

The graphical abstract represents the production of kombucha, in which tea is first infused, added sugar, milk whey and the scoby for fermentation. At this phase, pH and acidity were analyzed every day to make a fermentative profile and potted up to the analyses.

## DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BEBIDA TIPO KOMBUCHÁ À BASE DE ERVA-MATE , SORO DE LEITE E POLPA DE FRUTAS

**Keslene Lima <sup>a</sup>, Maria Paula Pedão Domingues <sup>a</sup>, Lucila Vicari <sup>b</sup>, Paula Vergara <sup>a\*</sup>.**

<sup>a</sup> Setor de Agroindústria. Curso Técnico em Química Integrado ao Ensino Médio. Instituto Federal Catarinense – *Campus Araquari*, 89245-000 Araquari – SC, Brasil.

<sup>b</sup> Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 96010-610 Pelotas - RS, Brasil.

---

( ) Manuscrito com material suplementar

(x) Manuscrito sem material suplementar

---

\* e-mail do autor: paula.silva@ifc.edu.br

## DEVELOPMENT AND EVALUATION OF KOMBUCHA BASED ON MATE HERB, MILK WHEY AND TASTE WITH PULP OF FRUIT

Initial objective: production of flavored kombucha made with yerba mate and comparison of its behavior during fermentation to that of traditional kombucha made with green tea. After preliminary testing, a new formula of mate-based fermented flavored beverage (9% pulp) with 10%, 15% and 20% whey was developed. It was made by incorporating microorganisms (80 g / L) in mate tea (100 g / L) and sucrose (50 g / L), fermenting the beverage for 4 days via aerobiosis. The analyses performed on the samples of both substrates for characterization and procedural control were: pH, titratable acidity, fat %, protein and carbohydrates in addition to the microbiological analysis. Results of mate herb kombucha with 10% of milk whey: pH = 2.99. Titratable acidity was 0.98%. Total carbohydrates 0.84 g / 100g. Total protein, 1.00 g / 100g. Total fat: 0.2 g / 100g. Conclusion: The fermented and flavored yerba mate drink with 10% whey presented satisfactory results in the physicochemical analyses when compared with green tea kombucha, it also demonstrated biological and antimicrobial activity.

Keywords: kombucha; fermentation; mate herb; milk whey, probiotic.

## INTRODUÇÃO

A kombuchá é uma bebida fermentada que vem se popularizando no Brasil e que está dentro das tendências atuais do mercado, é resultado da fermentação por uma associação simbiótica de bactérias e leveduras <sup>1</sup>. O chá usado como substrato é o da planta *Camellia sinensis*, sendo que é consumida há anos pelas suas propriedades aromáticas e biológicas, onde seus efeitos e constituintes têm sido pesquisados e indicam inúmeros benefícios para a saúde. A bebida estimula o sistema imunológico, auxilia a digestão, previne infecções microbianas, protege contra o câncer e doenças cardiovasculares <sup>2,3</sup>. Muitas das suas propriedades estão associadas à presença de compostos fenólicos provenientes dos extratos vegetais utilizados de base. Também é conhecida por suas propriedades hipoglicêmicas e anti-lipidêmicas, atividades de eliminação de radicais livres, entre outras <sup>4,5,6</sup>. Outra característica importante da bebida é seu caráter probiótico, em função do uso da cultura simbiótica utilizada, que possui tendência a colonizar a microbiota intestinal, auxiliando o sistema imune <sup>7</sup>.

O extrato vegetal contendo a cultura simbiótica é incubado em condições aeróbicas, seguido de fermentação anaeróbica, ambos com duração variável em função do tipo cultura, pH do meio, nutrientes, temperatura, entre outros. Tais condições tipificam a bebida com relação a características físico-químicas e sensoriais <sup>8</sup>. É possível encontrar variações de matérias-primas nas quais a cultura simbiótica se desenvolve. Entre os substratos alternativos, pode-se citar a erva mate, que tem sua origem na América do Sul e se desenvolve naturalmente no Brasil, na Argentina e no Paraguai. Contudo, cerca de 80 % da área de ocorrência pertence ao Brasil, sendo a região Sul a maior produtora, desempenhando um importante papel socioeconômico e ambiental <sup>9,10</sup>.

Aliando o aspecto funcional e probiótico da kombuchá pelas propriedades benéficas da infusão de extrato vegetais como da erva-mate ou chá verde, uma opção para incrementar mais ainda o caráter de saudabilidade do produto, seria incorporar o soro de leite como outro possível substrato para o desenvolvimento da cultura simbiótica, viabilizando uma possível fermentação láctica. Ao mesmo tempo que o soro de leite é considerado um resíduo preocupante na indústria de lácteos (pelo seu teor altamente poluente), possui um perfil nutricional extremamente rico e complexo. Desta forma, o objetivo deste trabalho é produzir e padronizar uma bebida a partir da erva-mate, acrescida de polpa de frutas tendo o soro de leite como alternativa de substrato e observar seu desempenho tecnológico e parâmetros físicos químicos, microbiológicos e sensoriais.

## Kombuchá

A kombuchá é uma bebida que se enquadra no segmento dos alimentos saudáveis naturais, sendo resultado da fermentação de uma associação simbiótica de bactérias e leveduras denominada scoby (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts) que gera um sabor ligeiramente ácido. A acidez depende do tempo de fermentação da bebida, assim o maior o tempo de retenção do processo promove um menor pH <sup>4</sup>. Os primeiros registos desta bebida datam cerca de 221 a.C. Em 414 d.C., um médico de nome Kombu teria levado a kombuchá da Coreia para o Japão para curar os problemas digestivos do Imperador Inkyo <sup>1</sup>. Conforme a Portaria n.º 64 do Diário Oficial da República Federativa do Brasil <sup>11</sup> que estabelece padrões de identidade para a kombuchá, define a bebida como: toda bebida fermentada com teor alcoólico de 1,5 % a base de chá de *Camellia sinensis* (chá verde/chá preto). Sua produção se dá pela infusão do chá, adoçada com açúcar, substrato da reação de fermentação. Ao chá adoçado é adicionado um volume de kombuchá pronta e uma scoby, precursora da fermentação, sendo esta cultura uma película gelatinosa que se forma na superfície do líquido e, a cada fermentação, são formadas novas camadas na parte que está em contato com o ar <sup>12</sup>.

É constituída majoritariamente por fibras e proteínas - esta proteína, rica em aminoácidos, sendo a lisina presente em altas concentrações <sup>1</sup>. Porém não há uma definição ou composição exata já que suas características sensoriais e composição química estão atreladas a diversos fatores que variam de acordo com sua origem, condições de produção, substratos como o tipo de chá e o açúcar utilizados como base, os microrganismos presentes na scoby e o tempo de fermentação. Alguns componentes, como ácidos orgânicos, vitaminas, polifenóis e aminoácidos, estão comprovadamente presentes na maioria <sup>1,13</sup>. Tem sido postulado que o nitrogênio deste chá (presente nas estruturas dos alcalóides principais como cafeína, teobromina e teofilina) é necessário para o desenvolvimento da cultura probiótica sendo que ele está presente em quantidades significativas em preparados de chá verde, onde o teor de cafeína é cerca de 5 % maior do que no chá preto (cerca de 2 %) <sup>14</sup> e também presente na erva mate, que possui um potencial uso para desenvolvimento da bebida em função do seu teor elevado de cafeína, fonte de nitrogênio <sup>9</sup>.

Os microrganismos presentes na kombuchá encontram-se tanto no líquido quanto no scoby. As bactérias predominantes na kombuchá são as acéticas. Pertencem essencialmente aos gêneros

Acetobacter, Gluconobacter e Gluconacetobacter <sup>15</sup>, sendo a bactéria mais relevante e recorrente a Gluconacetobacter xylinus, pois é a responsável pela sintetização da scoby <sup>16</sup>. Em combinação simbiótica com as bactérias, há diversos tipos de leveduras presentes na kombucha. Leveduras dos gêneros Zygosaccharomyces e Saccharomyces produzem compostos aromáticos frutados, apresentando grande importância no desenvolvimento do aroma da kombuchá. Já as leveduras apiculadas (Kloeckera e Hanseniaspora) sintetizam ésteres voláteis e ácidos que conferem ao substrato um aroma semelhante à sidra <sup>17,18</sup>.

