



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, CAMPUS FLORIANÓPOLIS
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ALANA CÂMARA GUIMARÃES

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA USANDO SCOBY DE
KOMBUCHÁ EM EXTRATO PRODUZIDO COM SUBPRODUTO DE ACEROLA
VERDE**

FLORIANÓPOLIS - SC

2022

ALANA CÂMARA GUIMARÃES

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA USANDO
SCOPY DE KOMBUCHÁ EM EXTRATO PRODUZIDO COM SUBPRODUTO
DE ACEROLA VERDE**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Engenharia de
Alimentos da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do título
de Mestre em Engenharia de Alimentos
Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Poletto
Coorientadora: Dra. Karina Cesca

FLORIANÓPOLIS - SC

2022

ALANA CÂMARA GUIMARÃES

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA USANDO
SCOPY DE KOMBUCHÁ EM EXTRATO PRODUZIDO COM SUBPRODUTO
DE ACEROLA VERDE**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a), Dr.(a) Patrícia Poletto – presidente – Instituição UFSC

Prof., Dr. Maikon Kelbert – membro interno – Instituição UFSC

Prof.(a), Dr.(a) Ana Lucia Fernandes Pereira – membro externo – Instituição
UFMA

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Engenharia de Alimentos.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.(a), Dr.(a) Patrícia Poletto
Orientador(a)

Florianópolis - SC
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

GUIMARAES, ALANA

PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA USANDO
SCOBY DE KOMBUCHÁ EM EXTRATO PRODUZIDO COM SUBPRODUTO DE
ACEROLA VERDE / ALANA GUIMARAES ; orientadora, Patrícia
Poletto, coorientadora, Karina Cesca, 2022.

66 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Kombuchá. 3. Tamanho de
inóculo. 4. Celulose bacteriana. 5. Hidrólise enzimática. I.
Poletto, Patrícia. II. Cesca, Karina . III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Este trabalho é dedicado aos meus colegas de classe e aos meus queridos pais.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento especial para meus pais e minha família que sempre me apoiou e me incentivaram a ser o que eu sempre sonhei, mestre e doutora. Aos meus amigos que foram meu farol durante essa jornada, que me ajudaram diretamente e indiretamente no campo da pesquisa e pessoal. Aos meus amigos do laboratório que me auxiliaram nas análises e fez minha alegria durante meus trabalhos.

A minha orientadora, Dra. Patrícia Poletto, pela escolha do tema, ensinamentos e paciência. A minha coorientadora Dra. Karina Cesca e meu amigo Eduardo Leonarski pelos ensinamentos, por ter aceitado esse desafio e me ajudado a alcançar o fim da dissertação.

Ao professor Dr. Boris Stambuk e seu orientando Eduardo, pelo auxílio na realização de algumas análises.

À banca composta por Dr. Maikon Kelbert e Dra. Ana Lucia Fernandes Pereira pela disponibilidade e contribuições.

A Central de análises (EQA) e aos laboratórios LIEB, LATESC, LABSEM. Agradeço a CAPES pelo suporte financeiro, a Universidade Federal de Santa Catarina e ao PPGEAL por ter a oportunidade de fazer parte deste programa maravilhoso.

Todo mundo tem uma fase de kombuchá, na qual cria uma barreira que impede a entrada de algo na sua vida, sendo boa ou ruim. Mas está tudo bem, contanto que faça você aprender com isso e não se isolar do mundo (GUIMARÃES, Alana, 2022).

RESUMO

Kombuchá é uma bebida doce à base de chá (*Camellia sinensis*) fermentado. Quando outro extrato é utilizado para a fermentação, a bebida passa a ser denominada tipo-kombucha. Além da produção da kombuchá, ocorre a formação de celulose bacteriana (bc) durante a fermentação, a qual tem sido pouco estudada em termos de reutilização. Neste estudo, foi avaliado a produção e aplicação da celulose fermentada na bebida tipo-kombuchá com 5% (m/v) de extrato de acerola verde (AV). Em termos de produção da BC, foram avaliadas o tempo (idade) do inóculo e suas concentrações, sendo o tempo de 3, 6, 9 e 12 dias e concentrações de 2,5%, 5%, 7,5% e 10% de inóculo. Posteriormente, foi realizada a produção de BC nas concentrações de açúcar, 20, 30, 50 e 70 g/L, nas melhores condições de tempo e concentrações de inóculo. Com relação a hidrólise enzimática da BC, foram avaliados por 48h dois métodos: com e sem etapas de adsorção-separação. Na etapa de adsorção, foi adicionado a enzima (Celluclast®) juntamente com a BC em solução com pH neutro, e mantido em agitação (150 rpm) por 3 h na temperatura de 10 °C. Posteriormente a BC foi submetida a hidrólise enzimática, pelo método sem adsorção (48h) e com adsorção-separação em ciclos: 1 (48h), 2 (24h, 24h), 3 (12h, 24h, 24h), e 4 (6h, 6h, 12h, 24h). Os hidrolisados foram avaliados quanto ao rendimento da hidrólise pela produção de celobiose e glicose (g/L). O processo para obtenção dos melhores parâmetros de tempo e concentrações de inóculo resultou em 6 dias de fermentação com adição de inóculo de 7,5% (v/v), produzindo um total de 0,8 g/L de BC. Já nas condições de tempo e concentrações de inóculo, a maior produção de BC (2,2 g/L) foi alcançada quando adicionado 70 g/L de açúcar. Foi observado na hidrólise enzimática que o método sem adsorção apresentou melhor resultado (31,7% no rendimento), enquanto os ciclos apresentaram um aumento no rendimento conforme a maior quantidade de ciclos, sendo para 4 ciclos igual a 15,57%. O rendimento da hidrólise foi comprometido possivelmente pela realização das lavagens, nas quais podem ter diminuído a concentração da enzima. Com isso, o subproduto de AV apresentou potencial para a produção de celulose bacteriana, além disso, essa BC também apresentou potencial de utilização para produção de açúcares (principalmente celobiose) através da sua hidrólise enzimática.

Palavras-chave: Fermentação. Celulose bacteriana. Hidrólise enzimática. Celobiose.

ABSTRACT

Kombucha is a sweet drink based on fermented tea (*Camellia sinensis*). When another extract is used for fermentation, the drink is called kombucha-type. In addition to kombucha production, bacterial cellulose (BC) formation occurs during fermentation, which has been little studied in terms of reuse. In this study, the production and application of fermented cellulose in kombucha-type beverage with 5% (w/v) of green acerola extract (AV) was evaluated. In terms of BC production, the time (age) of the inoculum and its concentrations (percentages) were evaluated, with the time being 3, 6, 9 and 12 days and percentages of 2.5%, 5%, 7.5% and 10% inoculum. Subsequently, BC production was carried out at sugar concentrations, 20, 30, 50 and 70 g/L, under the best conditions of time and inoculum percentages. Regarding the enzymatic hydrolysis of BC, two methods were evaluated for 48h: with and without adsorption-separation steps. In the adsorption step, the enzyme (Celluclast®) was added together with BC in a solution at neutral pH, and kept under stirring (150 rpm) for 3 h at a temperature of 10 °C. Subsequently, the BC was subjected to enzymatic hydrolysis, using the method without adsorption (48h) and with adsorption-separation in cycles: 1 (48h), 2 (24h, 24h), 3 (12h, 24h, 24h), and 4 (6h, 6h, 12h, 24h). The hydrolysates were evaluated for hydrolysis yield by cellobiose and glucose production (g/L). The process for obtaining the best time parameters and percentages of inoculum resulted in 6 days of fermentation with addition of inoculum of 7.5% (v/v), producing a total of 0.8 g/L of BC. In terms of time and inoculum percentages, the highest production of BC (2.2 g/L) was achieved when 70 g/L of sugar was added. It was observed in the enzymatic hydrolysis that the method without adsorption showed the best result (31.7% in yield), while the cycles showed an increase in yield according to the greater number of cycles, with 4 cycles equal to 15.57%. The hydrolysis yield was possibly compromised by performing the washes, in which the enzyme concentration may have decreased. Thus, the AV by-product showed potential for the production of bacterial cellulose, in addition, this BC also showed potential for use in the production of sugars (mainly cellobiose) through its enzymatic hydrolysis.

Keywords: Fermentation. Bacterial cellulose. Enzymatic hydrolysis. Cellobiose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo do consórcio de microrganismos presentes na Kombuchá e interações microbiana. As leveduras hidrolisam e liberam a invertase que quebra a sacarose em glicose e frutose e forma etanol e CO ₂ após o consumo do carbono, enquanto as bactérias formam uma película de celulose e outros metabolitos.	23
Figura 2. Mecanismo de ação das celulasas na hidrólise da cadeia de celulose.	32
Figura 3. Etapas de produção da kombuchá com extrato de acerola verde. Etapa 1- Produção do inóculo mãe; Etapa 2 - Inóculos com idades de 3, 6, 9 e 12 dias; Etapa 3 - Distribuição dos inóculos em concentrações de 2,5%, 5%, 7,5% e 10% (v/v), Etapa 4 – Cinética de fermentação (em triplicata) após inoculação (3, 6, 9, 12, 15 dias).....	35
Figura 4. Frascos contendo (em ordem): inóculo mãe, o inóculo de 6 dias usado na cinética de fermentação (2 frascos) e o falcon com a fermentação usando o inóculo de 6 dias (destaque para o CO ₂ produzido e celulose na parte superior).	37
Figura 5. Variação da concentração de fonte de carbono na produção da bebida tipo kombuchá produzida com extrato de AV.	38
Figura 6. Processo de purificação de celulose bacteriana (BC).	38
Figura 7. Procedimento para adsorção da endoglucanase e separação da β-glicosidase.	40
Figura 8. Procedimento de hidrólise enzimática em multiestágios após a adsorção da enzima na celulose.	42
Figura 9. Influência das concentrações do inóculo (2,5, 5, 7,5 e 10%) em diferentes idades (1 – 3, 6, 9 e 12 dias) no comportamento do pH ao longo do tempo de cultivo. .	45
Figura 10. Cinética de produção de celulose com a variação de idade e concentrações de inóculo.	48
Figura 11. Acompanhamento cinético do pH, consumo de açúcares, produção de celulose, ácido acético e etanol durante a fermentação conduzida com o inóculo de 6 dias e percentagens de 7,5 e 10 %.	50
Figura 12. Cinética de fermentação com diferentes concentrações de açúcares analisada quanto ao consumo dos açúcares e produção dos produtos da fermentação.	52
Figura 13. Comportamento das concentrações 20, 30, 50 e 70 g/L da solução de glicose/frutose no desenvolvimento de celulose bacteriana com 7,5% de inóculo fermentado em 6 dias.....	54

Figura 14. Cinética da taxa de produção de celobiose e glicose analisada nos tempos 6 h, 12 h, 24 h, 48 h e 48 h sem a etapa de adsorção-separação..... 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições de preparo e parâmetros de fermentação da kombuchá tradicional e bebidas tipo-kombuchá.	28
Tabela 2. Principais estudos de produção de celulose em bebida do tipo kombuchá ...	30
Tabela 3. Avaliação do consumo de açúcares, pH e produção de celulose nos inóculos com diferentes idades.	43
Tabela 4. Dados de consumo de açúcares após 15 dias de fermentação usando os inóculos com idade de 3, 6, 9 e 12 dias e porcentagem de inóculo de 2,5, 5, 7,5 e 10%.	47
Tabela 5. Produção de celobiose e glicose na hidrólise com um estágio sem e com “adsorção-separação” de endoglucanase e β -glicosidase após 48 h de hidrólise.	56
Tabela 6. Produção de celobiose, glicose e seus rendimentos em hidrólise enzimática com estágios (1, 2, 3 e 4) e com hidrólise enzimática sem a etapa de “adsorção-separação”	59
Tabela 7. Dados da atividade enzimática.	70
Tabela 8. Dados de atividade enzimática e taxa de retenção da enzima na celulose após a etapa de retenção.....	70
Tabela 9. Dados de absorvância, atividade enzimática, taxa de retenção de enzima e a diferença de atividade enzimática da enzima e do sobrenadante, nas amostras dos estágios 1, 2, 3 e 4 estágios após a etapa de adsorção-separação.	16

LISTA DE QUADRO

Quadro 1. Principais microrganismos predominantes no SCOBY.....	25
--	----

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

SCOBY – Cultura simbiótica de bactéria e leveduras

ABKOM – Associação Brasileira de Kombuchá

ANVISA – Agência de Vigilância Sanitária

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

HPLC – High-Performance Liquid Chromatography

AV – Borra de acerola verde do processamento de clarificação do suco

FPU – Filter Paper Unit

MEIs – Microempreendedores individuais

DNS – Ácido dinitrosalicílico

EG – Endo-1,4- β -glucanase

CBH – Celobiohidrolase

COS – Celo-oligossacarídeos

CI – Índice de cristalinidade

I3, I6, I9 e I12 – Inóculo de tipo-kombuchá com idades de 3, 6, 9 e 12 dias, respectivamente.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3.	KOMBUCHÁ.....	20
3.1	HISTÓRIA DA KOMBUCHÁ.....	20
3.2	FERMENTAÇÃO DE KOMBUCHÁ.....	21
3.2.1	Bactérias e Leveduras	23
3.2.2	Principais parâmetros da fermentação de kombuchá.....	25
3.2.2.1	Matérias-primas usadas para preparação do extrato	25
3.2.2.2	Tamanho (porcentagens) e idade do inóculo	26
3.2.2.3	Temperatura e pH	27
3.3	CELULOSE BACTERIANA - SUBPRODUTO DA KOMBUCHÁ.....	28
3.4	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS.....	31
3.4.1	Celo-oligossacarídeos	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	CULTURA STARTER.....	34
4.2	PREPARO DO EXTRATO DE ACEROLA VERDE (AV).....	35
4.3	REATIVAÇÃO DA CULTURA STARTER E PRODUÇÃO DO INÓCULO MÃE	35
4.4	AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DO INÓCULO	36
4.5	EFEITO DA IDADE E CONCENTRAÇÕES DO INÓCULO	36
4.6	VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FONTE DE CARBONO	37
4.7	METODOLOGIA ANALÍTICA	38
4.7.1	Purificação e quantificação de celulose bacteriana	38
4.7.2	pH, determinação de açúcares, ácido acético e etanol.....	39

4.8	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	39
4.8.1	Adsorção-separação de celulases.....	39
4.8.2	Taxa de adsorção-separação das celulases	40
4.8.2.1	Atividade enzimática	40
4.8.3	Hidrólise enzimática de celulose bacteriana após “adsorção-separação” de celulases	41
4.8.4	Hidrólise enzimática com multiestágios para produção de celobiose	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS INÓCULOS COM DIFERENTES IDADES.....	43
5.2	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA IDADE E DA PORCENTAGEM DE INÓCULO NA FERMENTAÇÃO DA KOMBUCHÁ	44
5.2.1	Efeito sobre o pH.....	44
5.2.2	Efeito sobre o consumo de açúcares e formação de celulose	46
5.2.3	Avaliação da cinética de consumo de açúcares e produção de metabólitos de fermentação	49
5.3	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR NA FERMENTAÇÃO.....	51
5.3.1	Produtos da fermentação.....	51
5.3.2	Produção de celulose	53
5.4	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	54
5.4.1	Taxa de retenção de enzima.....	55
5.4.1.1	Hidrólise de 1 estágio	55
5.4.2	Hidrólise enzimática com Múltiplos estágios.....	58
6	CONCLUSÃO.....	61
	REFERÊNCIAS	63
	ANEXO.....	69

1 INTRODUÇÃO

A kombucha é uma bebida de origem asiática que se tornou popular em todo o mundo nos últimos anos (CHAKRAVORTY et al., 2016; JAYABALAN et al., 2007). Sua produção requer a fermentação do chá verde ou chá preto (*Camellia sinensis*) por um consórcio de bactérias e leveduras (SCOBY) que resulta na produção de uma bebida benéfica a saúde (BORTOLOMEDI; PAGLARINI; BROD, 2022). Além disso, as características da bebida podem variar de acordo com alguns parâmetros: tipo de chá ou matéria-prima, microrganismos presentes no SCOBY, além do tempo e temperatura de fermentação (CHAKRAVORTY et al., 2016; JAYABALAN, et al., 2014).

A mudança das características da bebida através da alteração dos parâmetros de fermentação pode levar há uma gama novos de produtos. Quando a matéria-prima é substituída, a bebida passa a ser chamada de bebida tipo-kombuchá, uma vez que o chá deixa de ser o meio de fermentação (LEONARSKI et al., 2021a). A demanda por novos produtos tem atraído o uso de novas matérias-primas para produção da bebida tipo-kombuchá, como outros tipos de chás (não pertencentes à família *Camelia sinensis*), frutas, ervas, leite e seus derivados, café, além de uma ampla variedade de subprodutos agroindustriais, principalmente subprodutos das indústrias de frutas (LEONARSKI et al., 2022; LIU et al., 2022; MIRANDA et al., 2022).

Dentre os subprodutos estudados, a acerola proveniente do processamento do suco apresentou-se como alternativa para a substituição do chá. O extrato de acerola possui alto teor de compostos funcionais: vitamina C, compostos fenólicos, atividade antioxidante (LEONARSKI et al., 2021). No estudo de Leonarski et al., (2021a), os autores obtiveram a bebida tipo kombuchá para estudos dos teores de compostos bioativos, ocasionando num possível aumento da velocidade do metabolismo dos microrganismos, levando há uma maior produção de metabólitos, principalmente a celulose bacteriana (BC). Os autores avaliaram as melhores concentrações de substrato (subproduto da acerola) para obtenção da bebida tipo-kombuchá apresentando melhor resultados na concentração 5% de extrato de acerola.

Além do substrato, outros parâmetros da fermentação podem ser avaliados para melhorar a produção dos metabólitos. O tempo (ou idade) do inóculo e a sua concentração (porcentagens) também são fatores fundamentais pois correspondem à uma fração da produção já fermentada que contém consórcios de microrganismos

importantes para a próxima fermentação (YANTI; AHMAD; MUHIDDIN, 2018). Portanto, o estudo da idade e concentrações do inóculo pode ser essencial para diminuir custos sem comprometer o sabor, a produção da bebida e ainda assim apresentar alta produção da BC.

