

KOMBUCHA E SUAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS: OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES IDEAIS DO PROCESSO FERMENTATIVO

RESUMO

A Kombucha é uma bebida funcional de crescente interesse devido aos seus efeitos benéficos para consumo humano. Visando potencializar as propriedades funcionais dessa bebida, o objetivo do trabalho consistiu em otimizar as condições ideais de fermentação da Kombucha usando planejamento fatorial. Um total de quinze Kombuchas foram preparadas a partir do chá preto, sob diferentes condições de fermentação (4, 8 e 12 g/L de chá; 50, 100 e 150 g/L de açúcar; 20, 25 e 30 °C), durante 12 dias. As condições de fermentação das Kombuchas foram otimizadas visando maximizar a concentração de compostos bioativos e minimizar o teor de cafeína. Sendo assim, a otimização sugere que a fermentação seja realizada a partir de 8,5 g/L de chá preto, 150 g/L de açúcar a 30 °C. Os resultados demonstram que a otimização das condições de fermentação através da metodologia de superfície de resposta foi eficiente para potencializar as propriedades funcionais da Kombucha.

INTRODUÇÃO

O consumidor cada vez mais conhece e demanda por produtos saudáveis, que apresentem características sensoriais agradáveis e que incluam conveniência no consumo (1). A Kombucha consiste em uma bebida funcional de origem milenar asiática, na maioria das vezes gaseificada e ligeiramente doce e ácida (2,3). Obtida a partir da fermentação de *Camellia sinensis* L., por uma colônia simbiótica de diferentes espécies de leveduras e bactérias (SCOBY- *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*) (4,5). Esta bebida apresenta um vasto número de constituintes, sendo a sua funcionalidade atribuída, em especial, aos compostos fenólicos oriundos dos chás. Os compostos fenólicos estão relacionados diretamente à atividade antioxidante da bebida, atuando na inibição de radicais livres no organismo (6). A fermentação agrega os efeitos benéficos do chá com os compostos orgânicos formados, como a produção de ácidos e a presença de microrganismos que podem ser potencialmente probióticos. Os efeitos benéficos no corpo humano relacionados ao consumo da bebida perpassam desde as propriedades antidiabéticas à inibição de bactérias patogênicas (7–9).

OBJETIVO

Otimizar a fermentação da Kombucha visando a obtenção de uma bebida com elevados teores de compostos bioativos. Esse objetivo foi alcançado pela avaliação dos fermentados para otimizar a temperatura de fermentação, concentração de chá (*C. sinensis* L.) e sacarose, resultando em uma bebida com maior teor de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e menor teor de cafeína.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Com o intuito de avaliar e otimizar as condições de fermentação das Kombuchas preparadas a partir de chá preto, foi utilizado o planejamento experimental Box-Behnken (10). O efeito das variáveis independentes concentração de chá (g/L), X_1 , concentração de açúcar (g/L), X_2 , e temperatura (°C), X_3 , com três níveis, foram

avaliados no processo de fermentação conforme Tabela 1. O planejamento resultou em 15 Kombuchas preparadas a partir de cada matéria prima.

Tabela 1: Valores reais e codificados da concentração de chá, açúcar e temperatura de fermentação para obtenção das Kombuchas a partir do planejamento Box Behnken.

| Experimento | Chá (g/L) | Açúcar (g/L) | Temperatura (°C) |
|--------------------|------------------|---------------------|-------------------------|
| K 1 | 4 (-1) | 50 (-1) | 25 (0) |
| K 2 | 12 (1) | 50 (-1) | 25 (0) |
| K 3 | 4 (-1) | 150 (1) | 25 (0) |
| K 4 | 12 (1) | 150 (1) | 25 (0) |
| K 5 | 4 (-1) | 100 (0) | 20 (-1) |
| K 6 | 12 (1) | 100 (0) | 20 (-1) |
| K 7 | 4 (-1) | 100 (0) | 30 (1) |
| K 8 | 12 (1) | 100 (0) | 30 (1) |
| K 9 | 8 (0) | 50 (-1) | 20 (-1) |
| K 10 | 8 (0) | 150 (1) | 20 (-1) |
| K 11 | 8 (0) | 50 (-1) | 30 (1) |
| K 12 | 8 (0) | 150 (1) | 30 (1) |
| K 13 | 8 (0) | 100 (0) | 25 (0) |
| K 14 | 8 (0) | 100 (0) | 25 (0) |
| K 15 | 8 (0) | 100 (0) | 25 (0) |