### *Processo metabólico*

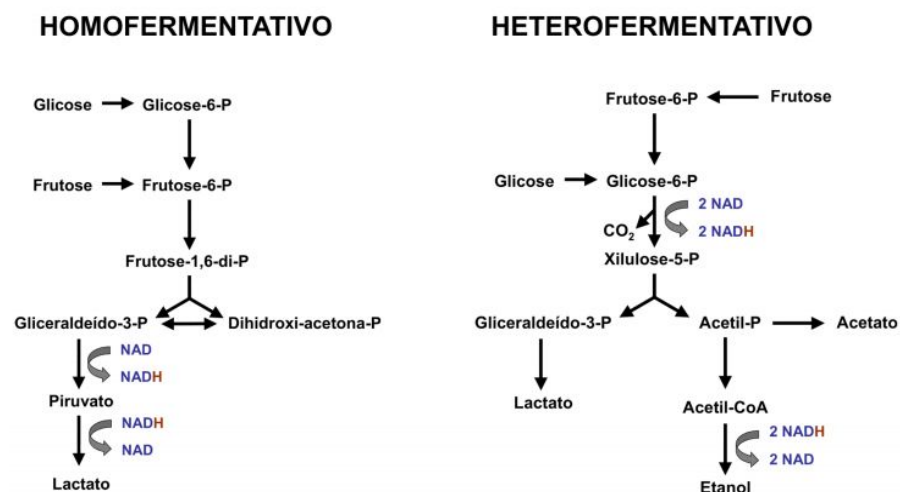
As leveduras e as bactérias da kombuchá utilizam os substratos das suas atividades metabólicas de forma complementar. As leveduras hidrolisam a sacarose da base de chá em frutose e glicose pela ação da enzima invertase e produzem etanol e dióxido de carbono. As bactérias acéticas convertem a glicose em ácido glucônico e a frutose em ácido acético. A presença deste ácido estimula as leveduras a produzir etanol que depois é utilizado pelas bactérias acéticas para o seu crescimento e para a produção de mais ácido acético <sup>15,19</sup>. Tanto o etanol como o ácido acético apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas, o que significa que o ambiente fermentativo da kombuchá tem a capacidade de inibir o desenvolvimento de microrganismos contaminantes <sup>17</sup>. Entre os ácidos orgânicos presentes, os mais importantes produzidos durante a fermentação são glucurônico, glucônico e lático. O ácido lático se mostra mais presente em preparações com base de chá verde se comparado a outros chás. O ácido glucurônico é um dos mais valiosos ácidos para a saúde presente na kombuchá e é o resultado de um processo microbiológico de oxidação da glicose. Exibe efeitos desintoxicantes, pois tem a capacidade de se ligar a xenobióticos, incluindo também fenóis presentes no fígado, permitindo que essas substâncias sejam excretadas pelos rins de forma mais eficiente <sup>1,20</sup>.

O valor do pH da bebida decresce ao longo da fermentação devido à produção destes ácidos orgânicos e se o tempo de fermentação for muito prolongado a kombuchá desenvolve um sabor avinagrado mais intenso, diminuindo sua aceitação sensorial <sup>21</sup>. A cor do líquido se torna mais clara, em relação à cor original do chá, devido às alterações que ocorrem na conformação dos complexos fenólicos perante o aumento da concentração de prótons <sup>22</sup>, e também devido à ação de enzimas microbianas sobre os polifenóis <sup>1</sup>.

Na fermentação alcoólica, postulada por Louis Pasteur em 1857, o mecanismo de produção de álcool seria possível, apenas, por células vivas na ausência de oxigênio, este com o objetivo de obter energia metabólica por meio do ATP. Para a obtenção de etanol, qualquer produto que contenha açúcares solúveis ou outro carboidrato é uma possível matéria prima, pois no metabolismo da célula fermentadora, o açúcar será transformado em etanol e dióxido de carbono, entretanto podem ser formados produtos secundários como: glicerol, ácido succínico, ácido acético, ácido pirúvico. A fermentação fornece energia na forma de ATP para a síntese do material celular, sendo o etanol um deste. Estas reações catabólicas acontecem com a diminuição na energia livre, soma-se a hidrólise do ATP durante as reações, transporte e manutenção, resulta na produção de calor. Convém ressaltar que o processo fermentativo, principalmente as enzimas, sofrem com as mudanças de pH, temperatura (ideal entre 25°C a 30°C), nutrientes, vitaminas, entre outros <sup>23</sup>.

A fermentação acética consiste na oxidação parcial aeróbica do álcool etílico, com produção de ácido acético e dióxido de carbono, ocorrendo a liberação de energia. A oxidação segue de acordo com a equação:  $C_2H_5OH + O_2 \rightarrow CH_3COOH + H_2O$ , com  $\Delta G = - 455 \text{ kJ.mol}^{-1}$  <sup>24,25</sup>.

O processo é realizado por bactérias denominadas acetobactérias. Apresentam forma de bastonetes elipsoidais, o pH adequado varia entre 3,0 e 4,0 podem apresentar flagelos polares ou peritríquios. Tecnicamente, estas são chamadas de bactérias ácido lácticas (BAL), um grupo de micróbios gram-positivos. Porventura, as BAL são melhor divididas em homofermentativas e heterofermentativas. Essa diferença é estruturada na Figura 1, as homofermentativas possuem como produtos o ácido láctico, ou seja, fazem a fermentação láctica (será melhor explicada posteriormente); enquanto as heterofermentativa produzem além do ácido láctico, o dióxido de carbono, ácido acético e etanol <sup>24,25</sup>.



**Figura 1:** Mecanismo simplificado das vias metabólicas homofermentativa e heterofermentativa em bactéria *Lactobacillus*.

A fermentação láctica trata-se de uma oxidação anaeróbica parcial de carboidratos com a produção final de ácido láctico, além de várias outras substâncias orgânicas, o esquema homofermentativo se encontra na Figura 1 <sup>26</sup>. O grupo das BAL possui 12 gêneros gram positivas, sendo as mais utilizadas: *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*. A duração da fermentação é de 5 a 10 dias para processos não controlados <sup>15,25</sup>.

### *Propriedades da kombuchá*

É considerada um produto probiótico desde que não sofra nenhum processo que inviabilize a presença dos microrganismos. É aquele que contém microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios na saúde do indivíduo <sup>7</sup>. Por ser um probiótico, o consumo habitual tende a equilibrar a microbiota intestinal e protege-la de microrganismos nocivos, fortalece o sistema imunológico e aumenta o metabolismo <sup>1,21,27</sup>. Entretanto, quando o tempo de fermentação é muito alto e a bebida torna-se muito ácida, pode trazer malefícios, como úlceras estomacais ou quando não há o manejo correto das colônias (ausência de procedimentos higiênicos) pode haver contaminação e assim, intoxicação por outros microrganismos não desejáveis na scoby, inclusive patogênicos <sup>5</sup>.