A popularidade da kombucha ocasionou numa ampliação na produção da bebida de maneira que houvesse uma maior produção de BC, sendo este considerado subproduto da bebida (SILVA. M., 2021). A BC é uma película formada pelas bactérias ácido acéticas, que cresce na superfície da bebida e é comumente descartada após a produção. Na literatura, a celulose é um atrativo nas aplicações de áreas nanotecnologia, biomédicas, culinária e em embalagens (BORTOLOMEDI; PAGLARINI; BROD, 2022).

Além das aplicações citadas anteriormente, uma alternativa seria a obtenção de açúcares (principalmente celobiose e glicose) através da hidrólise da BC. Alguns estudos têm focado na hidrólise enzimática de BC para produzir nanocristais de celulose e glicose (AUTA et al., 2017; BRANDES et al., 2020; ROVERA et al., 2018). Este processo é interessante de se estudar uma vez que a BC é um polissacarídeo linear composto por unidades de glicose ligadas por ligações β -1,4-glicosídicas, com alta pureza, cristalinidade e grau de polimerização, além de possuir hidrofiliabilidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, e ampla modificabilidade (PENTTILÄ et al., 2018, KASHCHEYEVA et al., 2019).

Com isso, tem-se que os resultados obtidos pelo estudo de Leonarski et al. (2021a) com relação a melhor quantidade de subproduto da acerola (5% m/m) foram levados em consideração para obter maiores quantidades de BC em nosso estudo. Com isso, foram avaliados o melhor tempo (idade) e concentração (porcentagens) do inóculo, a fim de se obter uma melhor otimização do processo. Além disso, visando a reutilização da BC, também foi realizado hidrólise enzimática desse subproduto com objetivo a obtenção de açúcares (celobiose e glicose).

2 OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção da celulose bacteriana de fermentação de bebida tipo-kombuchá utilizando subproduto de acerola verde e utilizá-la na produção de açúcares (celobiose e glicose) pelo método de hidrólise enzimática.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da idade do inóculo (3, 6, 9 e 12 dias) no consumo de açúcar e na produção de celulose durante a fermentação da bebida;
- Avaliar o efeito das concentrações de inóculo (2,5%, 5%, 7,5% e 10%) na cinética de produção de celulose bacteriana, pH e consumo de açúcar durante a fermentação da bebida;
- Avaliar o efeito da fonte de carbono nas concentrações 20, 30, 50 e 70 g/L durante a fermentação da bebida;
- Comparar os rendimentos de hidrólise da celulose em celobiose usando a estratégia de adsorção-separação de endoglucanases e β -glicosidases.

3. KOMBUCHÁ

3.1 HISTÓRIA DA KOMBUCHÁ

A Kombuchá ou chá kombuchá é uma bebida fermentada refrescante com um sabor levemente doce, ácido e não alcoólica. A bebida é tradicional, cercada por mistérios de como foi criada e isso levou a ter uma popularidade especial (CHAKRAVORTY et al., 2016). É geralmente preparada fermentando chá preto adoçado com um consórcio simbiótico de bactérias do ácido acético e diferentes leveduras conhecida com SCOBY (AYED; BEN ABID; HAMDI, 2017).

A kombuchá se originou na Manchúria em 220 aC e depois se espalhou para o resto do mundo (ESSAWET et al., 2015; JAYABALAN; MALBAŠA; SATHISHKUMAR, 2016). Seu nome, kombuchá, teria chegado após a expansão pelo mundo com a junção do nome do médico Kombu mais a palavra japonesa para chá (Kombu 'Cha). Do Japão, a popularidade do Kombuchá expandiu para a Rússia por meio de rotas comerciais com o nome 'Mo-Gu'. Depois de popularizada em outros países do leste europeu, a Kombuchá apareceu na Alemanha durante o século XX. Durante a Segunda Guerra Mundial, a Kombuchá foi novamente introduzida na Alemanha e depois na França na década de 1950, seguido pelo norte da África, dominado pela França. A kombuchá ganhou popularidade na Itália (chamada "funkochinesa") após a Segunda Guerra Mundial (JAYABALAN; MALBAŠA; SATHISHKUMAR, 2016).

Durante a década de 1960, os pesquisadores da Suíça relataram que o hábito de beber Kombuchá era benéfico tanto quanto o consumo de iogurte. Esta declaração aumentou drasticamente a popularidade do chá Kombuchá (JAYABALAN; MALBAŠA; SATHISHKUMAR, 2016).

A primeira Kombuchá envasada e comercializada se deve à GT Dave, um adolescente Americano, que na época de 1990 envasou a Kombuchá que sua mãe fazia e comercializou em lojas de produtos naturais e com isso uma indústria milionária foi criada. Hoje a marca GTS é uma das marcas de Kombuchá mais reconhecidas nos EUA. Já nos anos 2000 houve um grande aumento no número de marcas produzindo Kombuchá nos EUA. Atualmente, sua popularidade intensificou o mercado americano, sendo possível encontrar centenas de marcas artesanais (PUCCINELLI, 2019).

Essa demanda não se manifesta apenas em âmbito doméstico, já que uma maior preocupação com a saúde alimentar é notável, especialmente entre os jovens millennials

(nascidos no final da década de 90, início do século vinte e um). Nos EUA, 66% desse público consome bebidas e outros alimentos probióticos. Além disso, houve uma grande expansão de 42% nesse setor na economia norte-americana, na virada do ano de 2017 para 2018 (PICCIRILLI, 2019).

O kombuchá começou a ser consumido no Brasil de forma artesanal, e atualmente a bebida apresenta um enorme potencial de desenvolvimento nas indústrias de pequeno porte. A produção industrial da bebida é feita com autorização da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) (CITRUS BR, 2018). Então, foi regulamentada a Instrução Normativa, nº 41 de 17 de setembro de 2019 do MAPA (MAPA, 2019), que define: “Kombuchá como bebida fermentada, sendo obtida por respiração aeróbia e fermentação anaeróbia do mosto obtido pela infusão ou extrato de *Camellia sinensis* e açúcares por cultura simbiótica de bactérias e leveduras microbiologicamente ativas (SCOBY)”.

Segundo uma publicação da CITRUSBR (2018) (CITRUS BR, 2018), as empresas de pequeno porte têm uma produção média de 2 mil a 5 mil garrafas por mês ou 25 mil litros por mês, com média anual de crescimento de 25%. O site de notícias nacionais, G1 (2021) diz em uma reportagem que a kombuchá foi a atividade que mais cresceu entre os Microempreendedores individuais (MEIs), quase 70% no último ano. Esse crescimento se deve ao seu alto consumo estar relacionado à saúde e o bem-estar pessoal e a busca por alimentos mais saudáveis durante a época de pandemia ((G1), 2021).

A Kombuchá apresenta variedades de substâncias e uma série de propriedades benéficas. A presença desses compostos biologicamente ativos está ligada principalmente as substâncias com atividades antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena, antiviral e antiobesidade obtendo uma bebida benéfica a saúde (BORTOLOMEDI; PAGLARINI; BROD, 2022).

3.2 FERMENTAÇÃO DE KOMBUCHÁ

A composição da Kombuchá depende de muitos fatores, como as matérias-primas utilizadas e a fonte de carbono, a concentração do chá, a composição microbiana do SCOBY, o tempo e a temperatura da fermentação e o pH do processo. Quaisquer mudanças nesses parâmetros afetam a qualidade do produto, suas propriedades nutricionais, biológicas e sensoriais. Até a dureza da água utilizada afeta as

propriedades funcionais das bebidas (EMILJANOWICZ; MALINOWSKA-PAŃCZYK, 2019).

Normalmente, a kombuchá é preparada pela fermentação do chá preto ou verde açucarado adicionado à cultura simbiótica de microrganismos (SCOBY). Além disso, também pode ser fabricada com diferentes tipos de chá e fontes de carbono (PEI et al., 2020). A composição de leveduras e bactérias no SCOBY de Kombuchá é altamente variável. Os principais microrganismos já isolados são as bactérias de ácido acético, leveduras e *Lactobacillus* (ASHRAFI; JOKAR; MOHAMMADI NAFCHI, 2018; EMILJANOWICZ; MALINOWSKA-PAŃCZYK, 2019; VILLARREAL-SOTO et al., 2018).

A produção da bebida Kombuchá consiste na adição de chá e açúcar e pequena quantidade de starter do Kombuchá, geralmente, é utilizada 10% (v/v) de inóculo da bebida recém-cultivada (14 dias) com o mesmo meio (BHATTACHARYA; GACHHUI; SIL, 2013). Assim, a nova bebida terá o líquido que contém leveduras e bactérias da bebida madura de uma fermentação anterior contribuindo para a fermentação da nova (TRAN et al., 2020).

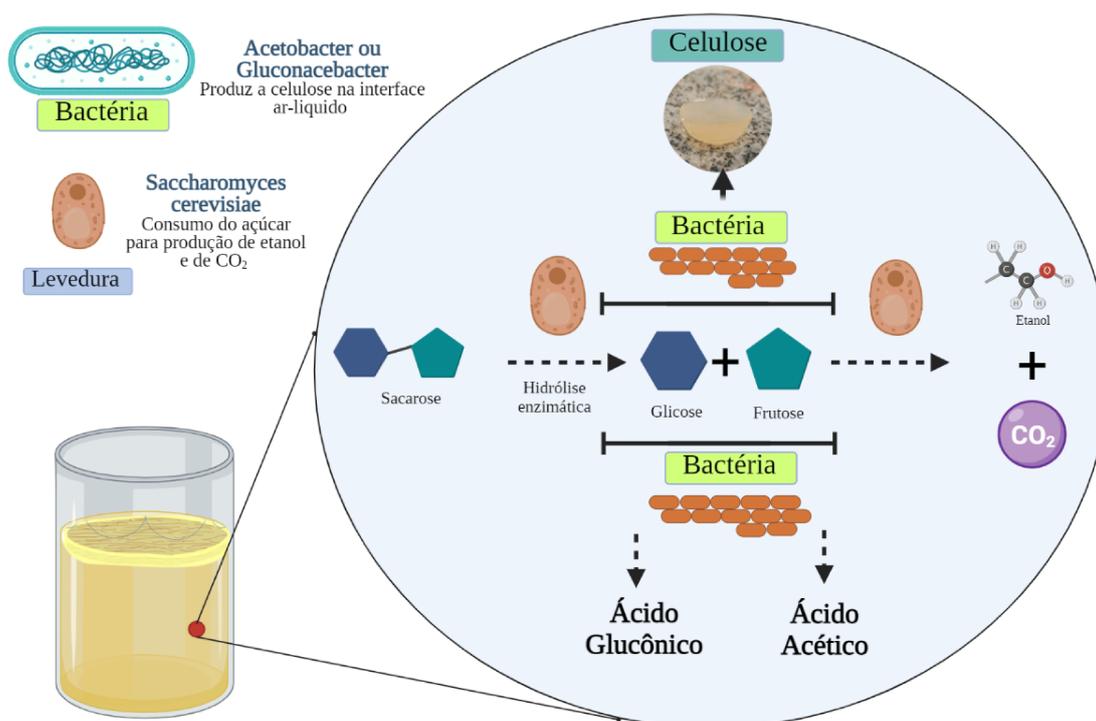
De forma geral, as leveduras começam a quebrar a sacarose através da hidrólise extracelular pela enzima invertase. Os monossacarídeos liberados levam a interações cooperativas e competitivas entre os microrganismos gerando a produção de diferentes produtos característicos da fermentação de kombuchá como etanol, ácido acético e celulose (Figura 1) (TRAN et al., 2020). Para isso, as leveduras convertem o açúcar em etanol pela via metabólica da glicólise. As bactérias do ácido acético convertem a glicose em ácido glucônico e a frutose em ácido acético. O ácido acético estimula a levedura a produzir etanol, e a presença de etanol facilita o crescimento de bactérias do ácido acético e, portanto, a produção de ácido acético. Foi relatado que o etanol e o ácido acético possuem atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas (AYED; BEN ABID; HAMDI, 2017).

Ainda, pode ocorrer a formação de metabólitos antimicrobianos, produtos secundários, produzidos durante a fermentação, que podem inibir outros microrganismos e induzir características probióticas benéfica à saúde humana, por exemplo, quercetina e procianidina (BRANDÃO, 2021; METAB; COMERCIAL, [s.d.]). A diminuição do pH, está relacionada ao ácido acético liberado pela bactéria acética. Com isso, há a geração de uma barreira física que inibe o crescimento de

competidores, na qual essa concentração de ácidos influencia positivamente no potencial antimicrobiano, o que indica que a atividade antibacteriana está associada à acidez, mas também a outros metabólitos biossintetizados durante o processo de fermentação (CONTEXTO et al., 2020).

Além do ácido acético, durante a fermentação da kombuchá são produzidos diferentes componentes, devido à presença de várias cepas de bactérias e leveduras. Etanol, ácido lático e glucurônico são os produtos mais comuns encontrados na fermentação do kombuchá. A bebida final também contém grande quantidade de polifenóis derivados do chá (LEONARSKI et al., 2021a).

Figura 1. Metabolismo do consórcio de microrganismos presentes na Kombuchá e interações microbiana. As leveduras hidrolisam e liberam a invertase que quebra a sacarose em glicose e frutose e forma etanol e CO₂ após o consumo do carbono, enquanto as bactérias formam uma película de celulose e outros metabólitos.



Adaptado de (TRAN et al., 2020; VILLARREAL-SOTO et al., 2018). (Figura criada com Biorender.com).

3.2.1 Bactérias e Leveduras

As bactérias dominantes da cultura do chá de Kombuchá são ácido acéticas, que são bactérias aeróbias que usam o álcool e o açúcar como substrato para formar ácido acético. Seu crescimento e atividade requerem grandes quantidades de oxigênio. Assim, o processo metabólico ocorre na conversão do acetaldeído em etanol e do

hidrato de acetaldeído em ácido acético pela enzima acetaldeído desidrogenase (COELHO et al., 2020; JAYABALAN; MALBAŠA; SATHISHKUMAR, 2016). Dentre as bactérias acéticas a *Acetobacter xylinum* e *Komagataebacter xylinus* destacam-se, devido a oxidação da glicose em ácido glucônico e a formação do biofilme de celulose que permanece na superfície do líquido (COELHO et al., 2020; VILLARREAL-SOTO et al., 2018).

O caminho da biossíntese de celulose nas bactérias é complexo e consiste em várias etapas. Os substratos na biossíntese podem ser glicose, frutose, etanol, ácido acético, ácido cítrico ou glicerol. As transformações enzimáticas levam à formação de fibrilas de celulose que se combinam para formar cadeias, depois macrofibrilas e, finalmente, uma estrutura 3D de cerca de 1000 cadeias de glucana separadas. A celulose tem uma excelente capacidade de armazenar água - pode conter até 200 vezes mais água do que sua massa seca (EMILJANOWICZ; MALINOWSKA-PAŃCZYK, 2019; VILLARREAL-SOTO et al., 2018).

As leveduras desempenham um papel importante durante a transformação do açúcar em etanol, dióxido de carbono e centenas de outros produtos secundários (CHEN et al., 2018). Existem muitos gêneros e espécies de leveduras na cultura Kombuchá. A maioria das espécies de leveduras pode fermentar açúcar em etanol e geralmente são utilizadas as leveduras *Saccharomyces* por sua eficiência. Além delas, são muito utilizadas as não-*Saccharomyces* na indústria de fermentações mistas (VILLARREAL-SOTO et al., 2018). As leveduras não-*Saccharomyces* desempenham papéis relevantes no impacto metabólico, composição de antocianinas e complexidade aromática dos produtos (CHEN et al., 2018).

Em estudos sobre a fermentação do chá kombuchá afirmam que as espécies de leveduras presentes na cultura são fundamentais, pois favorecem as bactérias produtoras de celulose (MOHAMMADSHIRAZI; BAGHERI KALHOR, 2016; PEI et al., 2020; VILLARREAL-SOTO et al., 2018). As leveduras tornam as fontes de carbonos disponíveis, quebrando açúcares complexos em moléculas mais simples e aumentando acidez do caldo como subprodutos do processo metabólico, principalmente em meios sintéticos, pois não há ajuste de pH. Além disso, podem “armazenar” fonte de carbono dentro da matriz fibrilar de celulose bacteriana, criando assim um suprimento de nutrientes que pode ser utilizado quando a fonte no caldo estiver esgotada. Isso poderia explicar o desenvolvimento mais rápido e consistente de películas de culturas

iniciadoras de Kombuchá (WOOD et al., 2022). O Quadro 1 mostra as principais bactérias e leveduras vistas na literatura, que compõe o SCOBY para a fermentação do kombuchá.

Quadro 1. Principais microrganismos predominantes no SCOBY.

MICROORGANISMOS		
BACTÉRIAS DE ÁCIDO ACÉTICO	LEVEDURA	<i>Lactobacillus</i>
<i>Acetobacter pasteurianus</i> <i>Acetobacter xylinum</i> ; <i>Komagataebacter xylinus</i> <i>Acetobacter xylinoides</i> <i>Bacterium gluconicum</i> <i>Acetobacter ketogenum</i> <i>Acetobacter suboxydans</i> <i>Gluconobacter liquefaciens</i> <i>Gluconacetobacter Kombucháe sp</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Acetobacter acetiformis</i> <i>Acetobacter aceti</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces inconspicuus</i> <i>Lutheran S. ludwigii</i> <i>Schizosaccharomyces pombe</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Candida krusei</i> <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>Lactococcus</i>
<p>Fonte:(ASHRAFI; JOKAR; MOHAMMADI NAFCHI, 2018; AYED; BEN ABID; HAMDI, 2017; EMILJANOWICZ; MALINOWSKA-PAŃCZYK, 2019; MAIA et al., 2020; MOHAMMADSHIRAZI; BAGHERI KALHOR, 2016; PEI et al., 2020; VILLARREAL-SOTO et al., 2018)</p>		

3.2.2 Principais parâmetros da fermentação de kombuchá

A fermentação de bebidas tipo kombuchá depende de uma relação complexa envolvendo uma variedade de fatores como o matéria-prima usada na preparação do extrato (chá, ervas, frutas, etc), concentração de inóculo, período de fermentação fonte de carbono, fonte de nitrogênio, pH e temperatura.

3.2.2.1 Matérias-primas usadas para preparação do extrato

Tradicionalmente, as matérias-primas usadas para fazer a kombuchá são o chá verde e o chá preto. No entanto, foram estudadas várias outras matérias-primas, incluindo infusões com outros tipos de ervas, o uso de sucos ou extratos de frutas e hortaliças, também resíduos da indústria alimentícia. A Tabela 1 apresenta uma série de matérias-primas incluindo resíduos do processamento de acerola, também usada neste trabalho.

