadas, Miel de Abeja, Scoby, Tasa Interna de Retorno, Valor Actual Neto.

1 INTRODUCTION

In recent years, the demand for food and beverages that deliver health benefits has grown substantially, driven by more wellbeing-conscious consumers. A prominent example in this scenario is kombucha, a fermented beverage originating in China, produced from the fermentation of tea sweetened by symbiotic cultures of bacteria and yeasts - SCOBY (Laavany *et al.*, 2021; Ofer; Alistar, 2023). Kombucha is appreciated not only for its unique flavor, but also for its functional properties, such as probiotic, antioxidant and anti-inflammatory effects, which have been associated with improved digestion and strengthening of the immune system (Antolak *et al.*, 2023; Damin *et al.*, 2021).

The growing popularity of kombucha in the Brazilian market, along with the search for alternatives that add value to regional products, raises questions as to the economic viability of its large-scale production, especially with the use of local ingredients (Cavalcante, 2019; Damin *et al.*, 2021; Martins *et al.*, 2023). In this context, the incorporation of ingredients such as bee honey and guarana syrup, which have strong cultural appeal and economic value, represents an opportunity not only to diversify the beverage portfolio, but also to strengthen the local economy and add nutritional value to the product (Martins *et al.*, 2024).

The economic viability of a venture depends on a number of factors involving the calculation of production costs, market analysis and financial projections, such as the net

present value (NPV), internal rate of return (IRR) and payback period (Araújo *et al.*, 2021; Marquezan; Brondani, 2006). Therefore, an economic-financial feasibility study is essential to assess whether a project is worth the investment, assisting in strategic decision-making (Gallina, *et al.* 2017; Cavalcante, 2019). These indicators are key to determining the attractiveness of the project and ensuring that financial resources are allocated in an efficient and sustainable manner.

In view of this, the present study aims to evaluate the technical and economic viability of the production of kombucha sweetened with bee honey and supplemented with guarana syrup, considering the economic and sensory impacts of this formulation. The financial viability analysis included the calculation of key indicators such as NPV and IRR, as well as the analysis of fixed and variable costs for production in a micro-industry. The proposed approach aims to provide subsidies for the sustainable development of kombucha production with regional ingredients, highlighting the economic and technical advantages of this innovation.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 PLACE OF STUDY, RAW MATERIALS AND INPUTS

The study was conducted with a view to the installation of a microbeverage industry located in Feira de Santana, Bahia, Brazil. All calculations were made based on market values of structures (industrial shed), equipment, utensils and raw materials available in Feira de Santana. The physical structure used included an industrial shed with specific sectors for production, labeling, storage and quality control. The study sought to meet the minimum requirements of Decree No. 6871 of June 4, 2009, which regulates Law No. 8918 of July 14, 1994, which provides on standardization, classification, registration, inspection, standardization and inspection of beverages (Brazil, 2009).

The main raw materials considered were mineral water, bee honey, Camellia tea (*Camellia sinensis*), guarana syrup and the symbiotic bacterial and yeast culture (SCOBY). The values of the inputs were purchased from local suppliers. Quantities and

costs of inputs were recorded for the calculation of the total cost of production. For the filling of the fermented beverage, the use of 500 mL glass bottles was considered, along with caps and printed labels.

2.2 STAGES IN THE PRODUCTION OF KOMBUCHA

The production process of the kombucha was divided into two fermentations. The first stage took place under aerobic conditions, in which bacteria and yeasts metabolize the sugar present in honey and guarana syrup, converting it into organic acids and carbon dioxide. After 12 days of fermentation at 25°C, the kombucha is transferred into bottles and submitted to a second anaerobic fermentation for 3 days at room temperature (second stage), resulting in the natural carbonation of the drink.

2.3 ECONOMIC VIABILITY ANALYSIS

2.3.1 Fixed and variable costs

Fixed costs were calculated on the basis of constant monthly expenses such as rent, salaries, expenses with accounting services and bank fees. These costs do not vary with the production volume and were recorded for a period of 12 months using market values for the calculation. Variable costs, which depend directly on the production volume, included inputs such as honey, water, guarana syrup and filling materials. To calculate variable costs, it was estimated that 10,000 bottles were produced per month, and costs per bottle were recorded.