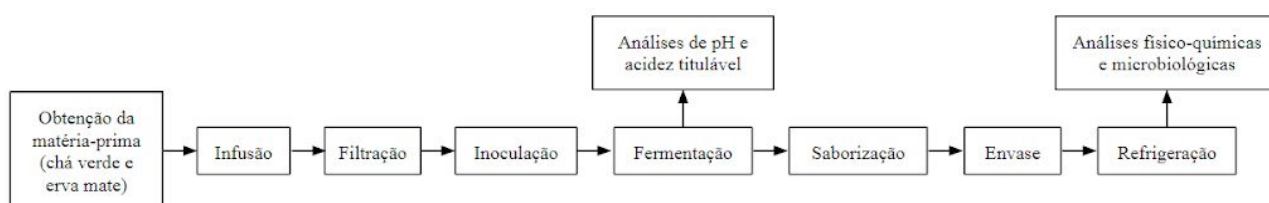
### **Soro de leite**

O soro de leite é um efluente da produção de queijos, este resíduo acarreta em problemas gravíssimos ao meio ambiente e ao sistema de tratamento de efluente atual, devido sua composição, que deste modo, necessita de um tratamento residual próprio ou a invenção de novas aplicações a este sobranço, dando base assim, a economia circular. Portanto, apresenta características e propriedades funcionais fisiológicas por sua composição, possibilitando, deste modo, várias vias de aproveitamento na área alimentícia <sup>28,29</sup>. A composição do soro de queijo apresenta pouca quantidade de gordura (0,4 %), sendo estes ácidos graxos de baixo ponto de fusão (29 °C), proteínas hidrossolúveis (0,8 %, sendo essas:  $\alpha$ -lactoalbumina e a  $\beta$ -lactoglobulina), lactose (4,9 %), minerais e vitaminas hidrossolúveis. O potencial hidrogeniônico é de aproximadamente 6,82 e sua densidade 1027 g.L<sup>-1</sup> <sup>30</sup>. Acredita-se que a presença de lactose (açúcar) viabilize a fermentação láctica, no

entanto, não há pesquisas pré-existente sobre uma formulação de kombuchá com soro de leite como substrato.

## PARTE EXPERIMENTAL

O trabalho foi desenvolvido no IFC - *Campus* Araquari, nos laboratórios de Química e Agroindústria. Preliminarmente, foram elaboradas em três etapas que tiveram o objetivo de verificar o comportamento da fermentação utilizando o substrato padrão (com chá verde) e a formulação alternativa que substituiu o chá verde pelo extrato de erva-mate a fim de observar a viabilidade do processo. A partir de resultados favoráveis, as formulações foram adicionados diferentes concentrações de soro de leite com o objetivo de verificar o desempenho da colônia simbiótica mediante a presença de lactose (alternativa ao uso único de sacarose). E por fim, escolheu-se uma formulação, de acordo com os parâmetros da legislação, para as análises microbiológicas e físico-químicas. O fluxograma do processo de produção das bebidas à base de erva mate e chá verde pode ser visualizada na Figura 2.



**Figura 2.** Fluxograma do processo de produção da bebida de erva mate verde e chá verde.  
*Fonte: As autoras (2019).*

As scobys foram doadas pela empresa Boo Kombuchá<sup>®</sup>, situada em Joinville-SC. O chá verde foi obtido nos comércios da cidade de Joinville-SC e a erva-mate foram doadas pela empresa Mate Tea from Brasil<sup>®</sup>. As polpas de frutas foram comprada diretamente com os produtores. O soro de leite foi obtido da produção de queijos realizadas no Laboratório de Agroindústria do IFC.

### **Etapa 1 - Produção da kombuchá de chá verde e erva mate**

Com a intenção de compreender melhor o processo de produção da bebida, primeiramente foram realizadas as fermentações dos chás a fim de elaborar uma curva de desempenho (perfil)



fermentativo analisando pH e acidez titulável diariamente, por dez dias ou até o pH máximo de 2,5. Foram preparadas duas amostras (kombucha com chá verde e outra com erva mate), cada uma com as folhas desidratadas 10 g.L<sup>-1</sup> e sacarose comercial 100 g.L<sup>-1</sup>, em água a 100 °C, realizando a infusão por 10 minutos. Aos chás filtrado e resfriado (30 °C) foi adicionado a scoby (~24 g.L<sup>-1</sup>) para obtenção do kombuchá, segundo a metodologia de Jayabalan et al. (2014), com adaptações.

A incubação ocorreu a 30±5 °C (em estufa incubadora BOD com circulação de ar, em jarros de vidro previamente esterilizados), até a formação de uma película que cobriu todo o diâmetro do recipiente e assim, a fermentação estendeu-se de 6 a 9 dias. Removida a cultura, os chás foram acrescido de 9 % (m/v) de polpa de maracujá e butiá (também chamado de segunda fermentação), homogeneizados e armazenados em garrafas de cor âmbar, lacradas e mantidas por sob refrigeração a 10±2 °C durante 2 a 3 dias.

## **Etapa 2 - Produção da Kombuchá de chá verde e erva mate com soro de leite**

Posteriormente, a fim de conhecer o comportamento da kombuchá e das scobys na presença de soro de leite foi adicionado, a cada extrato vegetal - EV (chá verde e erva mate), diferentes concentrações de soro segundo a Tabela 1. Sendo que a produção da kombuchá foi igual a etapa anterior.

**Tabela 1.** Proporção de extrato vegetal e soro de leite em cada formulação

<b>Substrato</b>	<b>F<sub>1</sub></b>	<b>F<sub>2</sub></b>	<b>F<sub>3</sub></b>
Extrato Vegetal (EV)	90 %	85 %	80 %
Soro de leite (SL)	10 %	15 %	20 %

Fonte: As autoras (2019).

## **Etapa 3 - Caracterização da Kombuchá escolhida**

Ademais, a partir de resultados favoráveis, foi escolhida a formulação que estivesse condizente com os parâmetros de acidez e pH da legislação, e assim, que foram enviada para as análises microbiológicas e físico-química.

### *Análises*

A formulação escolhida pela equipe do projeto foi caracterizada do ponto de vista bromatológico, físico-químico e microbiológica. A Figura 2 abaixo expõe as análises feitas pelo Laboratório de Alimentos Zínia® e suas respectivas metodologias utilizadas.

**Tabela 2.** Metodologias utilizadas pelo laboratório Zínia

<b>Bolores e Leveduras</b>	<b><i>Salmonella sp</i></b>	<b><i>Estafilococos coagulase Positiva</i></b>	<b>Coliformes a 45°C (<i>E.coli</i>)</b>	<b>Gorduras Totais</b>	<b>Carboidratos Totais</b>	<b>Proteínas Totais</b>
ISO 21527-1-2:2008	ISO 6579:2017	ISO 6888-3:2003	ISO 7251:2005	MAPA - IN 68/2006	MAPA - IN 20/1999	MAPA - IN 20/1999

Fonte: As autoras (2019).

As análises de pH e acidez titulável de todas as formulações do projeto foram feitas no IFC - Campus Araquari.

O Potencial Hidrogeniônico das formulações de kombuchá e extrato vegetal e kombuchá com soro de leite foram verificados utilizando um pHmetro de bancada devidamente calibrado da marca MS Tecnopon modelo mPA 210, apenas uma vez <sup>31</sup>.

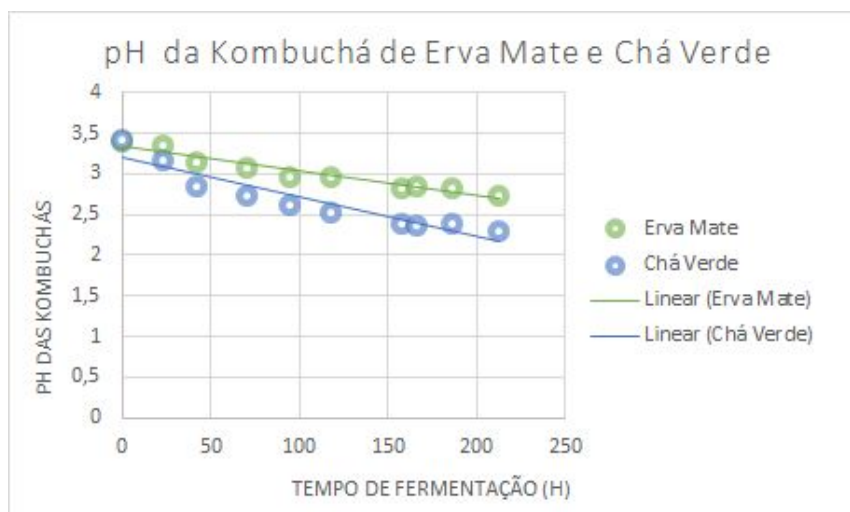
A acidez titulável fundamenta-se na reação de neutralização dos ácidos com solução padronizada de álcali, até o ponto de equivalência com o uso de um indicador ou potenciômetro até pH = 8,2. Foi transferido 0,5 mL da amostra para erlenmeyer de 100 mL contendo 75 mL de água destilada, seguido da adição 4 gotas de fenolftaleína. Foi titulado com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> até coloração rosa, em triplicata <sup>31</sup>.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Etapa 1 - Kombuchas de chá verde e erva-mate**

#### *Análise de pH*

A curva de diminuição do pH com o tempo de fermentação de ≈ 9 dias (212,4 h) para os substratos de chá verde e erva-mate se encontram na Figura 3.