A acerola apresenta grandes quantidades de resíduos, dentre 15 e 41% do volume total de acerola produzida são casca, sementes e polpa (resíduos) que contém alto valor biológico (polifenóis, carotenoides e vitamina C) (ALVES BORGES et al., 2021; LEONARSKI et al., 2022). Os resíduos de frutas, assim como aqueles gerados na produção de suco de acerola ainda possuem diversos compostos, principalmente

polifenóis que trazem o apelo antioxidante das kombuchá. A utilização do substrato de acerola na preparação da bebida tipo kombuchá pode ajudar a aumentar a resposta imune humana, aumentando as propriedades promotoras de saúde já associadas à bebida tradicional (LEONARSKI et al., 2021).

No estudo de LEONARSKI et al. (2021) por exemplo, a concentração de resíduo de suco de acerola (borra) usada na preparação do extrato foi estudada. A borra, é proveniente da etapa de decantação do suco de acerola verde, constituído basicamente de polpa residual. Os autores observaram que a produção de ácido acético e produção de celulose bacteriana era maior quanto maiores concentrações de borra eram usadas. Isso foi relacionado ao aumento do teor de polifenóis e vitamina C liberado no meio de fermentação que possivelmente induziu a um aumento no metabolismo dos microrganismos. Portanto, nesse estudo a mesma concentração de borra de acerola foi usada nas fermentações.

3.2.2.2 Tamanho (concentrações) e idade do inóculo

O estudo do impacto e do comportamento da fermentação de kombuchá com diferentes culturas e concentrações de inóculos adicionado é muito visto na literatura, principalmente em relação a produção de celulose bacteriana e como afeta a população microbiana (WOOD et al., 2022). O starter de cultura ou inóculo é um componente fundamental na produção da bebida (YANTI; AHMAD; MUHIDDIN, 2018). O inóculo usado em kombuchá corresponde a uma fração de uma bebida já fermentados e do SCOBY formado por um período de 7 a 10 dias (BHATTACHARYA; GACHHUI; SIL, 2013). A maioria dos estudos de produção da bebida e produção de celulose adicionam cerca de 2 a 10% de starter para fermentação (Tabela 1). A utilização da película e uma fração da bebida como starter é devido a comunidade microbiana dentro das fibras celulósica e na bebida, quando ainda estão em metabolismo ativo (WOOD et al., 2022), (CHAKRAVORTY et al., 2016), (MARSH et al., 2014).

No trabalho de Yanti et al. (2021) a influência de concentrações de inóculo (5, 10, 15, 20, 25 e 30%) e período de fermentação (5, 10, 15 e 20 dias) na produção de celulose a partir resíduos líquidos de sagu fermentados pela bactéria *Acetobacter xylinum* LKN6 foram analisados. Os autores comentam que a maior quantidade de celulose produzida foi obtida em 15 dias e na cultura que continha 25% de inóculo, concluindo que os fatores (concentrações de inóculo e o período de fermentação) podem

influenciar na produção, pois a glicose se torna escassa em um longo período de tempo diminuindo a produção de celulose (YANTI; AHMAD; MUHIDDIN, 2018).

3.2.2.3 Temperatura e pH

A utilização de temperaturas entre 25 e 30 °C no período de incubação de fermentação é a temperatura ideal utilizadas nas pesquisas para a produção de celulose bacteriana. A literatura relata que a temperatura entre 30 °C é considerado temperatura ótima para as enzimas envolvidas nas sínteses de celulose. Se há um aumento da temperatura, a fase lag se prolonga e causa a diminuição do crescimento celular. Dentre outros estudos da bebida e de produção de celulose, pesquisas citam que as *Komagataeibacter xylinus*, *Komagataeibacter saccharivorans* e *Komagataeibacter* sp. são utilizadas em temperatura de 30 °C para uma melhor produção de celulose bacteriana (AVCIOGLU; BIRBEN; SEYIS BILKAY, 2021^a; ABEL; ANDRESON, 2020; VILLARREAL-SOTO et al., 2021).

Além da temperatura outro fator seria o pH, onde ele desempenha um papel fundamental na síntese de celulose. A utilização de um pH ótimo não compromete o crescimento microbiano ajudando o composto de microrganismos a sintetizar a celulose durante a fermentação da bebida. O pH ótimo do meio de cultura para produzir celulose bactéria está abaixo de 4,0. Em outras pesquisas, os autores citam que a diminuição do pH está associado ao acúmulo de ácidos glucônico, acético ou lático no caldo de cultura (YANTI; AHMAD; MUHIDDIN, 2018).

Tabela 1. Condições de preparo e parâmetros de fermentação da kombuchá tradicional e bebidas tipo-kombuchá.

Substrato	Açúcar	Inóculo	Tempo e temperatura	Referência
Folha de louro mexicana (<i>Litsea glaucescens</i>)	10 g/L	100 mL	10 dias/ 25°C	(FLORES-RUEDA, 2016)
Chá preto	100g/L	20% (v/v)	14 dias/ 24°C	(BHATTACHARYA; GACHHUI; SIL, 2013)
Fruta de cobra (<i>Salacca zalacca</i>)	100g/L	1:10 (p/p)	14 dias / 25°C	(ZUBAIDAH et al., 2018)
Chá verde/ louro cereja Chá verde/ framboesa vermelha	60g/L	10% (v/v)	14 dias/ 28°C	(ULUSOY; TAMER, 2019)
Chá verde/ ameixeira-brava Chá verde/ cenoura preta Chá verde/ extrato de CoffeeBerry	70g/L	10% (v/v)	9 dias/ 28°C	(ESSAWET et al., 2015)
Chá verde/ canela Chá verde/ cardamomo	6,5% (p/v)	4%	16 dias/ 28°C	(SHAHBAZI et al., 2018)
Chá verde/ Tomilho Shirazi Goji berry vermelha (<i>Lyciumbarbarum</i> L.)	60g/L	10 %	2 dias/ 28°C	(ABUDUAIBIFU, 2019)
Romã Uva vermelha Cereja azeda Maçã	20 g/L	2%	14 dias/ 27°C	(AKBARIRAD et al., 2017)
Resíduos de Sagu	-	5, 10, 15, 20, 25 e 30% (v/v)	5, 10, 15, 20 dias/ 28-30 °C	(YANTI; AHMAD; MUHIDDIN, 2018)
Chá verde (cultura comercial)	50g/L	1g de levedura	21, 14 e 7 dias / 28-30°C	(ABEL; ANDRESON, 2020)

3.3 CELULOSE BACTERIANA - SUBPRODUTO DA KOMBUCHÁ

Dentre os vários compostos benéficos encontrados e produzidos pelos microrganismos, a associação das bactérias e leveduras também produzem um biofilme flutuante que se encontra na superfície da bebida (VILLARREAL-SOTO et al., 2021). O biofilme torna-se mais espesso durante a fermentação, sendo formadas camadas semelhantes a panquecas (RAMÍREZ TAPIAS et al., 2022). A função dessa película é proteger as várias espécies de microrganismos (Tabela 2) encontrada no consórcio de bactérias e leveduras. A espécie *Komagataeibacter* é relatada como o gênero dominante no processo de formação do filme de celulose (VILLARREAL-SOTO et al., 2021). Ao final do processo de produção do kombuchá a celulose é considerada um subproduto e na maioria das vezes é descartado (RAMÍREZ TAPIAS et al., 2022).

A celulose bacteriana (BC) é comumente produzida a partir de um meio baseado em uma mistura de açúcares com certa concentração, pH e temperatura em torno de 3,0 e 28 °C, respectivamente (OLIVER-ORTEGA et al., 2021). A sua produção vem sendo avaliada recentemente a fim de encontrar aplicações que possam agregar valor a este produto, uma vez que grandes quantidades são produzidas durante a fermentação da bebida e pouco é reaproveitado.

A celulose produzida em kombuchá, muitas vezes chamada de fungo ou SCOBY, é descrita como uma película que cresce em diferentes tipos de chá adoçado, cultivado em condições estáticas, o qual é característico das bactérias do ácido acético (COELHO et al., 2020). Geralmente leva de 10 a 12 dias para fermentar em temperatura ambiente (BUENO; CHOULJENKO; SATHIVEL, 2021). Esses microrganismos produzem um espesso biofilme celulósico (RAMÍREZ TAPIAS et al., 2020) e os filmes são formados em camadas, sendo a camada mais próxima da superfície sempre a mais recente. Os microrganismos (bactérias e leveduras) são acomodados nessa matriz de celulose e são responsáveis pela fermentação da kombuchá (COELHO et al., 2020).

Segundo a Associação Brasileira de Kombuchá (ABKOM) foram produzidos 1,6 milhões de litros de kombuchá em 2021 até início de 2022, o que significa o crescimento do consumo a bebida e o crescimento da produção do subproduto (celulose bacteriana). Embora SCOBY presente na celulose seja amplamente utilizado como iniciador na fermentação caseira de kombuchá, não é adequado para produção em massa em escala industrial. A celulose produzida nas fermentações é descartada devido a composição microbiana variável e a alta atividade biológica que compromete a reprodutibilidade do produto final (WANG et al., 2020).

A celulose destaca-se devido às suas propriedades físico-químicas e biodegradabilidade. Ele é considerado renovável e sustentável devido às suas qualidades biopolimétrica, como por exemplo, a ausência de impurezas como pectina, lignina ou hemicelulose, alta resistência à tração e grande capacidade de armazenar água (EMILJANOWICZ; MALINOWSKA-PAŃCZYK, 2019). Essas propriedades dão as micro fibrilas da celulose alta elasticidade e resistência no estado úmido e resistência mecânica devido as ligações de hidrogênio que estabiliza a estrutura (KASHCHEYEVA et al., 2019; PENTTILÄ et al., 2018).

Devido as propriedades, as celuloses são desejáveis para diversas linhas de aplicações (EMILJANOWICZ; MALINOWSKA-PAŃCZYK, 2019). A utilização de resíduo industrial pode melhorar a competitividade de custo da produção de celulose e das suas características. A Tabela 2 mostra os principais estudos de produção de celulose utilizando diferentes substratos para produção da bebida kombuchá.

Tabela 2. Principais estudos de produção de celulose em bebida do tipo kombuchá

Extrato/Chá	Celulose	Tempo	O que foi avaliado	Referência
Resíduo de acerola	4 g/L	15 dias	Consumo de açúcares, variação de pH, teor de fenólicos totais e produtos (etanol, ácido acético e celulose)	(LEONARSKI et al., 2021a)
Erva doce	6,9 g/L	21 dias	Aparência Visual, Avaliação de	(RAMÍREZ TAPIAS et al., 2022)
	10,6 g/L	21 dias	Qualidade e Medições de Espessura dos Filmes	
Chá preto	3,5g/L	12 dias	Variação de pH e produtos (etanol, ácido acético e celulose)	(SOH; LEE, 2002)
	2,1 g/L	18 dias	O consumo de açúcares, variação de pH e celulose	(LEE; KIM, 2000)
Chá verde	10,3 g/L	30 dias	O consumo de açúcares, variação de pH e celulose,	(RAMÍREZ TAPIAS et al., 2022)
	3,3 g/L		propriedades químicas (FT-IR) e térmicas (DSC)	
Erva mate	6,9 g/L			
Lavanda	4,5 g/L			
Suco de abacaxi	9,0 g/L	7 dias	Variação de pH e celulose, propriedades químicas (FT-IR) e morfológicas	(RAMANA, 2015)

A celulose bacteriana vem atraindo muita atenção devido à sua nanoestrutura (VILLARREAL-SOTO et al., 2021). As celuloses formadas por culturas bacterianas é um atrativo para as diversas aplicações, de preferência as aplicações nano tecnológicas, aplicações biomédicas, ingredientes alimentícios e material de embalagem promissor. Portanto, ao selecionar os substratos, as condições de cultivo – incluindo temperatura, tempo, desenho do fermentador e tipo/concentração de açúcar (BORTOLOMEDI; PAGLARINI; BROD, 2022) - e as cepas é possível controlar importantes propriedades da celulose e o curso da biossíntese (RAMANA, 2015).

3.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS

A celulose bacteriana é a forma mais pura de celulose. As suas propriedades físico-químicas incluindo a alta resistência à tração, cristalinidade e a capacidade de retenção de água tem sido valorizada quando comparadas com a celulose vegetal e sua formação é como cadeias de glicoses forçadas através de poros presentes em seu envelope celular (KADIER et al., 2021).

A celulose bacteriana é interessante para estudos de hidrólise por ser um polissacarídeo linear composto por unidades de glicose ligadas por ligações β -1,4-glicosídicas e ter alta pureza, alta cristalinidade, grande tamanho de cristal, alto grau de polimerização, hidrofobicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, alta porosidade e ampla modificabilidade (PENTTILÄ et al., 2018, KASHCHEYEVA et al., 2019).

A hidrólise enzimática quando aplicada em celulose bacteriana normalmente é empregada como uma abordagem de baixo impacto ambiental na redução de celulose a celobiose e glicose, ou em nano cristais. São utilizadas enzimas celulolíticas e visto como um método economicamente viável quando as enzimas estão em condições de pH ideal, temperatura (PENTTILÄ et al., 2018). Dentre as enzimas comerciais, Celluclast, Accelerase, Spezyme CP e Viscoferm estão disponíveis no mercado e incluem uma variedade de enzimas que são coletivamente conhecidas como celulases, elas atingem as classes endo-1,4- β -glucanases (EG), exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH) e β -glicosidases (ROVERA et al., 2018).

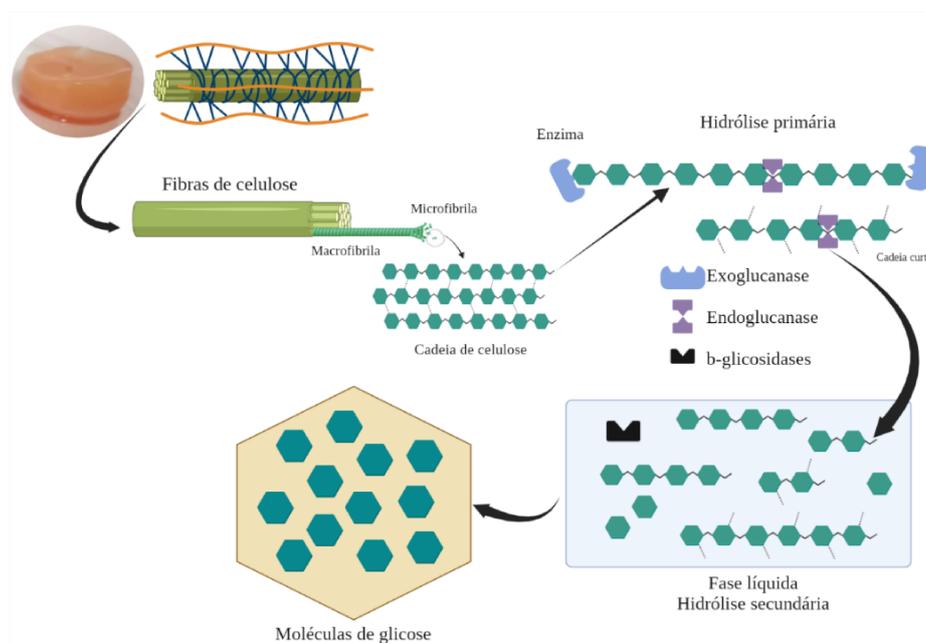
A eficiência da hidrólise enzimática da celulose vegetal, por exemplo, depende de propriedades do substrato, como índice de cristalinidade (CI), grau de polimerização (DP), porosidade, teor de umidade e a presença de constituintes não hidrolisáveis (KASHCHEYEVA et al., 2019). Já a celulose bacteriana, após a remoção de células da fermentação é celulose pura, sem a problemática dos interferentes como hemicelulose e lignina.

As endo-1,4- β -glucanases tem como alvo as cadeias de celulose longe das extremidades, degradando rapidamente as regiões amorfas para produzir fragmentos de celuloses menores. Enquanto isso, as exoglucanases ou celobiohidrolases degradam a celulose nas extremidades da cadeia, geralmente as regiões cristalinas e as curtas, produzindo dímeros de celobiose. Já as β -glicosidases, hidrolisam as unidades de celobiose que são produzidas durante a degradação da cadeia feita pela EG e CBH,

transformando-as em glicose (ROVERA et al., 2018). A atuação da celulase na cadeia celulósica para a formação de celobiose e glicose é representada na Figura 2.

Dentre estudos que usaram a hidrólise enzimática de celulose bacteriana, Rovera et al. (2018), avaliaram a influência da hidrólise enzimática na formação de celobiose e glicose, em concentrações diferentes de enzima/celulose no período de 74 h. Esse estudo é destinado também, a formação de nanocristais de celulose que vem sendo muito requisitado nas áreas de aplicação em dispositivos médicos/biomédicos, sistemas de purificação/limpeza (por exemplo, membranas), displays, materiais de construção verdes (por exemplo, painéis isolantes), e soluções de embalagem.

Figura 2. Mecanismo de ação das celulases na hidrólise da cadeia de celulose.



Adaptado de Rovera et al. (2018). (Figura criada com o Biorender.com)

3.4.1 Celo-oligossacarídeos

A celulose é um polissacarídeo complexo que é encontrado em grandes quantidades na natureza, mas é difícil de ser hidrolisado e utilizado como fonte de açúcares simples (KASHCHEYEVA et al., 2019). O celo-oligossacarídeo (COS) são moléculas de açúcar de baixo peso molecular, são sacarídeos que possuem 2 a 6 glicoses ligadas por ligações β -1,4 considerados oligossacarídeos funcionais importantes e significativos no campo alimentar (KASHCHEYEVA et al., 2019).

Os COS são amplamente utilizados em muitos setores industriais, incluindo alimentos, bebidas, farmacêuticos e cosméticos. Eles são conhecidos por suas

propriedades probióticas, que promovem a saúde de trato intestinal e ajudam a melhorar a imunidade, como aditivos em alimentos funcionais, como barras de cereais e iogurtes, para aumentar o seu valor nutricional. Além disso, os COS possuem propriedades antimicrobianas o que os torna ideais para a preservação de alimentos e como agentes terapêuticos em diversas infecções causadas por microrganismos.