2.3.2 Initial investment

The initial investment necessary for the implementation of microindustry was recorded, including the cost of industrial equipment, space reform, laboratory materials and working capital. That value was used to calculate the cash flow over the 10-year period. The investment calculation also took into account the depreciation of equipment over time, using an average life of 10 years for the main items.

2.3.3 Determination of economic indicators

The main economic viability indicators used were net present value (NPV), internal rate of return (IRR) and payback period. For the calculation of those indicators, a spreadsheet was used in Excel, where data on revenue, expenditure and cash flow were entered.

The NAV was calculated by adding up the projected cash flows over 10 years, discounted at a minimum attractiveness rate (MRR) of 18%. The formula used was:

$$VPL = \sum_{j=1}^n \frac{FC_j}{(1 + TMA)^j}$$

Where

FC it's the cash flow, TMA it's the minimum attractiveness rate, j it's the period of each flow, and n it's the period of time.

The IRR has been determined on the basis of the following formula:

$$\sum_{i=1}^n \frac{FC_i}{(1 + TIR)^i} - I_0 = 0$$

Where: FC it's the cash flow, TIR it's the internal rate of return, n it's the final period of the investment, and I_0 it's the initial investment.

The simple payback was calculated by dividing the value of the initial investment by the expected annual gain from production. For the discounted payback, the same formula was used, but adjusting the annual gains to the present value, using the TMA of 18%.

2.3.4 Cash flow and risk analysis

The cash flow was designed considering annual revenues and expenses, with a monthly production of 10,000 bottles of kombucha. The annual revenue was calculated based on the sales price of R\$ 16.00 per bottle, estimating a gross income of R\$ 1,920,000.00 per year. Fixed and variable costs were subtracted to determine operating profit before tax. Also incorporated was the depreciation analysis of the equipment and the payment of the bank loan, with interest of 2.5% a month.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 INITIAL INVESTMENT COST

The initial investment required for the implementation of the kombucha microindustry was estimated at R\$ 221,700.00, as shown in Table 1. This figure covers a series of items essential for the operation of micro-industry, including the rental of the shed, the reform of the industrial space, the acquisition of equipment and industrial and administrative installations, besides the development of the brand and working capital. It is important to point out that the working capital of R\$ 60,000.00 was incorporated into the cash flow to ensure the maintenance of operations in the first two months, a period in which there is still no generation of revenues.

Table 1. Initial investment for the implementation of the kombucha microindustry in Feira de Santana, BA.

Installation/Equipment/utensil	Value (R\$)
Shed rental	6 000.00
Reform of the industrial space	15 000.00
Industrial Equipment and Installations	100 000.00
Administrative Facilities and Equipment	15 000.00
Brand Development	4 000.00
Personal Protective Equipment (PPE)	700.00
Laboratory materials	18 000.00
Opening up the business	3 000.00
Working capital	60 000.00
Total	221 700.00

Source: The Authors (2024)

The acquisition of industrial equipment, which represented one of the largest parts of the initial investment (R\$ 100,000.00), is fundamental for guaranteeing the production of kombucha on a large scale. Furthermore, the cost of the industrial space reform (R\$ 15,000.00) was necessary to adapt the shed to the sanitary and regulatory requirements, as provided for in Decree 6,871/2009 (Brazil, 2009). This adequacy is essential to ensure that micro-industry operates in accordance with legal standards, avoiding penalties and guaranteeing the final quality of the product.

Another relevant aspect of the initial investment was the need for a bank loan, with an interest rate of 2.5% per month. This funding resulted in a monthly installment of R\$1,893.68 over 120 months, which directly impacts the company's cash flow. Such a scenario requires rigorous financial planning to ensure that the company has the ability to honor the monthly payments of the funding without compromising the long-term financial health of the venture. As pointed out by Gallina *et al.* (2017), efficient management of financial resources and constant monitoring of costs and expenditures are key to the success of micro-industries in this sector.