**Figura 3.** Cinética do pH durante o processo de fermentação das kombuchás à base de extratos vegetais

A partir dos resultados observados nessa fase, contatou-se para a kombuchá de erva-mate a fermentação iniciou-se com pH de 3,40 e, após os dez dias de fermentação, foi detectado pH de 2,73. Apresentando semelhança quanto aos valores de pH da bebida com chá verde, onde o valor inicial do pH foi de 3,42 e o final, após os dez dias, foi de 2,29. Kallel et al.<sup>32</sup> analisaram o comportamento do pH da bebida durante a fermentação utilizando chá verde, o substrato iniciou com pH de 3,8 logo após a inoculação e, após 15 dias, seu potencial hidrogeniônico estava a 2,6. Sendo que no 5º dia de fermentação, a bebida de chá verde obteve pH na mesma faixa do 15º dia do experimento citado, se mantendo estável. Neffe-Skocińska et al.<sup>33</sup> avaliaram o processo fermentativo da kombuchá de chá verde em temperatura controlada de 30 °C, e depois de 7 dias de fermentação obteve pH: 2,71. Valores mais condizentes com o observado durante o nosso processo, para a kombuchá com o extrato de erva mate.

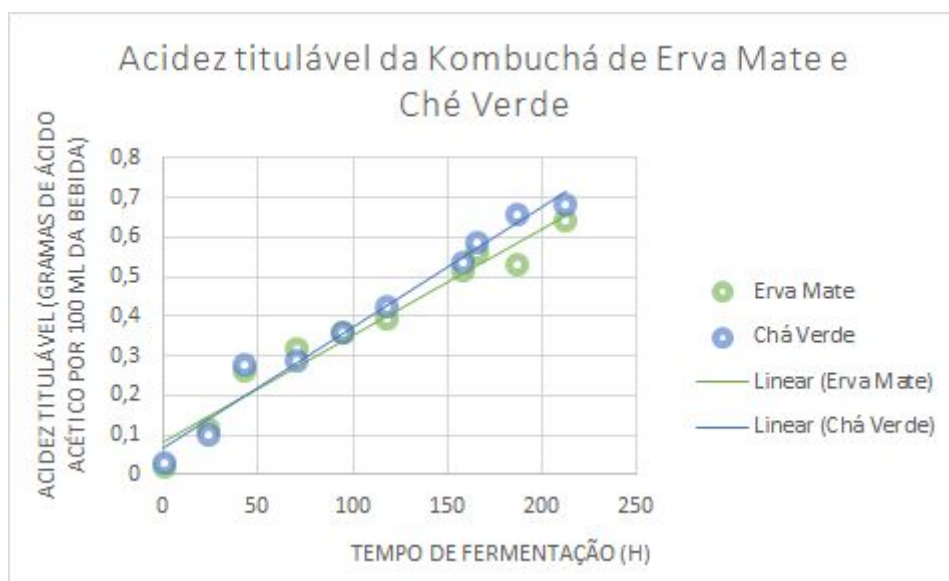
No geral, os resultados encontrados na literatura foram próximos aos determinados nesta pesquisa, em relação ao parâmetro de pH. Uma das possíveis explicações do decréscimo mais acelerado do pH quando a fermentação ocorreu na presença do extrato de chá verde, quando comparado ao de erva-mate, foi devido ao inóculo para segunda batelada estar com os microrganismos mais adaptados à chá verde, causando um decréscimo mais rápido do pH durante a fermentação, além de que o próprio chá verde bruto ser mais ácido que da erva mate<sup>34</sup>. Portanto, nesta primeira formulação as cepas ainda estavam em fase adaptativa, o que também justifica a diferença de pH entre as formulações.

A quantidade de líquido de arranque (líquido do starter) adicionada, foi de 100 mL para cada amostra, devido a isso a bebida já inicia a fermentação com um teor de acidez elevado proveniente do líquido de arranque. Como as cepas ainda se encontravam em adaptação, as bebidas foram reformuladas. O primeiro parâmetro do processo a ser alterado foi a quantidade de líquido adicionada, a fim de se obter um pH mais elevado, coerente com os encontrados na literatura. Chegou-se à conclusão, a partir dos experimentos, de que 25 mL de líquido de arranque era o suficiente para acréscimo na formulação das bebidas.

A medição do pH é o fator que controla o curso correto de fermentação e é usado para determinar o fim do processo <sup>34</sup>. Um pH final de 2,5 sinaliza o fim do processo fermentativo <sup>1</sup>. Definiu-se que 5 dias de fermentação são suficientes para obter uma bebida fermentada com melhor qualidade sensorial, pois o baixo pH pode contribuir para a diminuição da qualidade sensorial geral da bebida para um nível inaceitável em decorrência da produção de ácidos orgânicos, principalmente do ácido acético, que não é atrativo para o paladar <sup>6</sup>.

#### *Acidez titulável*

Kombuchá é uma bebida gaseificada, não pasteurizada, com pH entre 2,5 e 4,2 e acidez titulável mínima de 6,0 % de acidez volátil mínima, expresso em % de equivalentes grama de ácido acético <sup>35</sup>. A curva de aumento da concentração de ácido acético com o tempo de fermentação de ≈ 9 dias (212,4 h) para os substratos de chá verde e erva-mate se encontram na Figura 4.



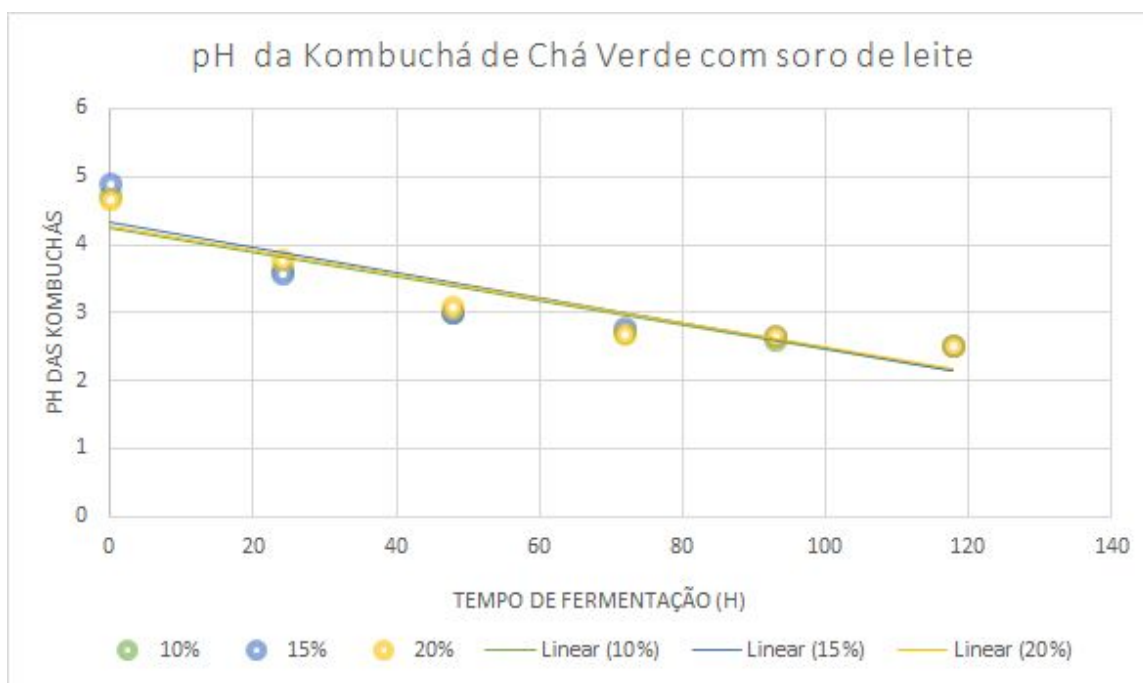
**Figura 4.** Cinética do ácido acético durante o processo de fermentação das kombuchás à base de extratos vegetais.