As concentrações de substratos utilizados apresentaram correlações significativas com os compostos fenólicos totais ($r = 0,92$) e flavonoides totais ($r = 0,69$). As amostras preparadas com maior concentração de chá foram as que apresentaram maior teor médio de compostos fenólicos (986 ± 45 mg GAE/L) e flavonoides ($203,26 \pm 1,88$ mg CAE/L), conforme apresentado na Tabela 2. Resultados similares foram obtidos em relação aos compostos fenólicos com teores de 1120 mg GAE/L em Kombucha preparada com 12 g/L de chá preto e fermentada por 15 dias a 24 °C (11). Condições como espécie, clima e solo, tempo de colheita, parte da planta usada, forma e tempo de processo para obtenção dos chás podem afetar diretamente nos teores de compostos fenólicos e flavonoides totais nas Kombuchas analisadas (1).

Correlações significativas ($p < 0,01$) entre os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante medida por DPPH e ABTS ($r = 0,63$, $r = 0,63$, respectivamente) foram observadas. Resultados similares foram documentados em Kombuchas preparadas a partir de chá preto, que mostraram correlação estatisticamente significativa entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante por DPPH ($r = 0,718$, $p < 0,01$) (12). As propriedades antioxidantes da Kombucha estão relacionadas diretamente com os compostos fenólicos (13).

As Kombuchas preparadas com 12 g/L de chá, 100 g/L de sacarose e fermentadas a 30 °C foram as que apresentaram maior atividade antioxidante. As amostras apresentaram valores médios de 56 ± 15 % de redução para DPPH e de 5572 ± 1742 $\mu\text{mol TE/L}$ para ABTS. A atividade de inibição de radicais livres da Kombucha é uma indicação de seu potencial como uma bebida rica em antioxidantes (8).

Os teores de cafeína nas amostras variaram de 483,71 a 2558,75 mg/L para as Kombuchas preparadas com chá preto. As bebidas fermentadas apresentaram correlações significativas ($p < 0,01$) entre as concentrações de chás e os teores de cafeína ($r = 0,97$). Já em Kombucha preparada com 25 g/L de chá preto e fermentada durante 14 dias a 28 °C, o conteúdo de cafeína foi de 713 mg/L (8), cujo resultado está dentro do intervalo dos resultados encontrados para as bebidas fermentadas neste trabalho.

Através dos resultados das análises, foi possível quantificar o efeito da temperatura de fermentação, concentração de chá e açúcar para obter modelos de predição e a melhor combinação das condições do processo. Um modelo polinomial de segunda ordem foi utilizado para ajustar os dados experimentais (14). Os modelos para predição da concentração de compostos fenólicos totais, flavonoides, atividades antioxidantes e cafeína nas bebidas fermentadas.

O modelo para predição da concentração de fenóis totais na bebida fermentada a base de chá preto é demonstrado na Equação (2). Tal modelo não apresentou falta de ajuste ($p = 0,19$), atingiu o coeficiente de determinação (R^2) de 0,999 possuindo um bom ajuste ao modelo e pode explicar 99,8 % da variância dos dados ajustados para o número de variáveis ($R^2_{adj} = 0,998$). Nota-se que as variáveis que possuem interação positiva na concentração dos compostos fenólicos foram concentração de chá (x_1), concentração de açúcar (x_2), temperatura de fermentação (x_3) e os fatores de concentração de chá e açúcar associados (x_1x_2), bem como coeficiente de regressão quadrática da concentração de chá com a concentração e açúcar ($x_1^2x_2$) e a concentração de açúcar com a temperatura de fermentação (x_2x_3). Já o coeficiente de regressão quadrático da concentração de chá (x_1^2) possui interferência negativa, assim como o coeficiente de regressão quadrático da concentração de açúcar (x_2^2), o coeficiente de regressão quadrático da temperatura de fermentação (x_3^2), a associação do coeficiente de regressão quadrático da concentração de chá com a temperatura de fermentação ($x_1^2x_3$).

$$Y = 834,67 + 220,6 x_1 - 59,96 x_1^2 + 11,50 x_2 - 51,21 x_2^2 + 58,5 x_3 - 66,45 x_3^2 + 12,5x_1x_2 + 17,0 x_1^2x_2 - 93,75 x_1^2x_3 + 21,00 x_2x_3 \quad [2]$$

Para a atividade antioxidante quantificada pelo método de DPPH a falta de ajuste foi significativa ($p < 0,05$), logo esse parâmetro não pode ser enquadrado a um modelo neste trabalho.