3.2 FIXED COSTS

The fixed costs of the micro-industry add up to R\$ 29,700.00 a month and represent a significant part of the operational expenses. These costs do not vary depending on the level of production, which means that the company will have to bear them regardless of whether they sell 1,000 or 10,000 bottles of kombucha. This rigidity in costs is a challenge that can impact the profit margin, especially in periods of low demand or falling sales.

Fixed costs were divided into two main categories: staff costs and asset costs. The cost of personnel, which includes salaries and charges, was estimated at R\$ 21,610.53 per month, as described in Table 2. The minimum staff necessary for the operation of the micro-industry is composed of a food engineer (R\$ 10,360.44 monthly), a food technician (R\$ 5,180.55), a technical assistant (R\$ 3,034.77) and an auxiliary of general services (R\$ 3,034.77). The hiring of this team aims to guarantee the quality and safety of the product, since kombucha is a fermented beverage and, as such, demands strict quality controls throughout the whole production process.

Table 2. Monthly personnel costs in the kombucha microindustry in Feira de Santana, BA.

Returns TRUE on success or FALSE on failure.	Quantity	Basic salary (R\$)	Charges (R\$)	Total (R\$)
Food Engineer	1.	5 000.00	5 360.44	10,360.44
Food Technician	1.	2 500.00	2 680.55	5 180.55
Technical Assistant	1.	1 412.00	1 622.77	3 034.77
General Services	1.	1 412.00	1 622.77	3 034.77
Total				21 610.53

Source: The Authors (2024)

In addition to personnel costs, asset costs, which include rent (R\$ 6,000.00), accountant (R\$ 1,500.00) and bank fees, add up to R\$ 11,038.70 per month (Table 3). In the long term, these costs can be diluted as production and sales increase, which improves the company's profitability.

Table 3. Monthly costs for heritage and consumables in the kombucha micro-industry in Feira de Santana, BA.

Returns TRUE on success or FALSE on failure.	Quantity	Total (R\$)
Rent	1.	6 000.00
Loan tranche	1.	1 893.68
Computer System	1.	500.00
Counter	1.	1 500.00
Bank Charges	1.	95.00
Internet	1.	250.00
Cleaning and Office Supplies	1.	800.00
Total		11,038.70

Source: The Authors (2024)

3.3 VARIABLE COSTS

The variable costs, directly related to the production volume, were estimated for a monthly production of 10,000 bottles of kombucha. Among the main inputs used in the production are honey, mineral water, camellia tea, guarana syrup and SCOBY, as detailed in Table 4. The total monthly cost with inputs was R\$ 78,575.50.

Table 4. Variable direct costs related to the monthly production of kombucha.

Returns TRUE on success or FALSE on failure.	Unit	Quantity	Unit value (R\$)	Total amount (R\$)
Honey	Kg	250	35.00	8 700.00
Mineral water	L	10,000	1.00	10 000.00
<i>Camélia sinensis</i> tea	Kg	25	2.	50.00
Subtotal - 1 step: characterization of raw materials				18 750.00
Guarana syrup	L	250	10.00	2 500.00
<i>Scoby</i>	Kg	450	2.	1 125.00
Cloth with rubber	m	10,000	0.20	2 000.00
Refractometer	M	1.	5 000.00	5 000.00
Countertop Ph	M	1.	5 000.00	5 000.00
Distiller	M	1.	8 000.00	8 000.00
Subtotal - 2 step: fermentation and basic analyzes				23 625.50
Bottles	Units	10,000	2.	20 000.00
Caps	Units	10,000	0.10	1 000.00
Labels	Units	10,000	0.50	5 000.00
Subtotal - 3 step: packaging and labeling				26 000.00
Electrical power	KW.h	7,200	0.80	5700.00

Water in the process	m ³	100	45.00	4500.00
Subtotal - Other variable costs				10 200.00
Grand Total				78 575.70

Source: The Authors (2024)