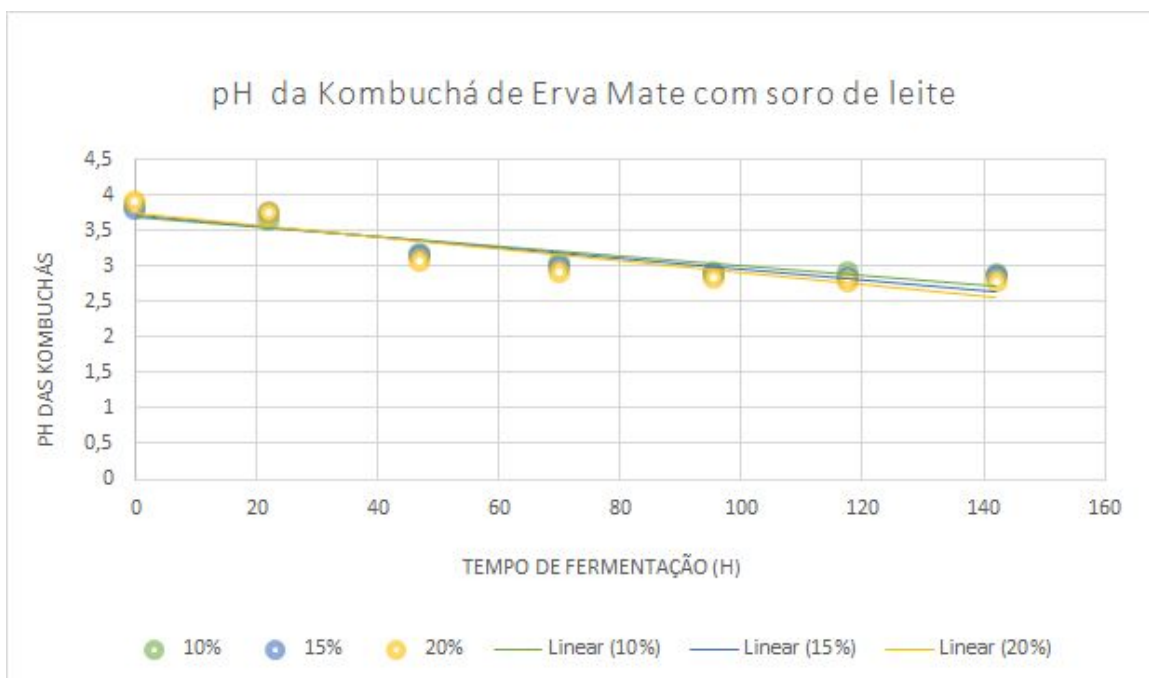
O ácido acético foi analisado durante a fermentação das kombuchás, chegando a um valor final, para o chá verde, de 6,8 % e na de erva-mate até 6,4 %. Neste primeiro momento, a bebida de chá verde laboratorial produziu 5,8 % a mais de ácido acético quando comparado à de erva-mate. Uma das possíveis explicações é que as bactérias acéticas estavam mais adaptadas ao chá verde do que o erva-mate, nas condições estabelecidas, convertendo o etanol do meio em ácido acético em maior velocidade.

## Etapa 2 - Kombuchas de chá verde e erva-mate a base do soro de leite

### Análise de pH

Para o desenvolvimento da segunda etapa do projeto, foi adicionada diferentes concentrações de soro (10 %, 15 % e 20 %), a cada extrato vegetal, resultando em seis formulações totais, fermentadas durante 5 dias. A diminuição do pH com o tempo para as diferentes concentrações de soro de leite encontram-se na Figura 5.





**Figura 5.** Cinética do pH durante o processo de fermentação das kombuchás à base de extrato vegetal e diferentes concentrações de soro de leite

Durante o processo de fermentação, as bactérias e as leveduras metabolizam a sacarose em vários ácidos orgânicos, como o ácido acético e o ácido glucurônico, e o resultado esperado é que o pH diminua com o tempo de fermentação. Na Figura 5, observa-se que houve redução de pH, em todas as amostras, o que leva à conclusão de que ácidos orgânicos foram biossintetizados, de acordo com o esperado, sendo essa diminuição mais significativa na kombuchá de chá verde 15 % de soro do que erva-mate. Devido a menor produção de celulose observada no chá-verde, o que pode ter permitido que as bactérias ácido-acéticas tivessem maior acesso ao oxigênio na superfície do líquido, sintetizando uma quantidade maior de ácidos principalmente nos primeiros cinco dias de fermentação, em que se observa uma maior queda na formulação com chá verde do que erva-mate. Em contrapartida, na bebida à base de erva-mate a espessa camada de celulose produzida pode ter dificultado a difusão de oxigênio no meio, inibindo o crescimento de bactérias aeróbicas responsáveis pela formação de ácidos orgânicos.

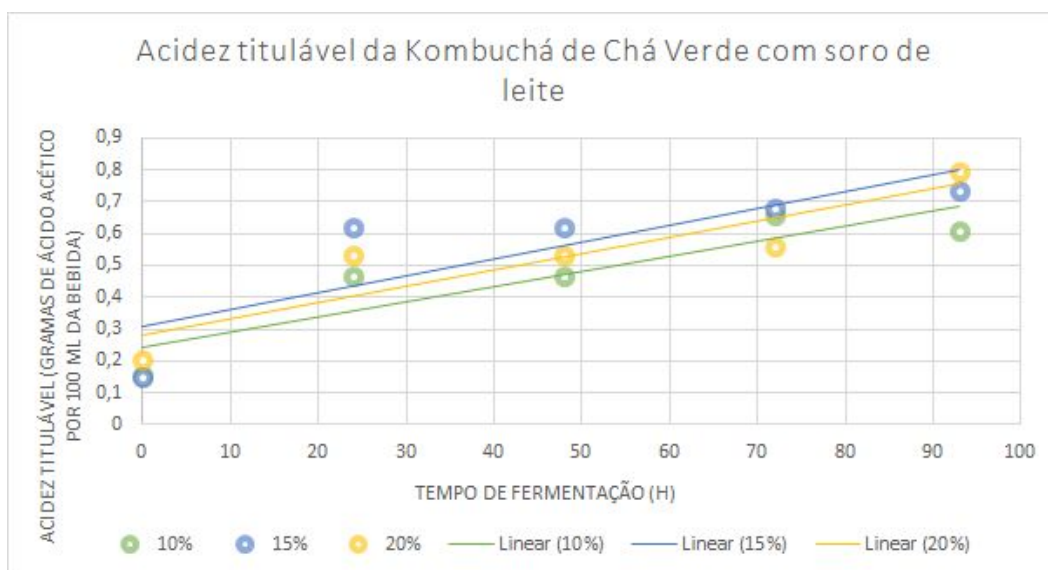
De forma geral, a formulação de erva-mate com 10 % de soro apresentou redução de 0,76 no pH após 5 dias, enquanto a amostra produzida com 15 % de soro de leite reduziu 0,9, já a de 20% reduziu 1,11. Com esses valores, nota-se que conforme maior a quantidade de soro, menor o pH final. O potencial hidrogeniônico está indiretamente relacionado com a capacidade de sintetizar os açúcares em ácidos, considerando que com o soro há uma maior diversidade de substrato (glicose e

lactose), maior a contingência de produção destes ácidos capazes de liberar cátions  $H^+$  no meio, justificando o comportamento do pH de erva-mate para as diferentes concentrações usadas.