Apesar de seus benefícios, a produção de COS é um desafio para a indústria, devido à complexidade do processo de obtenção e ao alto custo envolvido. A hidrólise a base de ácidos e a base de enzimas em fibras de celulose podem produzir celooligosacarídeos (COS), como a celobiose. Dentre os dois métodos de obtenção de COS a hidrólise enzimática é considerada mais atraente devido as condições de reação produzirem menos subprodutos e à clivagem ser mais controlada obtendo menos monômeros. No entanto, em uma etapa intermediária da hidrólise, a β -glicosidase hidrolisa os COS formando monômeros.

Os oligossacarídeos e os monômeros, em especial a celobiose causam inibição das enzimas envolvidas, exoglucanases e endoglucanases, devido à formação de complexos enzima-sacarídeo, causando impacto na eficiência da hidrólise (CHU et al., 2014). Porém a glicose resultante do processo hidrolítico pode ser reutilizada como substrato no meio de crescimento das bactérias ácidas que produzem celulose (ROVERA et al., 2018).

A produção de COS a partir de celulose bacteriana ainda não foi relatado. Por isso tomou-se como base estudos com celulose vegetal. O estudo de CHU et al. (2014) explorou uma abordagem eficaz para a produção de COS a partir de resíduos de espiga de milho da fabricação de xilo-oligosacarídeos. Os autores analisaram a hidrólise após a remoção seletiva de β -glicosidase da mistura comercial de celulase, usando uma estratégia de adsorção-separação. Após, a hidrólise enzimática foi realizada em múltiplos estágios com a celulase deficiente em β -glicosidase, visando aliviar a inibição por produto (celobiose) em cada estágio (CHU et al., 2014).

No entanto, apesar de seus benefícios, a produção de COS ainda é um desafio para a indústria, devido à complexidade do processo de obtenção e ao alto custo envolvido. Por isso, pesquisas nessa área são essenciais para o desenvolvimento de tecnologias mais eficientes e acessíveis para a produção desses compostos (ROVERA et al., 2018).

Nesse contexto, a utilização de enzimas é uma das estratégias mais promissoras

para a produção de COS em escala industrial. Além disso, a identificação de novas fontes de celulose e o estudo de suas propriedades também podem contribuir para o avanço nessa área.

Em suma, a utilização de COS apresenta um grande potencial para o desenvolvimento de produtos mais saudáveis e sustentáveis em diversos setores. Com a evolução da tecnologia e o avanço da pesquisa científica, é possível que esses compostos se tornem cada vez mais acessíveis e amplamente utilizados no mercado, contribuindo para a melhoria da qualidade de vida da população e para a preservação do meio ambiente (CHU et al., 2014).

A abordagem desses estudos para a comunidade científica é importante, pois até onde sabemos, a idade do inóculo e a utilização da porcentagem do inóculo são parâmetros importantes que podem ser significativos na produção da bebida, influenciando na produção dos metabólitos pelos microrganismos e na produção de celulose bacteriana. Ainda, não há relatos que descrevam a produção de celooligosacarídeos a partir de materiais celulósicos bacterianos, o que traz vantagens para a indústria de produção da bebida kombuchá, que acabam sendo descartadas devido a composição microbiana. Por isso, as pesquisas nessas áreas são essenciais para o desenvolvimento de tecnologias mais eficientes e acessíveis para a produção desses compostos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTURA STARTER

A cultura starter ou SCOBY foi obtida de um produtor local (Florianópolis, Brasil) e conservada no Laboratório de Engenharia Biológica (LiEB) em chá verde (0,5% p/v) adoçado com 70 g/L de sacarose, e reativado a cada 15 dias, conforme o item 5.2.

As cepas de bactérias e leveduras contidas no SCOBY foram identificadas em estudo anterior realizado pelo grupo de pesquisa no estudo de Leonarski et al. (2021b) usando tecnologia de sequenciamento de alto rendimento MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., EUA) da Neoprospecta Microbiome Technologies (Florianópolis, Brasil). As cepas identificadas foram: *Komagataeibacter rhaeticus*, *Bacillus*

megaterium, *Bacillus aryabhatai*, *Bacillus flexus* e *Bacillus simplex* como bactérias; e *Brettanomyces bruxellensis* e *Zygosaccharomyces bisporus* como leveduras.

4.2 PREPARO DO EXTRATO DE ACEROLA VERDE (AV)

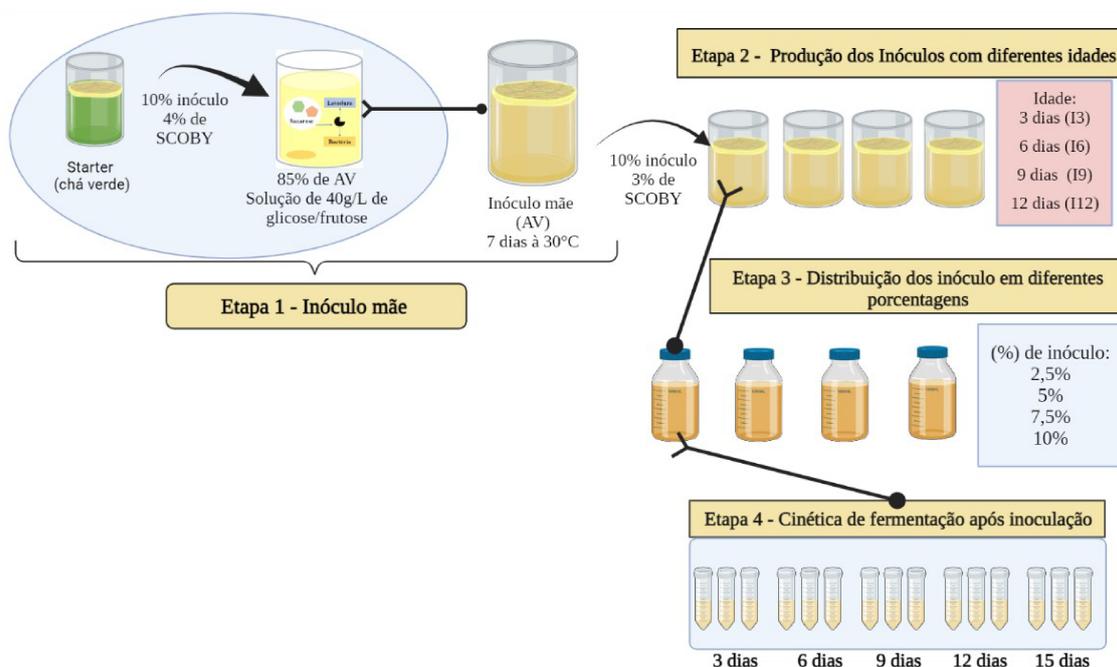
O subproduto de acerola verde foi fornecido por uma indústria produtora de suco do Ceará (Brasil), obtido da etapa de decantação do suco, denominado borra, constituído basicamente por polpa residual. A borra foi seca em estufa a vácuo a 40 °C por 48 horas e, em seguida, moída em moinho de facas (1,0 mm). Para a preparação do extrato de acerola verde (AV) foi utilizado 5% (p/v) (LEONARSKI et al., 2021) da borra seca e moída em água destilada e mantidos à 121 °C por 10 min. Após esse processo, o extrato foi filtrado em condições estéreis e usado no processo de produção.

4.3 REATIVAÇÃO DA CULTURA STARTER E PRODUÇÃO DO INÓCULO MÃE

Para a reativação da cultura starter, foi usada a infusão de chá verde (o mesmo chá no qual a cultura foi recebida). Para isso, foi retirada 10% do inóculo e 4% da massa de biofilme (SCOBY) da bebida anterior e adicionada no chá verde adoçado com sacarose (70 g/L). O chá verde foi preparado (121°C por 10 min) e filtrado. Depois, o chá verde inoculado foi armazenado por 7 dias à 30 °C. A cultura reativada foi usada para preparar o inóculo mãe.

Figura 3. Etapas de produção da kombuchá com extrato de acerola verde. Etapa 1- Produção do

inóculo mãe; Etapa 2 - Inóculos com idades de 3, 6, 9 e 12 dias; Etapa 3 - Distribuição dos inóculos em concentrações de 2,5%, 5%, 7,5% e 10% (v/v), Etapa 4 – Cinética de fermentação (em triplicata) após inoculação (3, 6, 9, 12, 15 dias).



(Figura criada com o Biorender.com)

O **inóculo mãe (Figura 3 – Etapa 1)** foi preparado numa proporção de 85% de extrato de AV, onde esse inóculo é suplementado com 5% da solução de 40 g/L de uma mistura de glicose/frutose, utilizando 10% (v/v) da fração líquida da cultura reativada, 4% (p/v) de SCOBY da mesma cultura. O **inóculo mãe** foi armazenado durante 7 dias à 30 °C. O inóculo mãe produzido com o extrato de AV foi usado nos ensaios que são descritos a seguir.

4.4 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DO INÓCULO

O efeito da idade e os percentuais do inóculo foram avaliadas na cinética de fermentação da bebida. Cada condição foi testada em triplicata submetendo à fermentação por 15 dias a 30 °C.

4.5 EFEITO DA IDADE E CONCENTRAÇÕES DO INÓCULO

O **efeito da idade do inóculo** foi avaliado quanto aos produtos de fermentação da kombuchá conforme **Figura 3– Etapa 2**. Os **inóculos** foram preparados utilizando extrato de AV suplementado com 16 g/L de glicose/frutose, 10% (v/v) da fração líquida

do **inóculo mãe** e 3% (p/v) de SCOBY do mesmo **inóculo**. Após isso, eles foram incubados à 30 °C por 3, 6, 9 e 12 dias e analisados quanto ao consumo de açúcares e produção de celulose bacteriana.

Posteriormente, os percentuais de inóculo (2,5%, 5%, 7,5% e 10%) foram testados e combinados com extratos de AV açucarado (8 g/L de glicose/frutose) conforme (Figura 3 – Etapa 3). Nesta etapa foi usada somente a fração líquida da bebida como inóculo, que foi distribuída em falcons os quais foram incubados à 30 °C conforme a Figura 3 – Etapa 4. Como exemplo, quando o inóculo alcançou 6 dias de idade foram retirados os diferentes percentuais do inóculo, por exemplo, 2,5%, e inoculados no extrato de AV açucarado. Em seguida, a amostra inoculada foi distribuída em falcons e incubados à 30 °C. Isso foi realizado para os outros percentuais no mesmo inóculo e com as outras idades de inóculo. As amostras foram recolhidas nos dias 3, 6, 9, 12 e 15 dias e analisadas quanto ao consumo de açúcares, pH e produção de celulose bacteriana. A Figura 4, mostra os frascos contendo os inóculos e falcon durante a cinética de fermentação.

Figura 4. Frascos contendo (em ordem): inóculo mãe, o inóculo de 6 dias usado na cinética de fermentação (2 frascos) e o falcon com a fermentação usando o inóculo de 6 dias (destaque para o CO₂ produzido e celulose na parte superior).

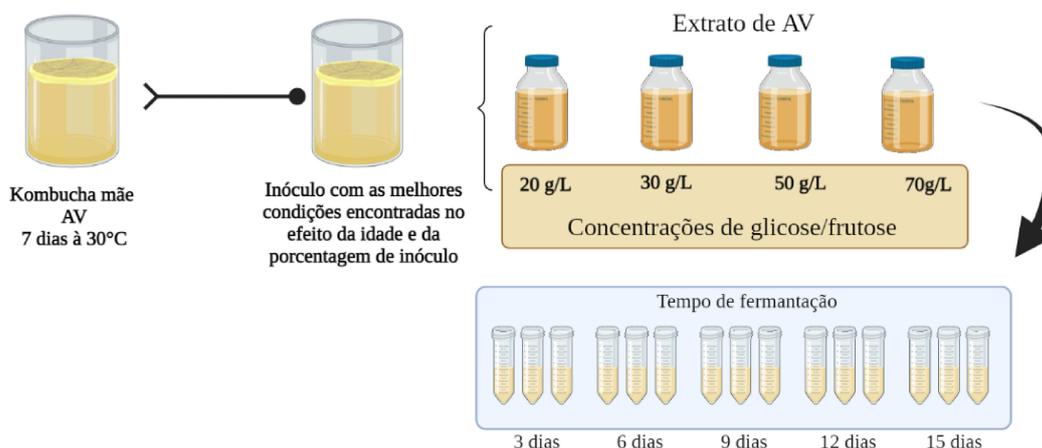


4.6 VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FONTE DE CARBONO

Após análises da idade e da porcentagem de inóculo sobre os produtos de fermentação da kombuchá, foi verificada a influência da concentração de açúcar na produção de celulose e outros produtos obtidos na fermentação usando a condição de inóculo selecionada na etapa anterior. Nesta etapa, a única variável foi a concentração

da fonte de carbono no meio de fermentação (20, 30, 50, 70 g/L de uma mistura glicose/frutose). O meio foi distribuído igualmente (30 mL) em frascos falcon de 50 mL conforme a Figura 5.

Figura 5. Variação da concentração de fonte de carbono na produção da bebida tipo kombuchá produzida com extrato de AV.



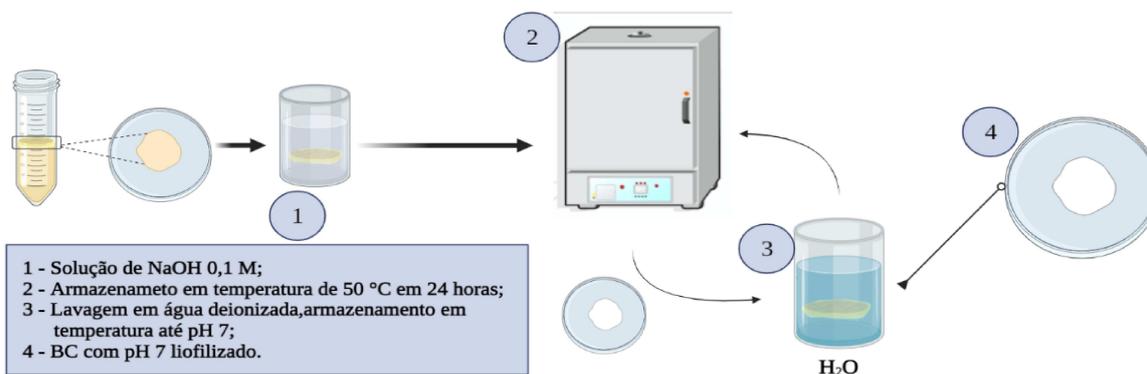
(Figura criada com Biorender.com)

4.7 METODOLOGIA ANALÍTICA

4.7.1 Purificação e quantificação de celulose bacteriana

A celulose bacteriana formada na superfície do meio de fermentação foi cuidadosamente coletada e submetida a procedimentos de purificação (Figura 6). As células microbianas presas na celulose foram removidas usando uma solução de NaOH 0,1 M a 50 °C durante 24 h. Em seguida, a celulose foi lavada e incubada com água destilada por aproximadamente 12 h para remover impurezas e resíduos de NaOH até que pH final igual a 7,0 fosse atingido. Finalmente, a celulose purificada foi liofilizada e a concentração expressa em base seca.

Figura 6. Processo de purificação de celulose bacteriana (BC).



(Figura criada com Biorender.com)

4.7.2 pH, determinação de açúcares, ácido acético e etanol

O valor do pH foi medido em triplicata durante a fermentação com um pHmetro K39-2014B (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil).

A concentração de açúcares (glicose e frutose), ácido acético, e etanol foram determinados por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC) usando o equipamento Shimadzu Prominence LC-20 A (Shimadzu, Tóquio, Japão) com uma coluna Bio-rad Aminex HPX-87H. As amostras foram previamente centrifugadas a 8.160 g por 5 min, filtradas (0,22 µm) e transferidas para vials. A injeção de 10 µL de amostra foi diluída com 5 mmol/L de H₂SO₄ a uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min. A temperatura do forno foi mantida a 35 °C e o tempo de corrida foi de 30 min. As concentrações foram determinadas com um detector de índice de refração (IR) e calculadas a partir de curvas padrão de glicose, frutose, ácido acético e etanol.

4.8 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

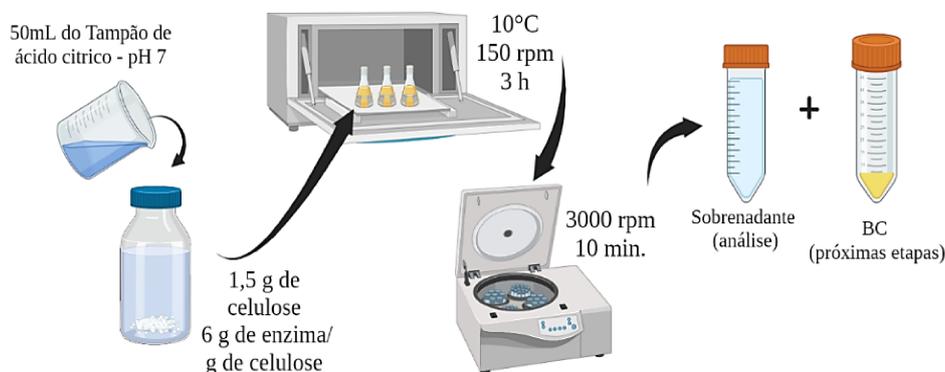
A celulose recuperada da fermentação da kombuchá foi hidrolisada por enzimas para avaliação da produção de oligossacarídeos. Para isso, antes da etapa de hidrólise, foi realizado um procedimento que visava separar as enzimas que quebram a celulose em glicose das enzimas que produzem oligossacarídeos, conforme descrito a seguir.

4.8.1 Adsorção-separação de celulases

A etapa de adsorção-separação foi utilizada para adsorver a enzima endoglucanase na celulose bacteriana e separar a enzima β-glicosidase do meio (Figura 7). Primeiramente, a enzima comercial Celluclast® - (Cellulase de *Trichoderma Reesei* C2730) foi diluída em tampão ácido cítrico 0,1 M (pH 7) na proporção de 1:49 (m/m). Em seguida, foi adicionado 3 mL da enzima diluída em sistemas de hidrólise contendo 45,5 mL de tampão ácido cítrico 0,1 M (pH 7) e 1,5 g de celulose bacteriana com massa total de aproximadamente 50 g, deixado em incubação por 3 h em uma agitação de 150 rpm na temperatura de 10 °C. Após o período de adsorção, o sobrenadante foi separado da celulose bacteriana a 3000 rpm por 10 min. A celulose com as enzimas adsorvidas foi reservada para a reação de hidrólise e o sobrenadante analisado para avaliar a taxa de adsorção de enzima. As condições (pH, temperatura e tempo) correspondem as condições otimizadas no estudo de Qiuli et al. (2014) para adsorção-separação de

celulases em celulose vegetal de espiga de milho, pois as enzimas terão baixa atividade em pH 7 e temperatura de 10 °C e não ocorrerá nenhuma reação.