Analysis of these costs shows that inputs, particularly honey (R\$8,700) and mineral water (R\$10,000), account for the largest share of variable costs. Bee honey, for example, is a high added value input that contributes to the sensory and nutritional appeal of kombucha, but also significantly increases the production cost. An alternative would be to negotiate the purchase of the honey with local producers, provided that they supply the raw material in accordance with the prerequisites established by Brazilian legislation for the quality of the honey. Thus, in accordance with Decree-Law No 214/2003 of 18 September, honey is defined as ‘the natural sugary substance produced by bees of the species *Apis mellifera* from the nectar of plants or from secretions from living parts of plants or from excretions of plant-sucking insects on living parts of plants, which bees collect, process in combination with specific substances of their own, deposit, dehydrate, store and leave to mature in honeycombs of the hive’.

The properties of honey are assessed using parameters laid down in the *Codex Alimentarius* Standard (Anonymous, 2001) and in Decree-Law 214/2003 of 18 September, and include pH, water content, reducing sugar content, sucrose content, water insoluble matter content, mineral content, electrical conductivity, ash content, acidity, hydroxymethylfurfural (HMF) content and diastase content.

In this sense, efficient negotiation with suppliers becomes crucial to ensure the profitability of the enterprise. As noted by Cavalcante (2019), an effective buying and trading strategy can reduce input costs, increasing the competitiveness of the micro-industry in the market.

Another important point to be considered is the seasonality of the inputs, especially of bee honey, which can have its price and availability impacted by seasonal and climatic variations. This can lead to fluctuations in production costs and consequently in profit margin, requiring the company to manage inventory efficiently and possibly diversify suppliers.

Table 5, refers to the National Simple, which is a shared tax collection, collection and enforcement regime applicable to Micro and Small Enterprises, provided for in Complementary Law No. 123, of December 14, 2006.

Table 5. Tax collection applicable to Micro and Small Enterprises

Returns TRUE on success or FALSE on failure.	Aliquot	Base	Total
National Simple	4.5%	160 000.00	7 200.00
Freight	5%	160 000.00	8 000.00
Total			15 200.00

Source: The Authors (2024)

3.4 PRICING AND NET PROFIT

Based on fixed and variable costs, the unit cost of production was estimated at R\$ 4.77 per 500 mL bottle. Considering the sales price of R \$ 16,00 per bottle, the expected monthly revenue is up to R \$ 160,000,00, estimating the minimum sale of 5.000 units and maximum of 10.000 units of kombucha a month. After deducting fixed, variable and other costs, such as taxes and freight, the monthly net profit was calculated at R \$ 33.575,20.

In Table 6, based on the estimate of production of 10,000 units of the beverage per month and minimum sale of 5,000 units per month, the price set for marketing kombucha is R\$16.00. According to research carried out in supermarkets in the state of Bahia, the price of a 500 mL bottle of kombucha varies from R\$ 15.00 to R\$ 29.90.

Table 6. Unit value of kombucha

Returns TRUE on success or FALSE on failure.	R\$	Per bottle R\$
Fixed cost	32 649.23	3.26
Variable Cost	78 575.50	1.51
Profit (50%)	47 700.00	4.77
Final product price		9.54

Source: The Authors (2024)

The net profit margin of approximately 50% is a positive indicator of the economic viability of the project, provided that the planned sales volume is reached. However, it is important to point out that maintaining this level of profitability depends

on external factors, such as market conditions and the efficiency in the management of production costs.

3.5 CASH FLOW

The cash flow was projected for a period of 10 years, considering annual revenues of R\$ 1,920,000.00 coming from the sale of 5,000 bottles of kombucha per month. In the first year, the net cash flow was negative at R\$ 221,700.00 due to the high initial investment. However, from the second year onwards, the cash flow stabilizes, reaching a positive value of R\$ 1,724,815.27. This positive behavior was maintained in the subsequent years, as shown in Table 7.

This scenario shows that, although the initial investment is substantial, the project has the potential to become profitable from the second year onwards, which enhances its economic viability. However, the ability to maintain a positive long-term cash flow is directly related to maintaining a constant demand and to the efficiency in managing costs and revenues.

Table 7. Cash flow projection for the kombucha microindustry over 10 years.