As análises de pH mostram que houve variação em relação a bebidas fermentadas com soro de leite, quando comparadas as diferentes concentrações, e quando comparadas à kombucha sem o soro. Esta variação pode ser devido aos diferentes substratos (açúcares fermentáveis do soro de leite) utilizados para quase os mesmos microrganismos. O estudo de Iličić et al. <sup>36</sup> analisou que a kombucha fermentada a base de leite registrou o pH 3,21.

### Acidez titulável

A cinética do aumento da acidez titulável total (expresso em ácido acético para o chá verde e erva-mate, e em ácido lático para as formulações com o soro de leite) é mostrado na Figura 6.



**Figura 6.** Cinética do ácido acético durante o processo de fermentação das kombuchás de extratos vegetais e diferentes concentrações de soro de leite.

O teor de ácido produzido nos seis substratos após 117 h de fermentação ( $\approx$  5 dias) foram, para a mescla de chá verde mais soro de leite:  $0,61 \text{ g} \cdot 100^{-1} \text{ mL}$  de ácido acético (10 % de soro),  $0,73 \text{ g} \cdot 100^{-1} \text{ mL}$  (15 %), e  $0,79 \text{ g} \cdot 100^{-1} \text{ mL}$  (20 % de soro de leite). Já a kombucha de erva-mate produziu, ao final dos 5 dias de fermentação:  $1,48 \text{ g} \cdot 100^{-1} \text{ mL}$  (10 % de soro), isso representa um rendimento de 59,1 % a mais, de ácido produzido, quando comparado a versão tradicional do chá verde,  $1,91 \text{ g} \cdot 100^{-1} \text{ mL}$  (15 %), 61,8 % de rendimento, e  $1,94 \text{ g} \cdot 100^{-1} \text{ mL}$  (20 % de soro de leite).

Jayabalan et al. <sup>37</sup> analisaram o conteúdo de ácido acético na fermentação de kombucha de chá verde e obtiveram o valor de ácido acético de 3 g.L<sup>-1</sup> no 9º dia de fermentação. Já Kallel et al. <sup>32</sup> obtiveram um aumento quase linear da concentração de ácido acético ao longo das fermentações propostas, resultando em uma concentração de ácido acético de 9,5 g.L<sup>-1</sup> na kombucha de chá verde e de 6,2 g.L<sup>-1</sup> na kombucha de chá preto ao final de 15 dias. Na kombucha de erva-mate, a concentração foi de 9,5 g.L<sup>-1</sup> no 3º dia. O nível de ácido acético varia entre as kombuchas dependendo do conteúdo e das atividades das bactérias ácido acéticas residentes <sup>17</sup>. Mendes <sup>38</sup> constatou em seu estudo que todas as amostras de leites fermentados apresentaram valores de acidez titulável inferiores a 0,60 %, valor que corresponde ao 4º dia de fermentação da mistura de chá verde com as concentrações do soro de leite.

Devido às experimentações e com a observação dos parâmetros de pH e acidez titulável que estiveram condizentes com a legislação, escolheu-se a bebida com concentração de 10 % de soro de leite, tendo em vista que as demais concentrações (15 % e 20 %) obtiveram um desempenho insatisfatório, com o pH muito inferior e um paladar ácido desagradável, além dos valores de ácido acético estarem acima dos encontrados na literatura.

### **Etapa 3 - Caracterização da kombucha a base de erva-mate com 10 % de soro de leite**

Para a formulação da bebida final, considerou-se os parâmetros tecnológicos do processo corrigidos ao longo da elaboração das outras formulações, como a diminuição volume de líquido de arranque para 25 mL, e, decidiu-se, por fim, diminuir a temperatura de fermentação de 30 °C para 25 °C, com o propósito de uma redução na velocidade das reações, tendo em conta que maiores concentrações de soro influi na rápida diminuição do pH, e como visto nos tópicos anteriores, os valores de acidez se encontravam elevados, tanto para a kombuchá sem soro quanto com soro. Além disso, a fermentação foi reduzida para um período de 4 dias. Optou-se por utilizar apenas a erva mate para a produção e caracterização da bebida, tendo em vista seu desempenho fermentativo anteriormente testado.

#### *Análises microbiológicas*

Os valores médios para os parâmetros microbiológicos das kombuchas de butiá e maracujá, ambas a base de erva-mate e 10% de soro de leite, podem ser visualizados na Tabela 3.



**Tabela 3.** Determinação microbiológica para kombuchá a base de erva mate e soro de leite saborizadas

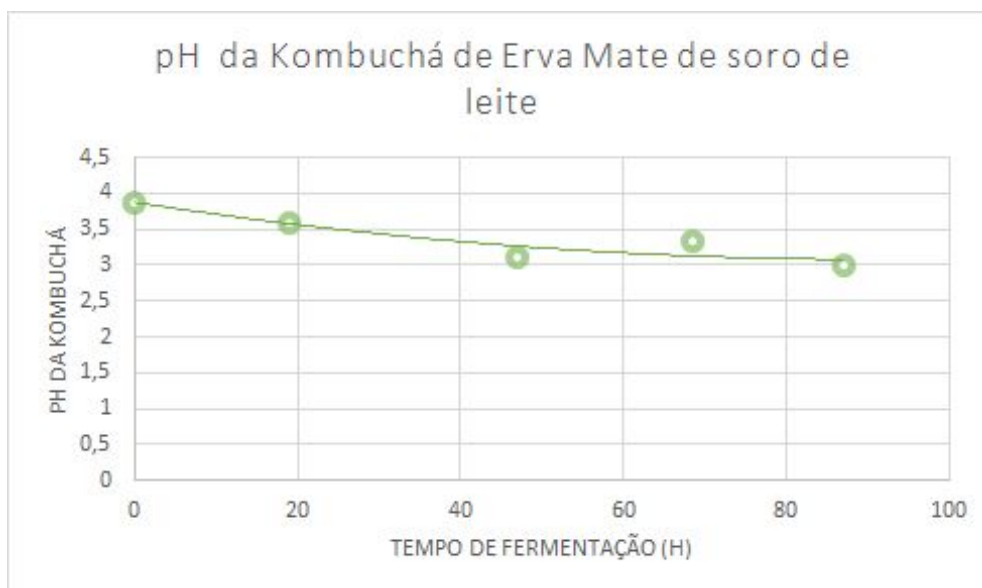
<b>Kombuchá Soro + Erva Mate</b>	<b>Bolores e Leveduras (UFC/g)</b>	<b><i>Salmonella sp</i> (em 25 g)</b>	<b><i>Estafilococos coagulase</i> Positiva (UFC/g)</b>	<b>Coliformes a 45°C (<i>E.coli</i>) (NMP/g)</b>
<b>Polpa de Butiá</b>	4560	Ausência	< 10	< 0,18
<b>Polpa de Maracujá</b>	1240			

Fonte: As autoras (2019).