Figura 7. Procedimento para adsorção da endoglucanase e separação da β -glicosidase.



(Figura criada com Biorender.com)

4.8.2 Taxa de adsorção-separação das celulases

A taxa de adsorção de enzima serviu para verificar se houve adsorção da enzima na celulose. Após a adsorção, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante retirado foi submetido à análise de atividade enzimática com papel filtro Whatman® (25 mm). Os experimentos foram realizados em triplicata e feitas as médias dos resultados. A taxa de adsorção enzimática na celulose foi calculada conforme Equação 1, de acordo com as atividades enzimáticas medidas no tampão antes e após o procedimento de adsorção.

Taxa de adsorção

$$= \frac{\text{Atividade inicial} \left(\frac{U}{g} \right) - \text{atividade após a adsorção} \left(\frac{U}{g} \right)}{\text{Atividade inicial} \left(\frac{U}{g} \right)} \quad (1)$$

4.8.2.1 Atividade enzimática

Primeiramente, foi feita a curva de glicose para determinar concentração de açúcares redutores produzidos na reação (ANEXO 1). Em seguida, foi feita a reação enzimática com 50 mg de papel filtro Whatman® (25mm), 1 mL de tampão de citrato de sódio com pH 4,8 e 1 mL de enzima e/ou sobrenadante (líquido retirado após a adsorção). A reação foi conduzida a 50 °C por 60 min. Após isso, foi quantificada a concentração de glicose por DNS, onde foi retirado 0,5 mL da reação e adicionado em 1 mL de DNS. Essa solução foi aquecida em 100 °C por 5 min, resfriada e adicionado 7,5

mL de água destilada. Depois, foi medido a absorvância no espectrofotômetro UV VIS (absorvância 540 nm). Os dados e o valores da atividade enzimática inicial encontram-se na Tabela 1 do ANEXO 1.

4.8.3 Hidrólise enzimática de celulose bacteriana após “adsorção-separação” de celulasas

Após a etapa de adsorção-separação a celulose retida na centrifugação foi submetida a hidrólise enzimática. O volume do sobrenadante da etapa de adsorção foi previamente determinado, em seguida, uma mesma quantidade de tampão de citrato de sódio (50mM, pH 4,8) foi adicionado para tornar o volume de hidrólise enzimática constante. Experimentos de hidrólise enzimática da celulose foram realizados a 50 °C com agitação a 150 rpm por 48 h. E retiradas alíquotas nos horários de 6, 12, 24 e 48 h. Também, foram realizados experimentos de hidrólise enzimática sem adsorção e analisados no final de 48 horas. Ao final da hidrólise, as amostras foram aquecidas a 100 °C por 10 min para inativar as enzimas. Os sobrenadantes foram recolhidos após centrifugação a 3000 rpm durante 10 min. Todas as experiências foram realizadas em triplicata e calculados os resultados médios. A concentração de celobiose e glicose formadas na hidrólise enzimática foi medida usando HPLC. O rendimento de hidrólise enzimática, rendimento de celobiose e a seletividade à produção de celobiose foram expressos utilizando as Eq. (1), (2) e (3). Valores foram expressos como porcentagem (p/p) de celobiose hidrolisado por amostra usando um fator de conversão de 0,9 que geralmente calculado a partir do peso molecular da celobiose/ dois pesos moleculares de glicose (342,3 g/mol/ 2*180,156 g/mol = 0,9).

Rendimento hidrólise enzimática (%)

$$= \frac{\text{Celobiose (g)} + \text{glicose(g)} * 0,9}{\text{total de celulose em substrato(g)}} * 100 \quad (2)$$

Rendimento de celobiose(%)

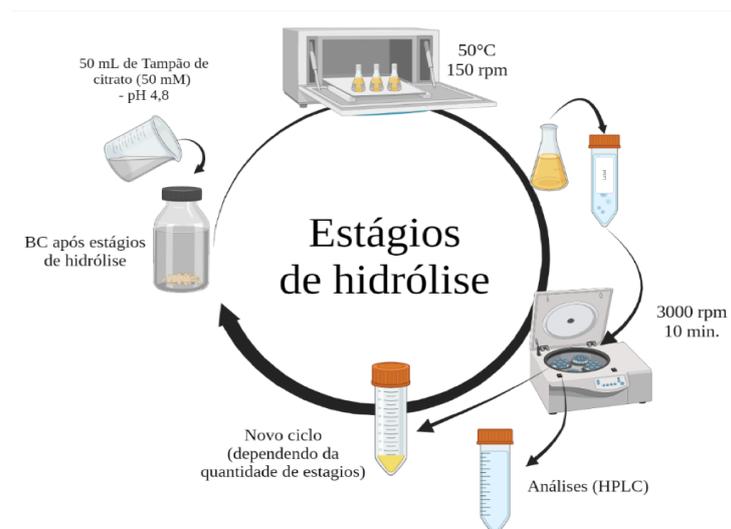
$$= \frac{\text{Celobiose (g)}}{\text{total de celulose em substrato(g)}} * 100 \quad (3)$$

$$\text{Seletividade de celobiose(}\%) = \frac{\text{Celobiose (g)}}{\text{Celobiose (g)} + \text{glicose(g)} * 0,9} * 100 \quad (4)$$

4.8.4 Hidrólise enzimática com multiestágios para produção de celobiose

Além da hidrólise enzimática realizada em 48 h, foram realizadas hidrólises com vários estágios para diminuir a inibição do produto (Figura 8). A hidrólise foi realizada em shotts de 50 mL a 50 °C usando o tampão citrato 50 mM (pH 4,8) com agitação a 150 rpm. Ao final de cada etapa, a celulose residual foi separada do sobrenadante e para continuação da hidrólise, foi adicionado volume de tampão fresco (pH 4,8) igual ao volume retirado, assim, uma nova hidrólise (estágio) é realizada utilizando a mesma celulose (Figura 8). A hidrólise de multiestágios foi realizada com 2, 3 e 4 estágios, com tempo total de 48 h. Os experimentos com dois estágios contemplaram uma troca de tampão em 24 h, ou seja, após 24 h tem-se o primeiro estágio de hidrólise, seguida da troca de tampão para executar o segundo estágio. Para três estágios, as trocas aconteceram nos tempos de 12 + 12 + 24 h, e quatro estágios em 6 + 6 + 12 + 24 h. Os sobrenadantes dos experimentos de hidrólise foram analisados quanto à produção de açúcares solúveis, glicose e celobiose medidos conforme metodologia apresentada no item 1.1.3. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, feita as médias dos resultados em g/L e calculados os rendimentos da hidrólise enzimática, rendimento da celobiose e a sua seletividade, representada nas equações (1), (2) e (3).

Figura 8. Procedimento de hidrólise enzimática em multiestágios após a adsorção da enzima na celulose.



(Figura criada com Biorender.com)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS INÓCULOS COM DIFERENTES IDADES

A idade do inóculo é um dos fatores que pode influenciar na produção dos metabólitos pelos microrganismos (YANTI; AHMAD; MUHIDDIN, 2018). Desse modo, antes de discutirmos o efeito da idade do inóculo na fermentação da kombuchá, na Tabela 3 tem-se a caracterização dos inóculos quanto ao consumo de açúcares e produção de celulose. Percebe-se que o consórcio de bactérias e leveduras tiveram preferência ao consumo de glicose do que a frutose.

Tabela 3. Avaliação do consumo de açúcares, pH e produção de celulose nos inóculos com diferentes idades.

Idade (dias)	Glicose final (g/L)	Frutose final (g/L)	Consumo (g/L) *		pH	Celulose (g/L)
			Glicose	Frutose		
3	17,1 ^a	18,6 ^a	2,9 ^a	1,34 ^a	3,10 ^a	0,04±0,00025 ^a
6	16,8 ^a	18,4 ^b	3,2 ^a	1,6 ^b	2,48 ^b	0,11±0,036 ^a
9	14,3 ^b	18,3 ^b	5,7 ^b	1,7 ^b	2,47 ^b	0,13±0,022 ^a
12	14,9 ^b	18,2 ^b	5,1 ^b	1,7 ^b	2,45 ^b	0,36±0,025 ^b

*Consumo (g/L) = glicose/frutose inicial (g/L) - glicose/frutose final (g/L); sendo que a glicose/frutose inicial = 20 g/L.

O efeito do tempo sobre as mudanças na bebida e na quantidade dos açúcares foi significativa. A utilização de glicose e frutose ao invés de sacarose facilita o consumo dos açúcares. Como pode ser visto, à medida que aumenta a idade do inóculo, há diminuição da concentração de glicose, sendo o consumo ao final de 12 dias de apenas 25%. Para a frutose, não foi observado redução significativa entre as idades 6 e 12 dias, sendo o máximo consumo de apenas 8,5%. A produção de celulose no final de 12 dias foi de 0,36 g/L. Porém como observado, ainda há considerável quantidade de açúcares mesmo após 12 dias, o que pode estar relacionada ao consórcio de microrganismo, que por sua vez pode estar se adaptando as condições e aos meios de fermentações o que pode ser importante para as próximas etapas.

Na pesquisa de Leonarski et. al. (2021a) na produção de bebida tipo kombuchá e celulose bacteriana usando o mesmo subproduto da acerola, não foi realizado nenhum tipo de caracterização do inóculo. Além disso, o inóculo usado na fermentação foi preparada com chá verde, ou seja, não houve adaptação do inóculo ao extrato de acerola, como neste trabalho. No seu estudo também, já usando o extrato de AV, o seu

resultado foi similar obtendo o consumo de 56,6% de açúcares totais, com maior preferência para a glicose.

Lonar et. al. (2006) identificaram que o consumo de sacarose e a liberação de glicose e frutose no meio (devido à quebra da sacarose) era maior quando se aumentava a concentração de inóculo (10% e 15%), e/ou a temperatura (22 e 30 °C). Por exemplo, nas amostras fermentadas com 15 % de inóculo e a 30 °C, houve maior concentração final de glicose e frutose no meio, porém maior consumo de açúcares. No referido estudo, também houve maior preferência pela glicose.

5.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA IDADE E DA PORCENTAGEM DE INÓCULO NA FERMENTAÇÃO DA KOMBUCHÁ

O efeito da idade do inóculo e as concentrações do inóculo usados na fermentação são parâmetros importantes que podem ser significativos na produção da bebida, influenciando na produção dos metabólitos pelos microrganismos, e até mesmo o tempo de fermentação.

5.2.1 Efeito sobre o pH

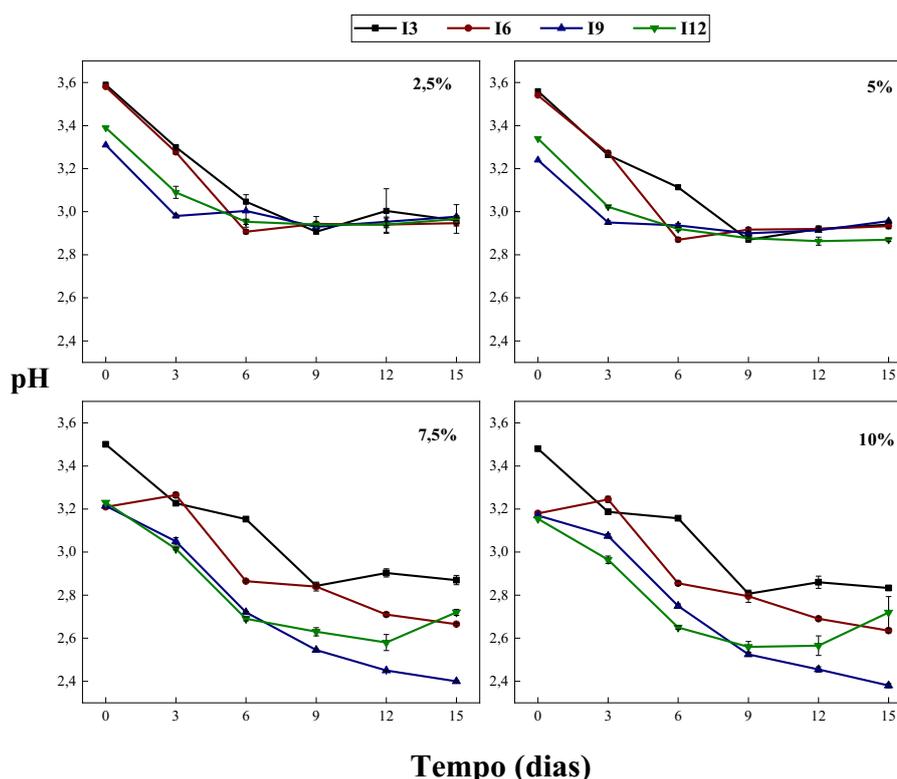
O pH é um parâmetro importante no processo fermentativo, pois ele previne as alterações nos compostos antioxidantes e seleção de microrganismos, embora o pH do meio dependa diretamente dos microrganismos utilizados, para a produção de celulose ou para produção da bebida (AVCIOGLU; BIRBEN; SEYIS BILKAY, 2021b; LEONARSKI et al., 2021a). Pensando nisso, foi avaliada as alterações do pH quando influenciada pela idade do inóculo e as concentrações inoculadas ao longo do tempo de cultivo (Figura 9).

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a concentração de inóculo e a idade dele influenciam diretamente na diminuição do pH durante a fermentação de extrato de AV. O pH inicial de todas as amostras estava entre 3,1 e 3,6. Os inóculos com menor idade (I3 e I6) apresentaram comportamento semelhante no decorrer do período de fermentação, indicando que a quantidade de microrganismos adicionados não afetou significativamente o processo fermentativo. Foi observado uma diminuição do pH entre o período 0 e 6 dias e após essa queda mantiveram-se com pequenas variações até o fim da fermentação (dia 15 com pH entre 2,4 e 2,8). No entanto, o

inóculo com idade de 6 dias apresentou uma diminuição mais rápida do pH em comparação ao inóculo com idade de 3 dias, possivelmente devido ao aumento na concentração de bactérias ácido acéticas.

Por outro lado, os meios com inóculos de idade maior (I9 e I12) apresentaram valores de pH maiores, devido ao tempo maior de fermentação do inóculo e ao consequente consumo de açúcares e liberação de ácidos e CO₂. Além disso, foi observado que a porcentagem de inóculo afetou a diminuição do pH, apresentando uma maior redução do pH quando se aumenta a porcentagem do inóculo para 7,5 e 10%. No entanto, uma tendência contrária foi observada para o inóculo com idade de 12 dias, indicando que o tempo longo de fermentação e/ou a diminuição de oxigênio no meio podem ter influenciado no aumento do pH.

Figura 9. Influência das concentrações do inóculo (2,5, 5, 7,5 e 10%) em diferentes idades (I – 3, 6, 9 e 12 dias) no comportamento do pH ao longo do tempo de cultivo.



Resultados semelhantes a diminuição do pH no período curto de fermentação, foram encontrados por Ayed et. al. (2017) (AYED; BEN ABID; HAMDI, 2017) na análise da fermentação de suco de uva tinto com consócio de kombuchá, nas amostras o pH passou de 3,95 para 3,2 em 4 dias de fermentação e permaneceu constante no final da fermentação (8 - 12 dias). O que pode estar associado ao aumento de ácidos na bebida assim diminuindo o seu pH e as bactérias e leveduras diminuiram após um logo

tempo de fermentação (AYED; BEN ABID; HAMDI, 2017; CONTEXTO et al., 2020). Yanti et al. (2018) e Wood et al. (2022) relataram que os microrganismos quebram compostos complexos em estrutura mais simples aumentando a acidez do meio e diminuindo o pH, o que pode explicar a diminuição do pH nos meios de cultura assim que aumenta a porcentagem de inóculo.

Mesmo apresentando comportamento semelhante ao I3, o I6 apontou uma diminuição do pH mais rápido no dia 6, cerca de 2,9, comparado ao I3 no dia 6 (pH 3,1) nos percentuais 2,5% e 5% de inóculo. Esse fato pode ser devido a maior quantidade de microrganismo (principalmente bactérias) que contém no I6, devido ao maior tempo de produção do inóculo (6 dias). Possivelmente, há um aumento na concentração de bactérias ácido acéticas, podendo supor que o crescimento bacteriano poderia estar na fase log, portanto o I6 produziu mais ácidos e conseqüentemente diminuiu seu pH. Esse mesmo comportamento foi observado no estudo de Leonarski et al. (2021a), onde os autores observaram as fases de crescimento bacteriano.

Os meios com idade maiores (I9 e I12) obtiveram valores de pH maiores de 3,4, devido ao tempo maior de fermentação do inóculo, ou seja, houve maior consumo de açúcares e liberação de ácidos e CO₂ (LONĂR et al., 2006). Todos os dados mostraram comportamento semelhante no decorrer do período de incubação e notou-se uma diminuição no valor do pH do início até o final da fermentação, apresentando uma maior redução do pH quando se aumenta a porcentagem do inóculo para 7,5 e 10%. De forma controversa, percebeu-se também, que há um aumento do pH nas maiores concentrações para o inóculo com idade de 12 dias, no período entre o 9º ao 15º dia de incubação. Esse aumento pode ser devido ao tempo longo de fermentação e/ ou a diminuição de oxigênio no meio (AVCIOGLU; BIRBEN; SEYIS BILKAY, 2021a).

5.2.2 Efeito sobre o consumo de açúcares e formação de celulose

O segundo parâmetro estudado foi o consumo de açúcares (Tabela 4). Os dados da Tabela mostram que durante a fermentação usando os inóculos com diferentes idades houve maior preferência pela frutose do que a glicose, contradizendo o que foi observado nos ensaios anteriores. A concentração inicial de glicose e frutose nos ensaios foi de 16 g/L.

Tabela 4. Dados de consumo de açúcares após 15 dias de fermentação usando os inóculos com idade de 3, 6, 9 e 12 dias e porcentagem de inóculo de 2,5, 5, 7,5 e 10%.