Item (R\$)	Year 0	Year 1	Year 2	Year 3	Year 4	Year 5	Year 6	Year 7	Year 8	Year 9	Year 10
Revenue	-	1 920 000.0	1 920 000.0	1 920 000.0	1 920 000.0	1 920 000.0	1 920 000.0	1 920 000.0	1 920 000.0	1 920 000.0	1 920 000.0
Fixed and variable costs	-	141 009.2	141 009.2	141 009.2	141 009.2	141 009.2	141 009.2	141 009.2	141 009.2	141 009.2	141 009.2
Depreciation	-	650.0	650.0	650.0	650.0	650.0	650.0	650.0	650.0	650.0	650.0
Interest	-	542.5	542.5	542.5	542.5	542.5	542.5	542.5	542.5	542.5	542.5
Taxable profit	-	1 767 346.2	1 767 346.2	1 767 346.2	1 767 346.2	1 767 346.2	1 767 346.2	1 767 346.2	1 767 346.2	1 767 346.2	1 767 346.2
Income tax	-	40 000.0	40 000.0	40 000.0	40 000.0	40 000.0	40 000.0	40 000.0	40 000.0	40 000.0	40 000.0

	221										
	700.0	11,03	11,03	11,03	11,03	11,03	11,03	11,03	11,03	11,03	11,03
Net flow	0	8.71	8.70	8.70	8.70	8.70	8.70	8.70	8.70	8.70	8.70
	-221			15	15	15	15	15	15	15	15
Discounted	700.0			000.0	000.0	000.0	000.0	000.0	000.0	000.0	000.0
Flow	0	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0
	221										
	700.0										
Investment	0										
	-221	1 724	1 503	1 281	1 059	838		394	172	-48	-172
Net cash	700.0	815.2	115.2	415.2	715.2	015.2	616,3	615.2	915.2	784.7	915.2
flow	0	7	7	7	7	7	15.27	7	7	3	7

Source: The Authors (2024)

3.6 DETERMINATION OF ECONOMIC INDICATORS

The main economic feasibility indicators were Net Present Value (NPV), Internal Rate of Return (IRR) and Payback, as shown in Table 8. The NPV was positive, corresponding to R\$ 39,906.00, indicating that the project is economically viable and that the initial investment will be recovered over time. The IRR was 21%, which is significantly higher than the Minimum Attractiveness Rate (MBA) of 18%, reinforcing the attractiveness of the enterprise.

Table 8. Economic project viability indicators (VPL, TIR and Payback) for the production of kombucha by a micro company in Feira de Santana, BA.

Item	Value
NAV (18%)	R\$39,906.00
IRR (21%)	R\$46,557.00
Simple Payback	4 years
Discounted payback	7.5 years

Source: The Authors (2024)

Simple Payback was estimated at 4 years, while Discounted Payback was 7.5 years. These results demonstrate that despite the high initial investment, the project shows a relatively fast return, making it attractive to investors. Recent studies, such as that of Behera *et al.* (2022), corroborate the viability of kombucha production-related ventures, highlighting the potential for financial return and the importance of efficient cost and operation management to ensure long-term sustainability.

4 CONCLUSION

Based on the economic and technical analysis carried out, the production of kombucha sweetened with bee honey and supplemented with guarana syrup is shown to be viable. The project requires a significant initial investment, but presents a satisfactory return, with a positive Net Present Value (NPV) of R\$ 39,906 and an Internal Rate of Return (IRR) of 21%, which indicates the economic attractiveness of the enterprise. The use of local ingredients, such as bee honey and guarana syrup, contributes to adding value to the product by offering a viable alternative for diversifying production in micro-industries. These results indicate that, with adequate planning, the project can be financially sustainable and contribute to regional development.

THANKS

We thank the Graduate Program in Biotechnology (PPGBiotec) of the State University of Feira de Santana (UEFS).

FINANCING

This work was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel - Brazil (CAPES), Financial Code - 001.