A atividade antioxidante pelo método ABTS possui coeficiente de falta de ajuste maior de 0,05 indicando que não é um parâmetro significativo ($p = 0,19$). Obteve-se o coeficiente de determinação (R^2) de 0,999 se ajustando bem ao modelo e pode-se explicar 99,8 % da variância dos dados ajustados para o número de variáveis ($R^2_{adj} = 0,998$). A Equação (3) representa os parâmetros que interferem na atividade antioxidante da bebida. A concentração de chá (x_1), a temperatura de fermentação (x_3), o coeficiente de regressão quadrático da temperatura de fermentação (x_3^2) e a associação da concentração de chá com a temperatura de fermentação (x_1x_3) apresentaram influência positiva enquanto o coeficiente de regressão quadrático da concentração de chá (x_1^2), o coeficiente de regressão quadrático da concentração de açúcar (x_2^2), a associação da concentração de chá com o coeficiente de regressão quadrático da concentração de açúcar ($x_1x_2^2$) apresentaram influência negativa.

$$Y = 6140 + 2471 x_1 - 1415,88 x_1^2 - 246,88x_2^2 + 454,5 x_3 + 597,4 x_3^2 - 1190,7 x_1x_2^2 + 404,5 x_1x_3 - 169 x_2x_3 \quad [3]$$

A falta de ajuste não significativa também foi encontrada para cafeína com $p = 0,96$, o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,999 e pode elucidar 99,3% da variação dos dados ajustados para o número de variáveis.

Tabela 2: Concentração de compostos bioativos, atividade antioxidante e teor de cafeína das Kombuchas fermentadas em chá preto e erva mate.

| | Compostos fenólicos (mg AG/L) | Flavonoides totais (mg CAT/L) | Atividade antioxidante | | Cafeína (mg/L) |
|-----|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| | | | DPPH (% redução) | ABTS (µmol TE/L) | |
| K1 | 486,97 ^h ± 3,56 | 68,90 ⁱ ± 1,67 | 43,54 ⁱ ± 1,97 | 3171,10 ^f ± 126,64 | 733,17 ^k ± 0,68 |
| K2 | 904,34 ^b ± 9,86 | 203,26 ^a ± 1,88 | 56,20 ^e ± 1,19 | 5772,02 ^{de} ± 149,41 | 2558,75 ^a ± 16,55 |
| K3 | 518,78 ^g ± 9,22 | 79,77 ^h ± 2,60 | 34,95 ^j ± 1,56 | 3223,12 ^f ± 87,28 | 483,71 ⁿ ± 5,70 |
| K4 | 986,26 ^c ± 0,45 | 202,89 ^a ± 0,91 | 57,49 ^{de} ± 1,74 | 5743,95 ^e ± 111,30 | 2344,70 ^e ± 19,32 |
| K5 | 525,24 ^g ± 14,53 | 67,58 ⁱ ± 1,57 | 34,69 ^j ± 1,25 | 2812,72 ^g ± 139,37 | 649,73 ^l ± 8,37 |
| K6 | 962,57 ^a ± 0,23 | 188,80 ^b ± 2,50 | 58,68 ^d ± 0,96 | 6946,90 ^b ± 147,29 | 2468,53 ^b ± 51,41 |
| K7 | 452,21 ⁱ ± 0,48 | 67,70 ⁱ ± 3,15 | 35,01 ^j ± 2,01 | 2887,86 ^{fg} ± 259,11 | 568,61 ^m ± 0,42 |
| K8 | 894,11 ^b ± 8,63 | 190,95 ^b ± 0,91 | 87,65 ^a ± 1,41 | 8639,95 ^a ± 115,63 | 2287,23 ^d ± 3,64 |
| K9 | 668,26 ^f ± 18,12 | 172,03 ^{cd} ± 3,01 | 50,43 ^g ± 1,04 | 5772,24 ^{de} ± 416,54 | 1324,22 ^j ± 0,65 |
| K10 | 649,34 ^f ± 10,02 | 144,96 ^e ± 3,07 | 55,14 ^f ± 0,34 | 6275,14 ^e ± 87,28 | 1517,73 ^h ± 1,18 |
| K11 | 743,34 ^e ± 11,25 | 110,18 ^g ± 1,88 | 47,43 ^h ± 1,17 | 7044,14 ^b ± 111,84 | 2051,82 ^c ± 6,01 |
| K12 | 808,26 ^{cd} ± 16,10 | 124,62 ^f ± 4,02 | 70,11 ^b ± 1,28 | 6871,54 ^b ± 551,66 | 1397,81 ⁱ ± 6,18 |
| K13 | 827,22 ^c ± 5,01 | 175,02 ^c ± 1,82 | 69,75 ^{bc} ± 0,21 | 6113,29 ^{cd} ± 333,66 | 1563,86 ^g ± 19,64 |
| K14 | 845,57 ^c ± 11,32 | 170,60 ^d ± 1,15 | 68,84 ^c ± 1,91 | 6119,08 ^{cd} ± 305,21 | 1528,34 ^h ± 10,26 |
| K15 | 832,40 ^c ± 18,18 | 173,67 ^{cd} ± 1,25 | 68,95 ^c ± 1,97 | 6188,44 ^c ± 182,42 | 1704,17 ^f ± 2,10 |