Idade do inóculo (dias)	Consumo de Glicose (%)			
	2,5	5	7,5	10
3	46,6 ± 0,5 ^{aA}	48,2 ± 0,4 ^{aA}	49,7 ± 0,6 ^{aA}	57,8 ± 1,5 ^{bA}
6	43,4 ± 0,5 ^{aA}	54,2 ± 5,7 ^{bcB}	80,7 ± 1,2 ^{cdB}	72,3 ± 0,1 ^{dB}
9	63,3 ± 0,1 ^{aB}	45,4 ± 0,4 ^{bA}	31,5 ± 0,1 ^{cC}	41,6 ± 0,2 ^{dC}
12	24,7 ± 2,0 ^{aC}	23,2 ± 0,9 ^{aC}	53,3 ± 3,0 ^{bA}	92,8 ± 1,1 ^{cD}
Consumo de Frutose (%)				
3	64,5 ± 3,4 ^{aAC}	62,6 ± 0,4 ^{aA}	68,3 ± 0,4 ^{aA}	79 ± 0,8 ^{bA}
6	55,4 ± 0,3 ^{aAB}	67,1 ± 5,5 ^{bcB}	94,7 ± 1,7 ^{cdB}	85,6 ± 0,1 ^{dB}
9	69,4 ± 1,5 ^{aC}	65,6 ± 0,3 ^{bcB}	63,6 ± 0,1 ^{cA}	68,5 ± 1,3 ^{dC}
12	47,1 ± 1,3 ^{aB}	44,8 ± 1,7 ^{aC}	92,3 ± 2,3 ^{bB}	98,3 ± 1,3 ^{bD}

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey; Letras minúsculas referem-se a análises estatística dos dados apresentados em linhas, letras maiúsculas entre os dados das colunas.

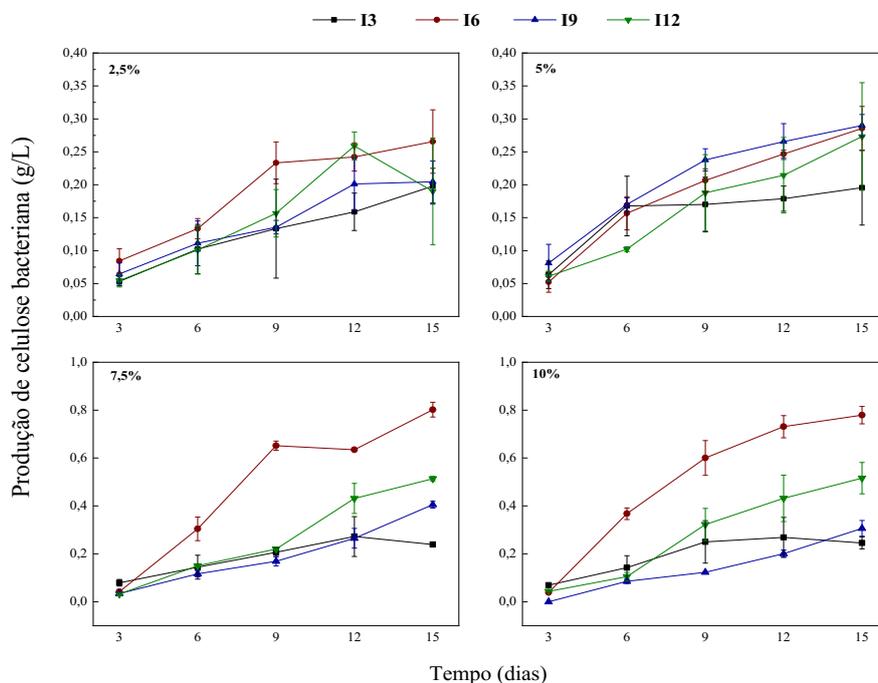
As análises realizadas permitiram a avaliação do consumo de glicose e frutose, bem como da produção de celulose microbiana, em diferentes concentrações e idades de inóculo. De acordo com os resultados, a fermentação com inóculos de 3 a 9 dias apresentou uma diminuição no consumo do açúcar à medida que a porcentagem de inóculo aumenta. O inóculo 6, por sua vez, demonstrou o maior consumo de glicose, atingindo 80,67% na porcentagem de 7,5% de inóculo.

Já o inóculo com idade de 12 dias apresentou um comportamento contrário aos demais, com um aumento no consumo de glicose à medida que mais inóculo era adicionado. No entanto, esse inóculo apresentou um dos menores consumos de açúcar quando comparado com a menor idade de inóculo (I3), indicando possíveis limitações na fermentação da bebida.

No caso da frutose, não houve diferença significativa no consumo nas concentrações de 2,5 a 10% para os inóculos de 3 e 9 dias. Por outro lado, os inóculos de 6 e 12 dias apresentaram um aumento no consumo de frutose com o aumento da porcentagem de inóculo. O inóculo de 6 dias, em particular, apresentou uma maior preferência ao consumo de frutose, atingindo 94,7% nas maiores concentrações de inóculo.

A influência da variação dos parâmetros de idade e porcentagem de inóculo na produção de celulose pode ser visualizada na Figura 10.

Figura 10. Cinética de produção de celulose com a variação de idade e concentrações de inóculo.



A produção de celulose microbiana também foi avaliada, sendo que as menores concentrações de inóculo apresentaram resultados uniformes, com produções similares entre 0,19 e 0,29 g/L. Nas maiores porcentagens, no entanto, observou-se um crescimento abaixo de 0,45 g/L de celulose, indicando que os inóculos com idades de 3, 9 e 12 dias podem já estar em fase estacionária, comprometendo a fermentação da bebida.

Por outro lado, o inóculo de 6 dias apresentou uma produção de aproximadamente 0,80 g/L de celulose para os inóculos de 7,5 e 10%, resultados que se mostraram promissores e similares aos obtidos em outros estudos, como o de Soh et al. (2002). Esses resultados podem estar relacionados à baixa concentração de açúcar utilizada, à adaptação com o substrato e ao consórcio de microrganismos presentes.

A baixa produção de celulose pode estar relacionada a baixa concentração de açúcar utilizada, adaptação com o substrato e o consórcio de microrganismo (WOOD et al., 2022; YANTI; AHMAD; MUHIDDIN, 2018). No que diz respeito a concentrações e idade do inóculo, observa-se que os volumes correspondentes a 7,5 e 10% e o tempo de 6 dias se mostraram mais promissores. Nos ensaios seguintes, os volumes de 7,5 e 10% foram novamente avaliados.

Em resumo, os resultados obtidos sugerem que o inóculo de 6 dias e as concentrações de 7,5 e 10% apresentaram os melhores resultados para a produção de celulose microbiana. Esses dados podem contribuir para o aprimoramento da produção desse biopolímero, que possui aplicações em diversas áreas, como na fabricação de embalagens, aditivos alimentares entre outros.

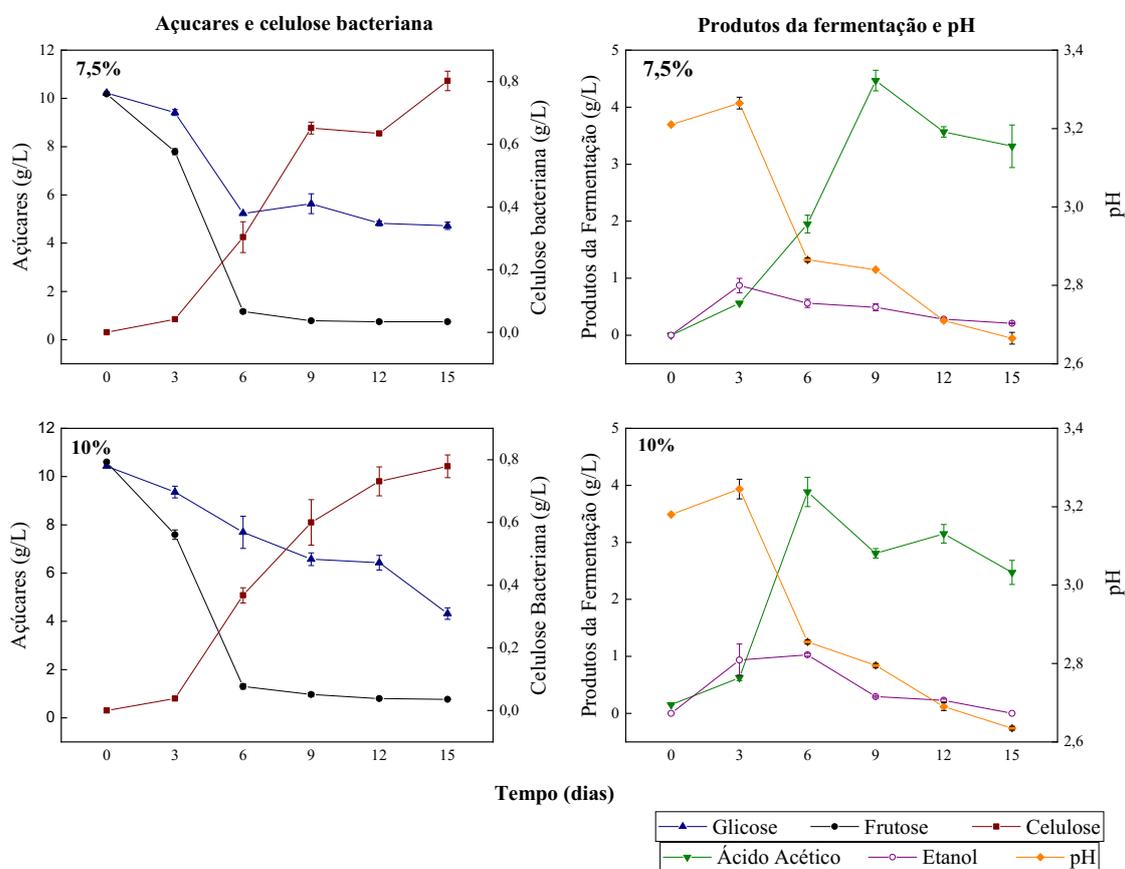
5.2.3 Avaliação da cinética de consumo de açúcares e produção de metabólitos de fermentação

Para entendermos melhor os parâmetros de fermentação e os metabólitos produzidos foi comparada duas concentrações de inóculo (7,5% e 10%), considerando a idade de inóculo com melhores resultados, 16 ou 6 dias. Os resultados da fermentação são mostrados conforme a Figura 11.

A produção de celulose aumenta assim que há um consumo de glicose/frutose. Percebe-se que em ambos os percentuais de inóculo, a frutose é a mais preferida dos microrganismos por apresentar uma diminuição considerável entre os tempos 0 e 6 dias restando apenas 1,2 g/L de frutose após 6 dias. Nota-se ainda que, no ensaio com percentual de 7,5% de inóculo, a glicose apresentou um consumo maior em relação ao percentual de 10% de inóculo, o que favoreceu uma produção semelhante de celulose (0,8 g/L). Já os produtos obtidos na fermentação, etanol, ácido acético e pH tiveram perfis semelhantes durante a fermentação nos dois meios de cultura com diferentes concentrações de inóculo.

Na produção de etanol, há um aumento de 0,49 g/L – para 7,5% de inóculo – após 6 dias de fermentação e logo após uma redução atingindo cerca de 0,21 g/L ao final da fermentação para ambas as concentrações de inóculo (7,5 e 10%). Isso se deve ao consumo do etanol pelas bactérias acéticas para produção de ácidos na bebida. Já na produção de ácido acético, a cinética mostrou uma produção crescente de ácido na bebida até o 9º dia de fermentação com 7,5% de inóculo (4,5 g/L) e uma pequena queda até o final de 15 dias. Esse mesmo comportamento é visto no meio de cultura com 10% de inóculo, porém esse aumento é antecipado para o 6º dia ($3,9 \pm 0,2$ g/L) e ocorre variação na produção de ácido acético até o final da fermentação. O pH, nos dois meios de cultura, apresentou um aumento no 3º dia seguido de diminuição chegando a um pH final de 2,7 e 2,6, para 7,5% e 10%, respectivamente.

Figura 11. Acompanhamento cinético do pH, consumo de açúcares, produção de celulose, ácido acético e etanol durante a fermentação conduzida com o inóculo de 6 dias e percentagens de 7,5 e 10 %.



Resultados semelhantes foram relatados por Villarreal-Soto *et al.* (2019) que observaram uma produção seguida de um decaimento do etanol durante a fermentação de kombuchá em chá preto com 70 g/L de sacarose em 21 dias de fermentação. Os autores relatam que o pH do meio de cultura de chá preto diminuiu de pH 6,4 para pH 2,7. Ainda, os autores observaram que a produção de ácido acético obteve uma produção de 15,1 e 6 g/L nas dimensões A e B (9 cm e 23 cm) teve uma diferença significativa, devido ao consórcio de bactérias que pode produzir etanol e como outras bactérias podem consumir o etanol e produzir ácido acético.

Portanto, pode-se dizer que o percentual de 7,5% de inóculo com 6 dias de idade pode ser usado na fermentação, o que conseqüentemente, pode diminuir os custos do processo e obtendo uma bebida com características similares ao uso de inóculo de 10%.

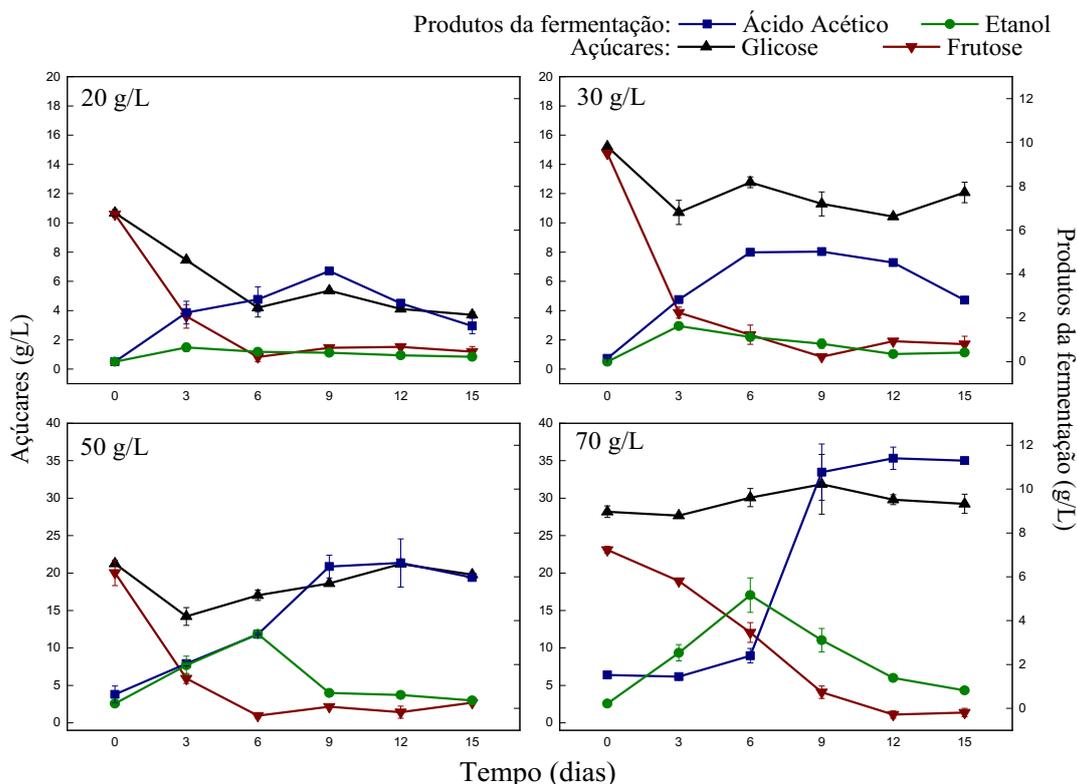
5.3 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR NA FERMENTAÇÃO

5.3.1 Produtos da fermentação

Como visto no tópico anterior, as condições de fermentações da bebida kombuchá acarretam mudanças na bebida e na produção de celulose. Então, foi avaliado o comportamento da produção de celulose e os produtos da fermentação nas diferentes concentrações de açúcares utilizando características que apresentaram melhores resultados quanto a idade e percentual do inóculo sendo eles, 7,5% de inóculo no tempo de 6 dias. Dentre as características que influenciam na maior produção de metabólitos temos a concentração de açúcares disponível. Por isso foi realizado um ensaio com diferentes concentrações de açúcares. A Figura 12 apresenta os produtos da fermentação com extrato de AV em diferentes concentrações da solução de glicose/frutose.

Nas análises do consumo de açúcares, pode-se ver que é nítida a preferência do consórcio microbiano ao consumo de frutose em todos os ensaios. Mesmo na maior concentração de açúcares usado, dos 23 g/L iniciais de frutose, após 15 dias restaram apenas 0,80 g/L. Nas concentrações de açúcar de 20, 30 e 50 g/L, os microrganismos consumiram os açúcares de forma similar. Na menor concentração (20 g/L), a glicose e frutose tiveram alto consumo pelo consorcio microbiano do dia 0 ao dia 6 apresentando consumos de 6,5 g/L (60%) e 9,7 g/L (88%), respectivamente, mantendo-se constante até o final da fermentação. Nas concentrações intermediarias (30 e 50 g/L), os microrganismos consumiram muito pouco da glicose, cerca de 1,5 g/L a 7 g/L, e apresentaram um consumo significativo de frutose até o 9º dia de fermentação (13,9 e 17,9 g/L, respectivamente). Na concentração de 70 g/L, a glicose se manteve constante durante toda a cinética, já o consumo de frutose foi diminuindo constantemente até o final de 15 dias. Como a glicose foi pouco metabolizada em relação a frutose, podemos dizer que essa característica é devido a composição microbiana específica e/ou fonte inicial de carbono, que é explicada por Villarreal-Soto *et al.* (2020) quando realizou fermentação da kombuchá com glicose e frutose em chá preto, variando também a composição microbiana e tendo como resultado o consumo maior para glicose e maior produção de ácidos.

Figura 12. Cinética de fermentação com diferentes concentrações de açúcares analisada quanto ao consumo dos açúcares e produção dos produtos da fermentação.



Com o declínio dos açúcares, percebe-se o aumento da concentração de etanol até o dia 3 (0,65 g/L e 1,6 g/L) para as concentrações mais baixa de açúcar (20 g/L e 30 g/L). Um aumento até o 6º dia (3,4 g/L e 5,2 g/L) nas concentrações maiores (50 g/L e 70 g/L), seguidos de um declínio após o pico alto de sua produção. Essa diminuição deve-se ao consumo do etanol pelas bactérias ácidos acéticas, que usam o etanol como substrato (VILLARREAL-SOTO et al., 2020). Villarreal-Soto *et al.* (2019) produziu kombuchá com chá preto açucarado com 70 g/L de sacarose, e ao longo da fermentação observou a produção máxima 32,8 g/L de etanol após 11 dias, a qual reduziu para uma concentração de 11 g/L de etanol no final de 15 dias. Esse decaimento da produção de etanol pode ter sido causado pela origem do inóculo e pelas condições da fermentação. Em outra pesquisa, Villarreal-Soto *et al.* (2020) comentaram que as espécies fúngicas (leveduras) dominantes, são encontradas na fase líquida até o 8º dia de fermentação causando uma alta produção de etanol.