REFERENCES

- ANONYMOUS. Codex Standard for Honey (Codex Stan 12-1981 (Rev. 2-2001). Codex Alimentarius, 2001.
- ANTOLAK, H., PIECHOTA, D., & KUCHARSKA, A. Kombucha tea—A double power of bioactive compounds from tea and symbiotic culture of bacteria and yeasts (SCOBY). **Antioxidants**, v. 10, para. 10, p. 1541, 2021
- ARAÚJO, G.S., SOUZA, S.M.A., CARVALHO, G.B.M., & MARTÍNEZ, E.A. Economic and financial viability of a mead-producing micro-industry. **Interface Tecnológica**, v. 18, n.1, p. 402-415, 2021.
- BEHERA, B., LAAVANYA, D., & BALASUBRAMANIAN, P. Techno-economic feasibility assessment of bacterial cellulose biofilm production during the Kombucha fermentation process. **Bioresource Technology**, v. 346, p. 126659, 2022.
- BRAZIL. Ministry of Agriculture and Supply. Decree-Law No 214/2003 of 18 September 2003. Diário da República. The 1ª Series A. transposes into national law Council Directive 2001/110/EC of 20 December 2001 relating to honey. Available at: <<https://dre.pt/pesquisa/-/search/497270/details/maximized>>. Retrieved 21 January 2019.
- BRAZIL. Decree No 6871 of 4 June 2009. It regulates law n.8918 of July 14, 1994, which provides for standardization, classification, registration, inspection, standardization and inspection of beverages. **Official Gazette of the Federative Republic of Brazil**, Brasília, p.20, 5 June 2009.
- CAVALCANTE, L. S. **Analysis of the economic and financial impacts on the deployment of an automated process: a case study in a Kombucha Factory**. 2019. Monography (Bachelor of Accounting Sciences) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2019.
- DAMIN, B. I. S., GAMBA, V., DETTMER, A., & COLLA, L. M. The Kombucha phenomenon: production aspects, health benefits, and food safety issues Kombucha phenomenon: production aspects, health benefits, and food safety aspects. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, p. 75548-75566, 2021.
- GALLINA, D. A., GOMES, R. A., VIEIRA, M. C., CAVICHIOLO, J. R., & MARINI, T. Economic viability of the industrial production of symbiotic fermented beverage smoothie with fruit pulp, in the metropolitan regions of campinas and São Paulo, state of São Paulo, period between October and December 2016. **Economic Information**, see 47, para. 2, 2017.
- LAAVANYA, D., SHIRKOLE, S., & BALASUBRAMANIAN, P. Current challenges, applications and future perspectives of SCOBY cellulose of Kombucha fermentation. **Journal of Cleaner Production**, v. 295, p. 126454, 2021.



MARQUEZAN, L. H. F., & BRONDANI, G. Investment Analysis. **Revista Eletrônica de Accounting**, v. 3, para. 35-35, 2006.

MARTINS, H. F., DE OLIVEIRA SANTOS, L. T. S., DE CARVALHO, G. B. M., & MARTINEZ, E. A. Kombucha: a literature review. **Cuadernos de Educación y Desarrollo**, v. 15, para. 10, p. 11175-11197, 2023.

MARTINS, H. F., SANTOS, L. T. S. DE O., CARVALHO, G. B. M. DE, LIMA, R. P. DE, LIMA, M. DOS S., ARAÚJO, A. J. DE B., & MARTINEZ, E. A. Physical and chemical quality of black tea kombuchas sweetened with bee honey and guarana syrup. **In Annals of the 15th SLACAN - Latin American Symposium on Food Science and Nutrition**, ISBN: 978-65-89463-70-2, 2024.

OFER, N., & ALISTAR, M. Felt experiences with Kombucha Scoby: Exploring first-person perspectives with living matter. In: **Proceedings of the 2023 CHI Conference on Human Fact**, 2023.

CONCLUSÃO GERAL

A análise de patentes registrada neste estudo, indica que a kombucha é uma área de crescente interesse tecnológico, com a China dominando os depósitos de patentes. Especialmente, as kombuchas a base de chás verde e preto com mel de abelha ou xarope de guaraná, representa uma área promissora para inovações tecnológicas e desenvolvimento de novos produtos funcionais no mercado brasileiro e global. As diversas aplicações e benefícios potenciais destas bebidas sugerem um amplo campo para futuras inovações e pesquisas.