Nota: Resultados expressos com a média ± desvio padrão. AG: ácido gálico; CAT: catequina; TE: equivalentes de Trolox; DPPH: método de captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil; ABTS: método de captura do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolona)-6-sulfônico Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras com p<005.

A Equação (4) demonstra os parâmetros que interferem na concentração de cafeína no modelo. Foi possível observar que a concentração de chá (x_1) e a temperatura de fermentação (x_3) são os parâmetros que interferem de forma positiva na equação. O coeficiente de regressão quadrático da concentração de chá (x_1^2), a interação entre o coeficiente de regressão quadrático da concentração de chá e a temperatura de fermentação ($x_1^2x_3$) e a interação entre a concentração de açúcar e a temperatura (x_2x_3) apresentam interação negativa.

$$Y = 1583,998 + 902,999 x_1 - 72,19 x_1^2 - 115,5 x_2 + 151,92 x_3 - 217,5 x_1^2x_3 - 211,88x_2x_3 \quad [4]$$

Depois de obtidos os modelos matemáticos, a otimização simultânea foi obtida (15). Foram definidos como critérios de otimização a maximização do teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante e o menor conteúdo de cafeína nas bebidas. As melhores condições para produção de Kombucha fermentada a partir do chá preto são 8,5 g/L de chá preto, 150 g/L de açúcar e a temperatura de fermentação de 30 °C.

CONCLUSÃO

O processo de otimização das Kombuchas através do planejamento fatorial demonstrou que as condições ideais de fermentação foram eficientes para aumentar a concentração de compostos bioativos e da atividade antioxidante e diminuiram o teor de cafeína. Os desfechos desta pesquisa poderão embasar novos estudos pautados na potencialização das propriedades funcionais da Kombucha, com vistas ao desenvolvimento de novos produtos com potencial promotor da saúde e consequente difusão da bebida no Brasil.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. VILLARREAL-SOTO, S.A.; BEAUFORT, S.; BOUAJILA, J.; SOUCHARD, J.P.; TAILLANDIER, P. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 3, p. 580-588, 2018.
2. 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. 709-18, 2015.
3. DUFRESNE, C.; FARNWORTH, E. Tea, Kombucha, and health: a review. **Food Research International**, v. 33, n. 6, p. 409-421, 2000.
4. WATAWANA, M.I.; JAYAWARDENA, N.; GUNAWARDHANA, C.B.; WAISUNDARA, V.Y. Health, wellness, and safety aspects of the consumption of kombucha. **Journal of Chemistry**, v. 2015, n. 11, p. 1-11, 2015.
5. TORÁN-PEREG, P.; DEL NOVAL, B.; VALENZUELA, S.; MARTINEZ, J.; PRADO, D.; PERISÉ, R. Microbiological and sensory characterization of kombucha SCOBY for culinary applications. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 23, n. 4, p. 100314, 2021.
6. AHMED, R.F.; HIKAL, M.S.; ABOU-TALEB, K.A. Biological, chemical and antioxidant activities of different types Kombucha. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 65, n. 1, p. 35-41, 2020.
7. 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, p. 538–550, 2014.
8. CHAKRAVORTY, S.; BHATTACHARYA, S.; CHATZINOTAS, A.; CHAKRABORTY, W.; BHATTACHARYA, D.; GACHHUI, R. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 220, n. 2, p. 63 - 72, 2016.
9. SREERAMULU G, ZHU Y, KNOL W. Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2589 - 2594, 2000.
10. BOX, G.E.P.; BEHNKEN, D.W. Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables. **Technometrics**, v. 2, n. 4, p. 455–75, 1960.
11. KALLEL, L.; DESSEAUX, V.; HAMDY, M.; STOCKER, P.; AJANDOUZ, E.H. Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 226 - 232, 2012.
12. 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, p. 392 – 398, 2007.
13. 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.
14. NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Chapter 6: Exploring the response surface. Em: **Data Handling in Science and Technology**. p. 245 – 312, 2005.
15. DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214 - 219, 1980.