Nesse trabalho, o ácido acético foi produzido em maiores concentrações (6,6 e 11,4 g/L de ácido acético), onde foi usado também maiores concentrações de açúcar (50 e 70 g/L, respectivamente). Mesmos resultados foram observados por Villarreal-Soto *et*

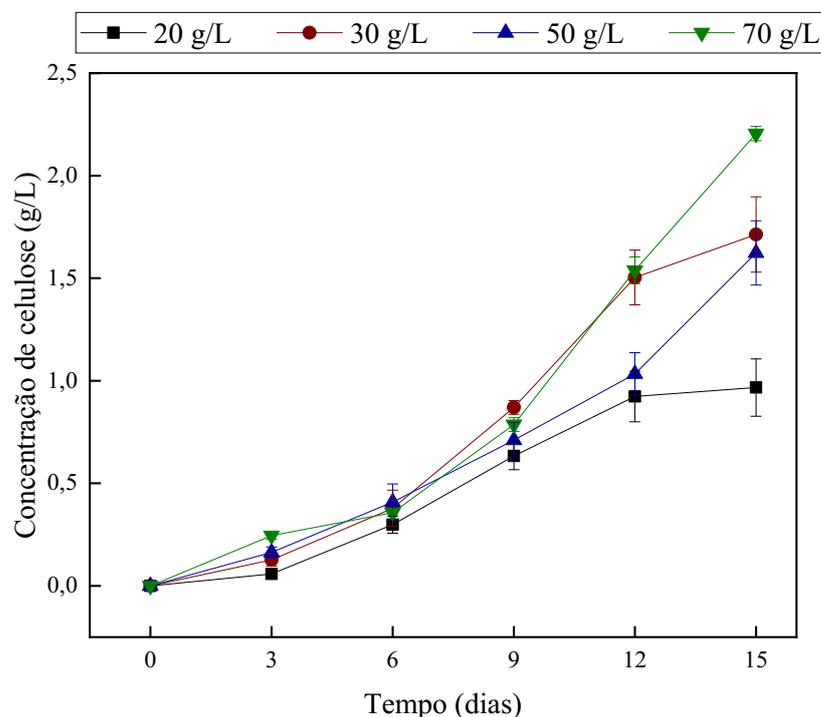
al. (2019) que analisaram a kombuchá em chá preto com 70 g/L de sacarose, a fermentação produziu 15,1 g/L de ácido acético em 21 dias de fermentação.

5.3.2 Produção de celulose

Além do ácido acético e etanol, a celulose é um produto da fermentação a ser avaliada segundo seu comportamento quando há variação dos açúcares na produção da bebida, os resultados estão expressos na Figura 13.

Percebe-se que ambas as concentrações obtiveram crescimento uniforme de celulose até o final de 15 dias. Nota-se que a concentração maior (70 g/L) obteve maior produção de celulose bacteriana obtendo $2,2 \pm 0,035$ g/L, podendo indicar que os microrganismos tiveram nutrientes para uma boa produção de celulose. Porém, a produção de celulose na concentração 70 g/L de glicose/frutose foi metade da encontrada por Leonarski et. al. (2021) que obteve uma produção de 4 g/L, podendo supor que o substrato de extrato de AV utilizado na kombuchá mudou o comportamento dos microrganismos. Nas concentrações intermediárias (30 g/L e 50 g/L), apresentou semelhança na produção em g/L de celulose em média 1,6 e 1,7 g/L. Na menor concentração de açúcar (20 g/L) a produção de celulose apresentou um comportamento semelhante a cinética feita nas análises anteriores, pois a produção nessa concentração foi abaixo de 1 g/L de celulose.

Figura 13. Comportamento das concentrações 20, 30, 50 e 70 g/L da solução de glicose/frutose no desenvolvimento de celulose bacteriana com 7,5% de inóculo fermentado em 6 dias.



Na pesquisa de Treviño-Garza et al. (2020) foi observado a produção de celulose em dois consórcios de microrganismos e utilizando diferentes açúcares, os rendimentos de massa seca foi entre 4,64 e 12,12 g/L sendo que as melhores produções estavam em meios à base de glicose e dextrose, seguidos de frutose e sacarose. Ainda, segundo Treviño-Garza et al. (2020) a produção de celulose pode variar dependendo das cepas microbianas (TREVINO-GARZA, M. Z., GUERRERO-MEDINA, A. S., GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, 2020). Como visto anteriormente, as cepas microbianas tiveram a preferência à frutose, o que leva o comportamento da produção de celulose com diferentes concentrações de açúcares (Figura 13).

5.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A abordagem da hidrólise enzimática em celulose para obtenção de celobiose é um caminho vantajoso para estudos e para a utilização de resíduo da kombuchá. Até o momento, a maior parte da celulose que é produzida na fermentação de kombuchá é considerada um resíduo, sem aplicações para o seu reuso. Por este motivo, neste trabalho a hidrólise enzimática para produção de oligossacarídeos foi avaliada.

5.4.1 Taxa de retenção de enzima

Para verificar a taxa de retenção de enzima foi realizada a atividade enzimática no sobrenadante retirado na etapa de adsorção-separação da enzima (ANEXO 2). Para isso foi realizada a atividade enzimática com papel filtro (Filter Papers Activity) e calculada a concentração de glicose produzida em 60 min de reação enzimática com o propósito de obter a atividade da enzima em FPU/ml, sendo ela 36,58 FPU/mL. Na “adsorção-separação” a retenção da enzima na celulose foi realizada em temperatura de 10 °C, temperatura ideal – utilizada em celulose vegetal de espiga de milho – para retenção de endoglucanase nas fibras de celulose e remoção da β -glicosidase que seria o propósito desta etapa (CHU et al., 2014). A concentração de enzima adicionada aos sistemas de hidrólise apresentou uma atividade enzimática inicial de 0,034 FPU/mL ou 1,02 FPU/g de celulose. O mesmo procedimento foi feito nos sobrenadantes da adsorção-separação retirados após 3 horas para quantificar a retenção da enzima na celulose. Observou-se que a atividade enzimática foi de aproximadamente $0,0029 \pm 0,0004$ FPU/mL e obteve uma taxa de retenção de 90%, o que pode indicar que a temperatura e a quantidade de enzima adicionada foram favoráveis para as próximas etapas de hidrólise.

A taxa de retenção da enzima na celulose mostrou-se alta, devido a celulose possuir uma cristalinidade de 80 - 97%. Entretanto, a alta cristalinidade também pode diminuir a absorção da endoglucanase na celulose e assim podendo ser retirada nas lavagens dos estágios seguintes e diminuindo a produção de celobiose e glicose no final de 48 h. Segundo Kashcheyeva et al. (2019), a eficiência da hidrólise enzimática da celulose pode depender de propriedades do substrato, como índice de cristalinidade (CI), grau de polimerização (DP), porosidade, teor de umidade (KASHCHEYEVA et al., 2019).

5.4.1.1 Hidrólise de 1 estágio

A hidrólise enzimática com 1 estágio, ou seja, sem troca de tampão até o final do experimento, foi realizada com e sem adsorção-separação de celulases por um período de 48 h. A cinética de produção de celobiose e glicose foi analisada somente no ensaio em que a etapa de adsorção-separação das enzimas foi realizada, conforme a Tabela 5.

Os produtos obtidos pela quebra de celulose em 48 h de hidrólise sem adsorção apresentaram uma produção de $7,7 \pm 0,17$ g/L e $2,0 \pm 0,09$ g/L de celobiose e glicose, respectivamente. Comparados com a hidrólise com adsorção, que apresentou uma produção abaixo de 3 g/L e 0,40 g/L (celobiose e glicose). O resultado mostra que a

etapa de adsorção de fato foi seletiva às endoglucanase, já que a concentração de glicose se manteve constante até o final das 48 h de ensaio.

Tabela 5. Produção de celobiose e glicose na hidrólise com um estágio sem e com “adsorção-separação” de endoglucanase e β -glicosidase após 48 h de hidrólise.

Método	Tempo (h)	Celobiose (g/L)	Glicose (g/L)	Rendimento Hidrólise enzimática (%)	Rendimento de celobiose (%)	Seletividade a celobiose (%)
Com adsorção	6	1,2±0,08 a	0,3± 0,05 a	4,6±0,4 a	3,8±0,26 a	82,9±1,56 a
	12	1,5±0,37 a	0,4±0,04 a	7,1±0,42 a	4,9±1,25 a	86±2,35 a
	24	2,5±0,04b	0,4±0,03 a	9,3±0,04 a	8,2±0,13 a	89±0,18 a
	48	2,6±0,23b	0,3±0,02 a	9,26±1,14 a	9,3±0,87 a	88,9±0,67 a
Sem adsorção	48	7,7±0,17 c	2,0±0,09 b	31,7±0,20 b	25,6±0,4 b	80,7±0,78 a

A cinética da reação nos tempos 6, 12, 24 e 48 h mostram semelhança entre si na produção de celobiose, entre os tempos mais curto (1,5 g/L, em 12 h) e entre os tempos maiores (2,43 g/L, em 48 h), obtendo diferença significativa somente entre 12h e 24 h. Já a produção de glicose foi continua até o final de 48 h, tendo o rendimento de hidrólise enzimática aumentado de 4,62% para primeira 6 h para 1 em 48 h. Os resultados sugerem que os celobiose se tornou o principal produto da degradação da celulose, pois o rendimento de celobiose aumentou de 4,59 % (6 h) para 10,44% (48h) e a seletividade foi de 75,95% para 88,88%. Porém, os produtos produzidos pelas endoglucanase, como oligossacarídeos, entre eles a própria celobiose, inibem a atividade da enzima, o que compromete suas produções (BEHERA et al., 2017) e explicando os menores rendimentos quando comparado com a hidrólise sem a etapa de adsorção.

CHU et al. (2014) em pesquisa com resíduo de espiga de milho utilizou a celulose vegetal para obter celo-oligossacarídeos e glicose hidrolisando enzimaticamente a celulose obtida da espiga de milho. Ele utilizou a técnica de adsorção da enzima endoglucanase na fibra de celulose em diferentes temperaturas e com um e vários estágios de hidrólise. Como resultado, ele obteve aumento de celo-oligossacarídeo de 0,38 g para 0,63 g utilizando 5% de celulose assim aumentando seu rendimento de 15,00% para 25,28%, enquanto a seletividade de celo-oligossacarídeo aumentou de

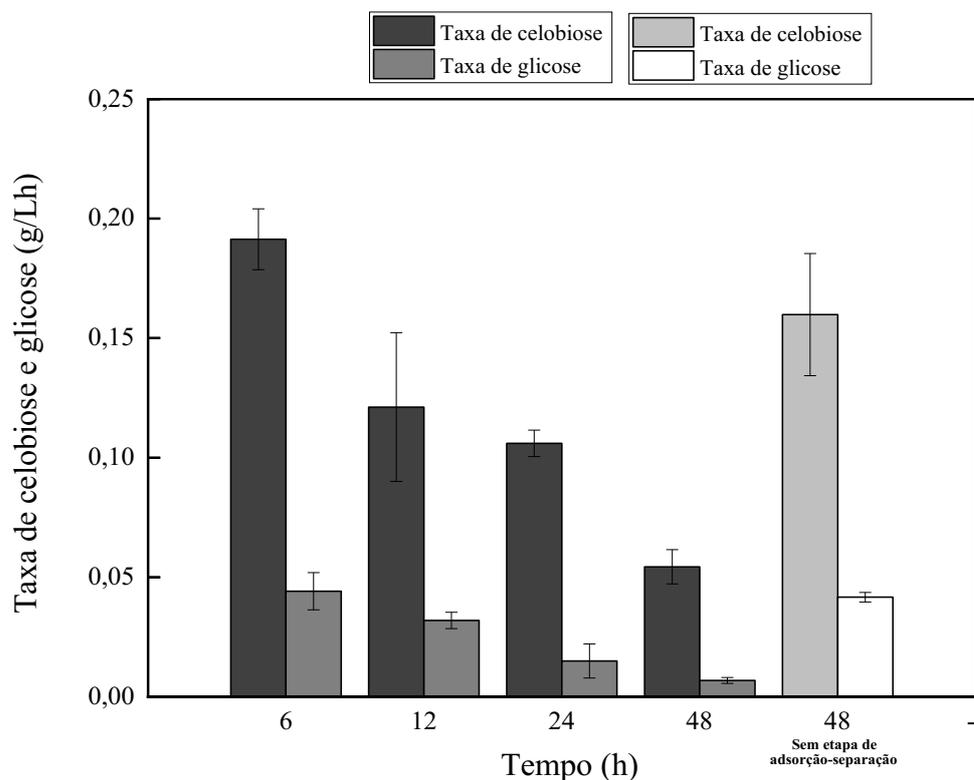
29,73% para 60,19%. Ainda comentou que essa seletividade para os celooligosacarídeos seria obtida pela adsorção-separação feita no início do procedimento, na qual, tem a remoção da β -glicosidase que quebra os oligossacarídeos em glicose. Sobre o rendimento da hidrólise enzimática em sua pesquisa os autores perceberam que houve uma diminuição de rendimento de 50,46% para 42% devido a retirada da β -glicosidase e do aumento da concentração de celooligosacarídeo que pode causar uma inibição nas enzimas, diminuindo assim o rendimento enzimático.

Rovera et al. (2018) produziram açúcares (celobiose e glicose) a partir da celulose bacteriana (BC) com a enzima celulase (*Trichoderma reesei* - ATCC26921) nas razões de enzima/BC: 0,25:1, 0,33:1, 0,5:1 e 1:1. Nos seus dados percebeu-se que a concentração de celobiose e glicose variaram de formas opostas em função da razão enzima /BC. A produção de celobiose e glicose foi realizada em 166 horas com as melhores produções, 0,25:1 obtendo $1,15 \pm 0,12$ g/L para a celobiose e a para a glicose (1:1 enzima/BC) foi de $2,95 \pm 0,28$ g/L. Cita também que a produção de celobiose aumentou com a concentração de substrato celulósico e diminuiu com aumento da razão de enzimas o que explica a produção de glicose, que converte os dissacarídeos em glicose com a enzima β -glicosidase.

Outra observação seria o monitoramento da cinética da taxa de produção de celobiose na hidrólise com 1 estágio após a etapa de “adsorção-separação” (Figura 14). A cinética foi analisada nos tempos 6 h, 12 h, 24 h e 48 h, e observou-se que a taxa de hidrólise apresenta uma diminuição significativa ao longo do tempo. A taxa de hidrólise inicialmente apresenta uma rápida taxa nas primeiras seis horas, chegando a $0,25$ gL-1h-1, e diminuindo até $0,054$ gL-1h-1 no final de 48 h. Essa redução na taxa de hidrólise pode estar relacionada à inibição do produto, que é um dos principais fatores que interferem na taxa de hidrólise.

A inibição do produto pode ser explicada pelo acúmulo de açúcares produzidos durante a hidrólise enzimática, que agem como inibidores da atividade enzimática. A celobiose é um dos açúcares produzidos na hidrólise, e sua acumulação pode inibir a atividade da enzima celulase, reduzindo assim a taxa de hidrólise. Para melhorar a produção de celobiose, seria necessário a remoção dos produtos, ou seja, os açúcares produzidos na hidrólise enzimática e uma estratégia seria a produção de celobiose por estágios. Além disso, utilizar outras estratégias, como a otimização da concentração de celulase e do tempo de reação.

Figura 14. Cinética da taxa de produção de celobiose e glicose analisada nos tempos 6 h, 12 h, 24 h, 48 h e 48 h sem a etapa de adsorção-separação.



5.4.2 Hidrólise enzimática com Múltiplos estágios

Pensando em melhorar o desempenho de inibição do produto, a seletividade e o rendimento da celobiose, foi realizada a hidrólise com estágios, que retira os açúcares produzidos do sistema de reação após cada estágio de hidrólise. Ao renovar o tampão, a hidrólise continua nas mesmas condições anteriores e esperava-se melhora significativamente o rendimento de celobiose e o rendimento da hidrólise enzimática (Tabela 6).

Ao realizar a hidrólise com estágios percebe-se um aumento no rendimento de celobiose na hidrólise com três e quatro estágios de 11,33% e 15,45%, respectivamente, comparados à hidrólise de um estágio que obteve 9,26% e quando comparados por diferentes tempos de hidrólise. Em 12 h, o rendimento da hidrólise enzimática do estágio 4 foi maior comparado ao rendimento obtido pela hidrólise com três estágios, sendo eles, 8,99% e 2,55% respectivamente. Isso pode indicar que a lavagem, ou seja, a retirada do tampão contendo os açúcares entre os estágios resultou no aumento de rendimento de hidrólise enzimática e melhorou a eficiência da enzima que se manteve adsorvida na celulose.

Tabela 6. Produção de celobiose, glicose e seus rendimentos em hidrólise enzimática com estágios (1, 2, 3 e 4) e com hidrólise enzimática sem a etapa de “adsorção-separação”.