O tipo de adoçante utilizado para preparar a kombucha e o tempo de fermentação influenciam significativamente sua composição físico-química. A kombucha com xarope de guaraná apresentou maior consumo de carboidratos e teores de álcool (>0,5%) e ácidos cítrico e tartárico. Por outro lado, as kombuchas com mel de abelha e açúcar cristal, mantiveram níveis de álcool abaixo do limite legal para bebidas não alcoólicas. As concentrações de ácidos acético, cítrico e tartárico apresentaram variações significativas de acordo com o tipo de adoçante utilizado. Tempos de fermentação mais longos melhoram a qualidade da kombucha por meio do acúmulo mais significativo de maltose e ácidos acético e málico. Ao mesmo tempo, os níveis de frutose ainda são altos na kombucha adoçada com mel.

A escolha do tipo de chá e do adoçante influencia significativamente o crescimento do *Scoby*, a composição fenólica e a atividade antioxidante da kombucha. O chá verde promoveu maior preservação de compostos bioativos, como epicatequina galato e epigallocatequina galato, enquanto o chá preto, especialmente em combinação com mel de abelha e xarope de guaraná, favoreceu a formação de procianidinas.

A atividade antioxidante foi mais elevada nas bebidas com chá verde, reforçando seu potencial na formulação de bebidas funcionais com alto poder antioxidante.

A fermentação modulou a conversão e degradação dos compostos fenólicos ao longo do tempo, evidenciando que a interação entre os substratos e a microbiota presente no *Scoby* desempenha um papel essencial na qualidade final da bebida. O crescimento do *Scoby* filha foi maior nas kombuchas com mel de abelha e xarope de guaraná, sugerindo que essas fontes de açúcares naturais podem fornecer substratos adicionais para a proliferação microbiana e a formação da matriz celulósica.

Dessa forma, este estudo reforça a importância da formulação adequada da kombucha para otimizar sua composição bioativa e funcionalidade. Os achados fornecem insights valiosos para a indústria de bebidas fermentadas, permitindo o desenvolvimento de produtos com maior

estabilidade antioxidante e benefícios à saúde. Pesquisas futuras podem explorar a interação entre diferentes tempos de fermentação e a microbiota do *Scoby*, bem como os impactos sensoriais das formulações para ampliar a aplicabilidade comercial da kombucha.

As combinações de chás, açúcares e tempo de fermentação influenciam, também, na composição microbiana das kombuchas. A escolha do método de identificação microbiana é crucial, pois influencia significativamente a percepção da diversidade e abundância microbiana. A composição microbiana, dominada por cepas de *Komagataeibacter*, mostrou-se altamente sensível às condições de fermentação. A presença de *K. saccharivorans* e *K. xylinus* revelou-se essencial na determinação da qualidade da kombucha, com implicações na produção de ácidos orgânicos, como o ácido acético.

Com base na análise econômica e técnica realizada, a produção de kombucha com mel de abelha e com xarope de guaraná mostra-se viável. O projeto exige um investimento inicial significativo, mas apresenta um retorno satisfatório, com um Valor Presente Líquido (VPL) positivo de R\$ 39.906 e uma Taxa Interna de Retorno (TIR) de 21%, o que indica a atratividade econômica do empreendimento. A utilização de ingredientes locais, como mel de abelha e xarope de guaraná, contribui para agregar valor ao produto, oferecendo uma alternativa viável para a diversificação da produção em microindústrias. Esses resultados indicam que, com planejamento adequado, o projeto pode ser financeiramente sustentável e contribuir para o desenvolvimento regional.

Portanto, as descobertas deste estudo podem orientar produtores de kombucha na elaboração de bebidas com perfis sensoriais e nutricionais específicos, além de abrir caminhos para futuras pesquisas que explorem ainda mais as possibilidades de personalização da kombucha, desenvolvimento de novos produtos com a bebida e os Scobys originados após as fermentações, bem como a exploração de seus benefícios para a saúde.