As análises antimicrobianas conforme expostas na tabela acima mostram que não houve crescimento microbiano significativo. Houve discreto crescimento de Bolores e Leveduras, com baixo crescimento na amostra de maracujá, elevado crescimento na amostra de butiá. A contagem de Bolores e Leveduras foi de 1240 UFC.g<sup>-1</sup> e 4560 UFC.g<sup>-1</sup>. Não foi detectada a presença de coliformes (45 °C) e *Salmonella spp*. As contagens estimadas para *Estafilococos coagulase* Positiva foram de < 10 UFC.g<sup>-1</sup>. A baixa contagem para os microrganismos patogênicos pode ser explicada pelo uso de boas práticas de produção, além as características físico-químicas e microbiológicas do meio de fermentação, como por exemplo pH e as altas concentrações de bactérias ácido-acéticas e leveduras inibindo assim o crescimento de microrganismos indesejáveis. A presença de leveduras é essencial para o desenvolvimento dos ácidos, porém essa diferença dos valores de butiá e maracujá pode ser justificado pelo processo da polpa de butiá, onde não se sabe ao certo quanto ao seu modo de preparo e estocagem, logo, possíveis descuidados operacionais podem ter corroborado para o maior desenvolvimento de bolores e leveduras nas amostras com polpa de butiá.

#### *Caracterização físico-química*

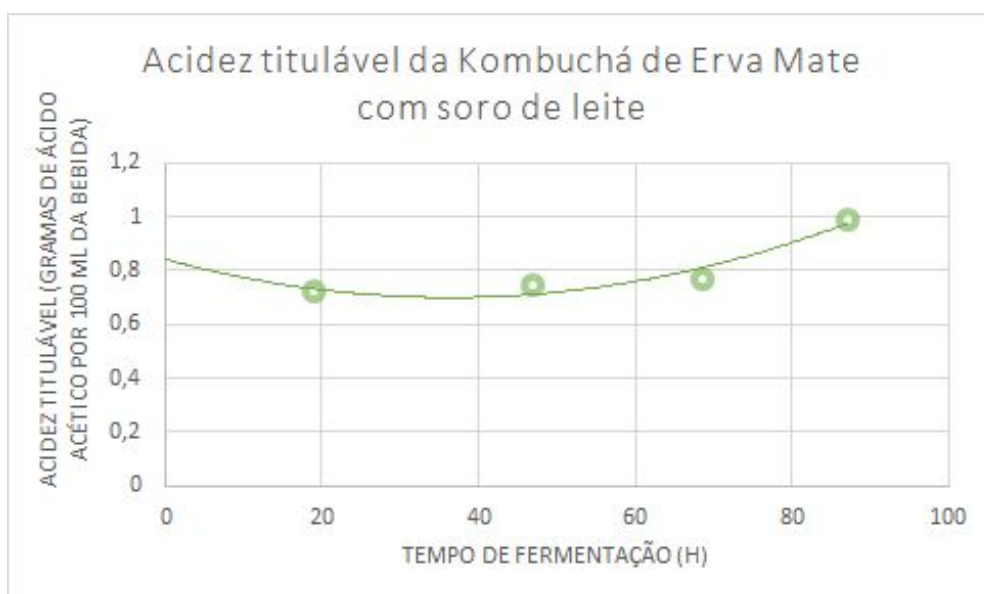
Os valores médios para os parâmetros físico-químicos da kombucha de erva-mate com 10 % de soro de leite, podem ser visualizados abaixo.



**Figura 7.** Cinética do pH durante o processo de fermentação das kombuchás.

No decorrer da fermentação, observou-se que a variável pH reduzia de forma contínua e o teor de acidez titulável aumentava. Após os 4 dias de fermentação, foi detectado que a kombucha de erva-mate apresentava-se numa acidez mais agradável de 2,99. No estudo realizado por Fu et al.<sup>39</sup> que utilizando uma mistura de ervas na fermentação de sua amostra foram encontrados valores de pH 2,7. Em estudos realizados com kombuchas fermentadas tradicionalmente em chá verde ou preto, foram obtidos resultados como no de Filippis et al.<sup>40</sup> onde o pH decresceu de 3,5 para 2,5 em 6 dias. Reiss<sup>41</sup> produziu kombucha utilizando diferentes açúcares e a média de variação do pH foi de 6,1 para 4,8. Já no estudo de Chakravortya et al.<sup>42</sup> o pH caiu de 5,03 para 2,28 em 7 dias de fermentação.

Os resultados obtidos acidez titulável neste estudo ( $0,98 \text{ g} \cdot 100^{-1} \text{ mL}$ ) foram elevados quando comparado com a legislação. Mendes<sup>38</sup> constatou em seu estudo que todas as amostras de leites fermentados apresentaram valores de acidez titulável inferiores a 6,0 %, mantendo-se dentro valor mínimo oficial estabelecido pela legislação brasileira<sup>43</sup>.



**Figura 7.** Cinética de % de ácido acético durante o processo de fermentação das kombuchás.

Verificou-se a presença de pouco carboidrato em todas as amostras analisadas, menos que 0,84 g.100<sup>-1</sup> g. Com este resultado pode-se perceber que as bactérias probióticas presentes nas bebidas fermentadas com o soro, consumiram grande parte do carboidrato existente no produto.

**Tabela 4.** Composição química da kombucha de erva mate com 10 % de soro de leite e polpa de frutas

Produto	Unidade	Proteínas Totais	Gorduras Totais	Carboidratos Totais
Butiá/Maracujá	g.100g <sup>-1</sup>	< 1,00	< 0,2	< 0,84

Fonte: As autoras (2019).

As quantidades de proteína encontrada - 1 % para as duas amostras - foram inferiores quando comparadas ao estudo realizado por por Ribeiro et al. <sup>44</sup> que estudou uma bebida láctea fermentada formulada com *Camellia sinensis* na qual os valores de proteína encontrados foram 3,27 e 4,27 (g.100<sup>-1</sup> g). Porém, os resultados obtidos foram pouco mais semelhantes aos observados nas bebidas lácteas analisadas por Thamer e Penna <sup>45</sup> onde os percentuais de proteínas estiveram entre 1,93 % e 2,46 %, sendo assim, um pouco mais apropriados os resultados da amostra.

## CONCLUSÃO

É possível produzir uma bebida análoga ao kombuchá, em escala laboratorial, a base de erva-mate e soro de leite, utilizando o inóculo convencional e mantendo sua qualidade físico-química e microbiológica. A elaboração da bebida fermentada resulta em um líquido com características químicas desejadas para a produção de um produto com qualidade sensorial aceitável. A escala laboratorial com controle de parâmetros é uma das alternativas para uma possível padronização da bebida, por conter microrganismos aeróbios e anaeróbios simultaneamente. Os parâmetros foram otimizados para chegar a uma kombucha desejada e, posteriormente, padronizada. Durante a primeira fermentação, a kombuchá de erva-mate apresentou o mesmo comportamento que a padrão de chá verde, entretanto, com uma velocidade inferior de conversão da sacarose em seus subprodutos. A microbiota ainda não estava totalmente adaptada ao novo substrato e pode ser um dos fatores da diferença significativa. Já na segunda fermentação, onde esses extratos foram assimilados a diferentes concentrações de soro, na kombuchá de erva-mate ocorreu uma acidificação mais acentuada, fazendo com que apenas uma concentração de soro de leite na bebida fermentada (10%) fosse selecionada para as análises físico-químicas e microbiológicas.

Após análise dos dados encontrados, conclui-se que a bebida fermentada pela kombuchá tanto o chá verde como em erva-mate possuem atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp, *E. coli*, porém não inibiu o crescimento de bolores e leveduras.

Devido ao pouco tempo de desenvolvimento do trabalho, apenas uma combinação de parâmetros na escala laboratorial foi testada. Porém, o presente trabalho despertou interesse para futuros estudos para uma padronização em maior escala da kombucha com o soro de leite. A kombuchá desenvolvida em escala laboratorial foi superior em algumas análises e abre possibilidades de novos estudos que aperfeiçoem os parâmetros para uma produção padronizada e em escala industrial.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos primeiramente ao Instituto Federal Catarinense pela infraestrutura e a excelência no ensino. A Mate Tea Brasil e Boo Kombuchá que foram essenciais para o andamento da pesquisa com seu fomento com a doação de insumos.

## REFERÊNCIAS

1. JAYABALAN, R. *et al.* 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.
2. NISHINO, H. *et al.* Cancer prevention by phytochemicals. **Oncology**, v. N. 1, p. 38-40, 2005.
3. RASMUSSEN, S. E. *et al.* Dietary proanthocyanidins: Occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. **Mol. Nutr. Food Res.**, Weinheim, 49, p. 159-174, 2000.
4. 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. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2672.2000.01188.x>>. Acesso em: 20 fev. 2019.
5. GREENWALT C. J. *et al.* Review, Kombucha, the Fermented Tea: Microbiology, Composition, and Claimed Health Effects. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 7, p. 976 - 981.
6. CHU, S.; CHEN, C. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of Kombucha. **Food Chemistry**, v. 98, p. 502-507, 2006.
7. KOZYROVSKA, N. O. *et al.* Kombucha microbiome as a probiotic: a view from the perspective of post-genomics and synthetic ecology. **Biopolymers and Cell**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 103-113, 2012.
8. VELIĆANSKI, A. *et al.* Characteristics of kombucha fermentation on medicinal herbs from Lamiaceae family. **Romanian Biotechnological Letters**, 18 (1), p. 8034-8042, 2013.
9. ESMELINDRO, M. C. *et al.* Caracterização físico-química da erva-mate: influência das etapas do processamento industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 2, p. 193-204, maio-ago. 2002.
10. RODIGHERI, H. R.; SCHLOSSNACHER NETO, L.; CICHACZEWSKI, I. F. **Custos, produtividade e renda da erva-mate cultivada na região de Guarapuava, PR**. Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 1995. 21p.
11. BRASIL. Portaria n.º 64, de 14 de maio de 2018. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 21 jun. 2018. Ed. 118, Seção 1, p. 3.
12. JARRELL, J.; CAL, T.; BENNETT, J. W. The kombucha consortia of yeasts and bacteria. **Mycologist**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 166-170, nov. 2000.
13. MARSH, J. A. *et al.* Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple Kombucha (tea fungus) samples. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 38, p. 171-178, Apr. 2014.
14. HOFFMANN, N. Basic Building Blocks, Nutrients and Growth Factors. **What the Kombucha culture needs to survive**. 1998. Disponível em: <<http://www.kombu.de/nutrient.htm>> Acesso em: 15 fev. 2019.

15. GOMES, F. A. **Antagonismo entre leveduras e bactérias lácticas na fermentação alcoólica**, Piracicaba. 2009. 172 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009.
16. BALENTINE, D. A.; WISEMAN, S. A.; BOUWENS, L. C. M. The chemistry of tea flavonoids. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, England & Wales, v. 37, n. 8, p. 693-704, 1997. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408399709527797>>. Acesso em: 02 mar. 2019.
17. BATTIKH, H.; BAKHROUF, A.; AMMAR, E. Antimicrobial effect of Kombucha analogues. **LWT – Food Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 71-77, Jun. 2012.
18. MAYSER, P. *et al.* The yeast spectrum of the „tea fungus Kombucha”. **Mycoses**, v. 38, n. 7-8, p. 289-295, Jul-Aug. 1995.
19. MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 14.ed. São Paulo: Prentice Hall, 2016, 1032p.
20. NGUYEN, K. N. *et al.* Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic bacteria strain from traditional Kombucha for high-level production of glucuronic acid. **LWT – Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1149-1155, 2015.
21. DUFRESNE, C.; FARNWORTH, E. Tea, Kombucha, and health: a review. **Food Research International**, v. 33, n. 6, p. 409-421, Jul. 2000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996900000673>>. Acesso em: 03 mar. 2019
22. MCGEE, H. *On Food and Cooking: The Science and Lore of the Kitchen*, p. 410-435. Scribner, Nova Iorque, EUA. 2004.
23. VOLPE, P. L. O. Estudo da fermentação alcoólica de soluções diluídas de diferentes açúcares utilizando microcalorimetria de fluxo. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 528-534, oct. 1997. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40421997000500013>>. Acesso em: 23 mai. 2019.
24. YAMADA, Y.; YUKPHAN, P. Genera and species in acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, p.15-24, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160507006678?via%3Dihub#bib5>>. Acesso em: 24 mai. 2019.
25. KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and Physiology of the Probiotic Lactic Acid Bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, 26 mai. 1998, ed. 41, 103-125. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00049-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00049-X)>. Acessado em: 24 mai. 2019.
26. LIMA, U. A. *et al.* **Biotecnologia industrial - Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo, 2011, 616.
27. CINTRA, B. P. G.; KAWASHIMA, L. M. Desenvolvimento e avaliação de formulações de chá fermentado (kombucha). **Revista Científica UMC**, v.3, n.3, out. 2018. Disponível em: <<http://seer.umc.br/index.php/revistaumc/article/viewFile/509/401>>. Acesso em: 10 fev. 2019
28. SERPA, L.; PRIAMO, W. L.; REGINATTO, V. Destino ambientalmente correto a rejeitos de queijaria e análise de viabilidade econômica. In: **II International Workshop Advances in Cleaner**

**Production**, 2009. São Paulo. Anais do II International Workshop Advances in Cleaner Production, 2009.

29. SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas - proteínas das proteínas do leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 397-409, dez. de 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-52732004000400001&lng=en&nr m=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732004000400001&lng=en&nr m=iso)>. Acesso em 05 mar. 2019.

30. FITZSIMONS, S. M.; MULVIHILL, D. M.; MORRIS, E. R. Denaturation and aggregation processes in thermal gelation of whey proteins resolved by differential scanning calorimetry. **Food Hydrocolloids**, v.11, n.4, p. 62-69, 2006.

31. BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 76 de 26 de novembro de 1986. Dispõe sobre os métodos analíticos de bebidas e vinagre. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 28 nov. 1986. Seção 1, pt. 2.

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

33. NEFFE-SKOCINSKA, K. et al. Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. **CyTA Journal of Food**, v. 15, n. 4, 2017. Disponível em: . Acesso em: 9 dez. 2017.

34. MALBAŠA, R. V.; LONČAR, E. S.; DJURIĆ, M. Comparação dos produtos da fermentação de Kombucha em sacarose e melão. **Food Chemistry**, v. 106, n. 3, p. 1039-1045, 2008.

35. BRASIL. **Instrução Normativa para Estabelecer o Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha**, n. 41 de 17 de setembro de 2019.. Brasília, 19 dez. 2019. Ed. 181, seção 1, p.13.

36. Iličić M, Kanurić K, Milanović S, Lončar E, Djurić M, Malbaša R. Lactose fermentation by Kombucha – a process to obtain new milk-based beverages. *Romanian Biotechnological Letters* 2012; v. 17, n. 1, p. 7013-7021.

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

38. MENDES, D. P. G. **Características físico-químicas e microbiológicas e aceitação sensorial de leites fermentados por bactérias produtoras de ácido láctico isoladas de queijo coalho de Pernambuco**. [Dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2011, 63p.

39. FU, N. et al . Anti-foot-and-mouth disease virus effects of Chinese herbal kombucha in vivo. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo , v. 46, n. 4, p. 1245-1255, Dec. 2015 . Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822015000401245&lng=en&nr m=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822015000401245&lng=en&nr m=iso)>. Acessado em 5 Set. 2019.

40. FILIPPIS, F. de; TROISE, A. D.; VITAGLIONE, P.; ERCOLINI, D. Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. **Food Microbiology**, v. 73, p. 11-16, 2018

41. REISS, J. Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. **Z Lebensm Unters Forsch**, v. 198, p. 258-261, 1994.
42. CHAKRAVORTYA, 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, 63-72, 2016.
43. BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa n. 146 de 23 de outubro de 2007. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados. Diário Oficial da União, 24 out. 2007. Seção 1, p.5.
44. RIBEIRO, O. A. S. *et al.* Bebida láctea fermentada formulada com camellia sinensis. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 32, n. 2, dec. 2014. ISSN 19839774.
45. THAMER, Karime Gianetti; PENNA, Ana Lúcia Barretto. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 589-595, Set. 2006.