Estratégias	Celobiose (g/L)	Glicose (g/L)	Rendimento Hidrólise enzimática (%)	Rendimento celobiose (%)	Seletividade celobiose (%)
4 estágios					
6 h	1,18±0,03	0,24±0,06	4,63±0,27	3,92±0,09	77,22±3,87
6 h	0,93 ±0,02	0,42±0,07	4,36±0,28	3,02±0,07	75,57±1,59
12 h	0,9±0,03	0,18±0,01	3,51±0,14	2,98±0,11	84,44±0,56
24 h	0,74±0,01	0,20±0,02	3,06±0,010	2,48±0,04	82,41±1,69
Total	3,74	1,03	15,57	12,45	80,11
3 estágios					
12 h	0,53±0,11	0,26±0,06	2,55±0,53	1,76±0,36	69,07±0,41
12 h	0,58±0,05	0,18±0,00	2,47±0,17	1,93±0,17	77,92±1,40
24 h	1,7±0,07	0,22±0,0	6,30±0,23	5,65±0,22	89,66±0,49
Total	2,803	0,662	11,33	9,34	82,47
2 estágios					
24 h	0,78±0,04	0,27±0,04	3,41±0,09	2,60±0,12	76,80±2,68
24 h	0,94±0,05	0,20±0,01	3,67±0,05	3,05±0,15	83,24±1,06
Total	1,72	0,47	7,07	5,65	80,36
1 estágio					
48 h	2,6±0,28	0,33±0,01	9,26±0,62	9,38±0,28	88,90±0,38
Sem adsorção					
48 h	7,67±0,12	2,00±0,08	31,7±0,20	25,58±0,41	80,70±0,78

Pode-se observar, um aumento na concentração de celobiose após 48 h quando se aplicou 1, 2, 3 e 4 estágios, sendo os valores os seguintes: 2,61 g/L, 1,72 g/L, 2,80 g/L e 3,74 g/L, respectivamente. Porém, percebe-se que há uma redução de celobiose em g/L no sistema de quatro estágio entre 24 h e 48 h, podendo indicar que o longo tempo de hidrólise pode afetar a produção de celobiose, assim como a próprio produto (celobiose) pode afetar a atividade da enzima inibindo a produção de dissacarídeos e outros produtos da hidrólise (BEHERA et al., 2017).

Na literatura, há relatos que a celobiose pode inibir a ligação de celulasas pela formação de um complexo enzima-sacarídeo e sua presença causa grande impacto na hidrólise e na produção de COS. Portanto, a remoção dos açúcares retidos a cada estágio seria eficaz para a melhora de produção do COS e rendimento da hidrólise enzimática (CHU et al., 2014).

Na pesquisa de CHU et al. (2014), também foi realizado a hidrólise enzimática em estágios em celulose extraído de resíduos de milho, contendo experimentos de dois estágios (estratégia 1: 6 + 18 h; estratégia 2: 10 + 14 h; estratégia 3: 12 + 12 h; estratégia 4: 14 + 10 h; estratégia 5: 18 + 6 h) e três estágios (estratégia 6: 6 + 6 + 12 h; estratégia 7: 6 + 8 + 10 h; estratégia 8: 8 + 8 + 8 h; estratégia 9: 6 + 12 + 6 h). Os rendimentos ótimos de celo-oligossacarídeos de hidrólise em um estágio, dois estágios e três estágios foram de 25,28%, 40,33% e 51,78%, respectivamente. Os rendimentos ótimos de hidrólise enzimática foram simultaneamente melhorados para 61,76% e 75,56%, respectivamente, na hidrólise em dois estágios e em três estágios. Ainda comenta que com o aumento do tempo do primeiro estágio, o rendimento de celo-oligossacarídeos diminuiu, pois os celo-oligossacarídeos produzidos no primeiro estágio podem ser convertidos em glicose pela β -glicosidase residual.

A presença da β -glicosidase clivam as ligações glicosídicas (BEHERA et al., 2017), o que explica também a produção de celobiose sem “adsorção-separação” nessa pesquisa que obteve $7,67 \pm 0,173$ g/L devido a presença de mais enzimas que quebram os tris sacarídeos em di e mono e que não são retiradas na lavagem. Dito isso, a existência de β -glicosidase residual deixada pelo processo de “adsorção-separação” converte os celobiose em glicose obtendo um aumento a cada estágio, sendo elas 0,39 g/L, 0,45 g/L, 0,66 g/L e 1,031 g/L, porém não tão excessiva como observada na hidrólise enzimática com 1 estágio e sem “adsorção-separação” ($2,04 \pm 0,098$ g/L). Método de lavagem/reciclagem de enzima é observado por Gomes et al., (2018) que analisaram o processo de eficiência de reciclagem de celulase para produção de bioetanol a partir de lodo de papel reciclado. Ele verificou a produção de bioetanol com três compósitos de enzimas, Celluclast, Accerelase e a Cellic Ctec 2, dentre elas, a Celluclast apresentou resistência e não indicou nenhuma perda de atividade nas condições utilizadas (40 °C e pH 4,8). Ainda Gomes et al. (2018), realizaram a reutilização da enzima em 1, 2, 3 e 4 rodadas e percebeu que houve diminuição da produção de glicose (g/L) depois da reutilização da enzima no 2, 3 e 4 ° rodadas, ele explica que essa redução poderia ser devido as diferentes esterilizações dos sólidos e devido as enzimas já terem realizado um ciclo de hidrólise e fermentação, o que pode causar uma certa redução na sua eficiência.

Visto isso, pode se dizer que as lavagens realizadas a cada estágio reutiliza a enzima do estágio anterior, que reduz a produção de celobiose e glicose devido a celulose utilizada (bacteriana) e pelas lavagens que compromete a eficiência da enzima.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, a avaliação da produção e aplicação de celulose bacteriana usando SCOBY de Kombuchá em extrato de acerola verde foi possível avaliar o efeito dos inóculos. Dessa forma, conclui-se que as composições microbianas tiveram preferências à glicose do que a frutose produzindo ao final de 12 dias, 0,36 g/L de celulose. Já os estudos sobre o efeito das diferentes concentrações de inóculo conclui-se que o inóculo de 6 dias foi o que apresentou melhor desenvolvimento da bebida (ácido acético, etanol) e na produção de celulose quando adicionada 7,5% de inóculo. Além disso, ao avaliar os efeitos da quantidade de açúcar no meio de fermentação observou-se que a produção de celulose foi maior para a concentração de 70 g/L de açúcar. E que o efeito do 20 g/L de glicose/frutose adicionado foi semelhante a todos os sistemas de análises do projeto.

No processo de hidrólise enzimática, a adsorção da enzima endoglucanase e separação da enzima β -glicosidase na celulose foi favorável para a próxima etapa de obtenção de celobiose e glicose utilizando a hidrólise enzimática. Nos resultados da hidrólise em um único estágio mostraram a seletividade maior a celobiose devido a retirada de β -glicosidase. E nos resultados de múltiplos estágios, foi utilizada para amenizar a inibição do produto (enzima-substrato) em cada estágio, contribuindo para melhorar o rendimento de celo-oligossacarídeos no final do processo.

TRABALHOS FUTUROS

- Analisar a produção de celulose bacteriana quanto ao tempo e variações de temperatura de incubação.
- Analisar a atividade microbiológica quando a mudança de meio açucarado na bebida kombuchá.
- Otimização da concentração de celulase e do tempo de reação para melhorar a taxa de produção de celobiose.
- Utilizar métodos de separação por membranas para separar os açúcares produzidos na quebra de celulose bacteriana.
- Utilizar a celobiose como açúcar na produção da bebida tipo kombuchá.

REFERÊNCIAS

- (G1), F. M. **MEI de venda de kombuchá cresce 70% e segue tendência do setor de bebidas.** 2021Disponível em: <<https://g1.globo.com/empreendedorismo/noticia/2021/09/25/mei-de-venda-de-kombucha-cresce-70percent-e-segue-tendencia-do-setor-de-bebidas.ghtml>>
- ABEL, M.; ANDRESON, H. Effect of simultaneous inoculation of commercial yeast starter cultures on kombucha fermentation. **Agronomy Research**, v. 18, n. Special Issue 3, p. 1603–1615, 2020.
- ABUDUAIBIFU, A. Evaluation of physicochemical and bioaccessibility properties of goji berry kombucha. n. May, p. 1–14, 2019.
- AKBARIRAD, H. et al. Employing of the Different Fruit Juices Substrates in Vinegar Kombucha Preparation. **Current Nutrition & Food Science**, v. 13, n. 4, 22 set. 2017.
- ASHRAFI, A.; JOKAR, M.; MOHAMMADI NAFCHI, A. Preparation and characterization of biocomposite film based on chitosan and kombucha tea as active food packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 444–454, 2018.
- AUTA, R.; ADAMUS, G.; KWIECIEN, M.; KWIECIEN, M.; RADECKA, I.; HOOLEY, P. Production and characterization of bacterial cellulose before and after enzymatic hydrolysis. **African J Biotechnol**, v. 16, p. 470–482, 2018.
- AVCIOGLU, N. H.; BIRBEN, M.; SEYIS BILKAY, I. Optimization and physicochemical characterization of enhanced microbial cellulose production with a new Kombucha consortium. **Process Biochemistry**, v. 108, n. February, p. 60–68, 2021a.
- AVCIOGLU, N. H.; BIRBEN, M.; SEYIS BILKAY, I. Optimization and physicochemical characterization of enhanced microbial cellulose production with a new Kombucha consortium. **Process Biochemistry**, v. 108, n. June, p. 60–68, 2021b.
- AYED, L.; BEN ABID, S.; HAMDI, M. Development of a beverage from red grape juice fermented with the Kombucha consortium. **Annals of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 111–121, 2017.
- BEHERA, B. C. et al. Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 197–210, 2017.

- BHATTACHARYA, S.; GACHHUI, R.; SIL, P. C. Effect of Kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 328–340, 2013.
- BRANDES, R.; DE SOUZA, L.; CARMINATTI, C.; RECOUVREUX, D. Production with a High Yield of Bacterial Cellulose Nanocrystals by Enzymatic Hydrolysis. **Int J Nanosci**, v. 19, p. 1–8, 2020.
- BORTOLOMEDI, B. M.; PAGLARINI, C. S.; BROD, F. C. A. Bioactive compounds in kombucha: A review of substrate effect and fermentation conditions. **Food Chemistry**, v. 385, n. March, p. 132719, 2022.
- BRANDÃO, S. Atividade inibitória de bebidas fermentadas artesanais por bactérias enteropatogênicas Inhibitory activity of handcrafted fermented drinks by enteropathogenic bacteria. p. 6538–6553, 2021.
- BUENO, F.; CHOULJENKO, A.; SATHIVEL, S. Development of coffee kombucha containing *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei*: Gastrointestinal simulations and DNA microbial analysis. **Lwt**, v. 142, n. January, p. 110980, 2021.
- CHAKRAVORTY, S. et al. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 220, p. 63–72, 2016.
- CHEN, K. et al. Use of non-Saccharomyces yeasts and oenological tannin in red winemaking: Influence on colour, aroma and sensorial properties of young wines. **Food Microbiology**, v. 69, p. 51–63, 2018.
- CHU, Q. et al. Functional cello-oligosaccharides production from the corncob residues of xylo-oligosaccharides manufacture. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 8, p. 1217–1222, 2014.
- CITRUS BR. **Produção de Kombuchá se multiplica no Brasil**. Disponível em: <<https://citrusbr.com/noticias/noticias-256/>>.
- COELHO, R. M. D. et al. Kombucha: Review. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 22, n. October, p. 100272, 2020.
- CONTEXTO, R. et al. Propriedades Antioxidantes e Efeitos Antimicrobianos da Kombuchá: Revisão da Evidência Científica. v. 20, p. 244–251, 2020.
- EMILJANOWICZ, K. E.; MALINOWSKA-PAŃCZYK, E. Kombucha from alternative raw materials—The review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2019.

- ESSAWET, N. A. et al. Polifenoli i antioksidativna aktivnost kombuha napitka obogaćenog coffeeberry® ekstraktom. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly**, v. 21, n. 3, p. 399–409, 2015.
- FLORES-RUEDA, A. G. Antioxidant and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity of Eucalyptus camaldulensis and Litsea glaucescens Infusions Fermented with Kombucha Consortium. v. 54, n. 3, p. 367–373, 2016.
- GOMES, D.; GAMA, M.; DOMINGUES, L. Determinants on an efficient cellulase recycling process for the production of bioethanol from recycled paper sludge under high solid loadings. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2018.
- JAYABALAN, R.; MALBAŠA, R. V.; SATHISHKUMAR, M. Kombucha. **Reference Module in Food Science**, p. 1–8, 2016.
- KADIER, A. et al. Use of industrial wastes as sustainable nutrient sources for bacterial cellulose (BC) production: Mechanism, advances, and future perspectives. **Polymers**, v. 13, n. 19, 2021.
- KASHCHEYEVA, E. I. et al. A study of properties and enzymatic hydrolysis of bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 26, n. 4, p. 2255–2265, 2019.
- LEE, S.; KIM, C.-. **Characterization of Kombucha beverages fermented with various teas and tea fungus** *Preventive Nutrition and Food Science*, 2000. Disponível em: <<https://www.koreascience.or.kr/article/JAKO200011920126512.page>>
- LEONARSKI, E. et al. Production of kombucha-like beverage and bacterial cellulose by acerola byproduct as raw material. **Lwt**, v. 135, n. August 2020, p. 1–8, 2021a.
- LEONARSKI, E. et al. Typical kombucha fermentation: Kinetic evaluation of beverage and morphological characterization of bacterial cellulose. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 12, p. 1–9, 2021b.
- LEONARSKI, E., GUIMARÃES, A. C., CESCO, K., POLETTI, P. Production process and characteristics of kombucha fermented from alternative raw materials. **Food Bioscience**, v. 49, p. 101841, 2022.
- LIU, Y., ZHENG, Y., YANG, T., MAC REGENSTEIN, J., ZHOU, P. Functional properties and sensory characteristics of kombucha analogs prepared with alternative materials. **Trends in Food Science & Technology**, v. 169, p. 608-616, 2022.
- LONĂR, E. et al. Influence of working conditions upon Kombucha conducted fermentation of black tea. **Food and Bioproducts Processing**, v. 84, n. 3 C, p. 186–192, 2006.

- MAIA, Y. L. M. et al. Kombucha: Características e Aspectos Biológicos Kombucha: Characteristics and Biological Aspects. v. 03, n. 1, p. 114–123, 2020.
- MAPA. **IN nº41 setembro 2019.pdf**Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2019.
- MARSH, A. J. et al. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. **Food Microbiology**, v. 38, p. 171–178, 2014.
- METAB, P.; COMERCIAL, K. Caracterização do Perfil Metabólico do Kombucha Comercial por UHPLC-ESI-MS / MS e Molecular Networking. v. 55, n. 43, p. 10–11, [s.d.].
- 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.
- MOHAMMADSHIRAZI, A.; BAGHERI KALHOR, E. Energy and cost analyses of kombucha beverage production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 668–673, 2016.
- OLIVER-ORTEGA, H. et al. Bacterial cellulose network from kombucha fermentation impregnated with emulsion-polymerized poly (Methyl methacrylate) to form nanocomposite. **Polymers**, v. 13, n. 4, p. 1–17, 2021.
- PEI, J. et al. Isolation, purification, and structural identification of a new bacteriocin made by *Lactobacillus plantarum* found in conventional kombucha. **Food Control**, v. 110, n. September 2019, p. 106923, 2020.
- PENTTILÄ, P. A. et al. Enzymatic hydrolysis of biomimetic bacterial cellulose–hemicellulose composites. **Carbohydrate Polymers**, v. 190, n. October 2017, p. 95–102, 2018.
- PICCIRILLI, F. **A antiga nova bebida. pdf**Prisma Consultoria Internacional, 2019. Disponível em: <<https://www.prismajr.org/kombucha>>
- PUCINELLI, F. **Kombucha: O que é e como fazer?. pdf**BrewBlog, 2019. Disponível em: <lambrewshop.com.br/blog/2019/07/kombucha-parte-1.html>
- RAMANA, K. V. Occurrence of Cellulose-Producing *Gluconacetobacter* spp. in Fruit Samples and Kombucha Tea, and Production of the Biopolymer. p. 1162–1173, 2015.

- RAMÍREZ TAPIAS, Y. A. et al. Kombucha Tea By-product as Source of Novel Materials: Formulation and Characterization of Films. **Food and Bioprocess Technology**, v. 13, n. 7, p. 1166–1180, 2020.
- RAMÍREZ TAPIAS, Y. A. et al. Bacterial cellulose films production by Kombucha symbiotic community cultured on different herbal infusions. **Food Chemistry**, v. 372, n. September 2021, p. 131346, mar. 2022.
- ROVERA, C. et al. Enzymatic Hydrolysis in the Green Production of Bacterial Cellulose Nanocrystals. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 6, n. 6, p. 7725–7734, 2018.
- SHAHBAZI, H. et al. Effect of medicinal plant type and concentration on physicochemical, antioxidant, antimicrobial, and sensorial properties of kombucha. **Food Science and Nutrition**, v. 6, n. 8, p. 2568–2577, 2018.
- SOH, H.-S.; LEE, S.-P. **Production of Microbial Cellulose and Acids in Kombucha Preventive Nutrition and Food Science**, 2002.
- TRAN, T. et al. Microbiological and technological parameters impacting the chemical composition and sensory quality of kombucha. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 4, p. 2050–2070, 2020.
- TREVIÑO-GARZA, M. Z., GUERRERO-MEDINA, A. S., GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, R. A. ET. AL. Production of Microbial Cellulose Films from Green Tea (*Camellia Sinensis*) Kombucha with Various Carbon Sources. **Coatings**, v. 10, n. 1132, p. 14, 2020.
- ULUSOY, A.; TAMER, C. E. Determination of suitability of black carrot (*Daucus carota* L. spp. sativus var. atropurpureus Alef.) juice concentrate, cherry laurel (*Prunus laurocerasus*), blackthorn (*Prunus spinosa*) and red raspberry (*Rubus idaeus*) for kombucha beverage production. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 13, n. 2, p. 1524–1536, 2019.
- VILLARREAL-SOTO, S. A. et al. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 3, p. 580–588, 2018.
- VILLARREAL-SOTO, S. A. et al. Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. **Process Biochemistry**, v. 83, n. May, p. 44–54, 2019.

VILLARREAL-SOTO, S. A. et al. Metabolome-microbiome signatures in the fermented beverage, Kombucha. **International Journal of Food Microbiology**, v. 333, n. December 2019, p. 108778, 2020.

VILLARREAL-SOTO, S. A. et al. Physicochemical properties of bacterial cellulose obtained from different Kombucha fermentation conditions. **Journal of Vinyl and Additive Technology**, v. 27, n. 1, p. 183–190, 2021.

WANG, S. et al. Effect of synthetic microbial community on nutraceutical and sensory qualities of kombucha. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 10, p. 3327–3333, 2020.

WOOD, J. et al. Reproducibility of Bacterial Cellulose Nanofibers Over Sub-Cultured Generations for the Development of Novel Textiles. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, n. April, p. 1–10, 2022.

YANTI, N. A.; AHMAD, S. W.; MUHIDDIN, N. H. Evaluation of inoculum size and fermentation period for bacterial cellulose production from sago liquid waste. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1116, n. 5, 2018.

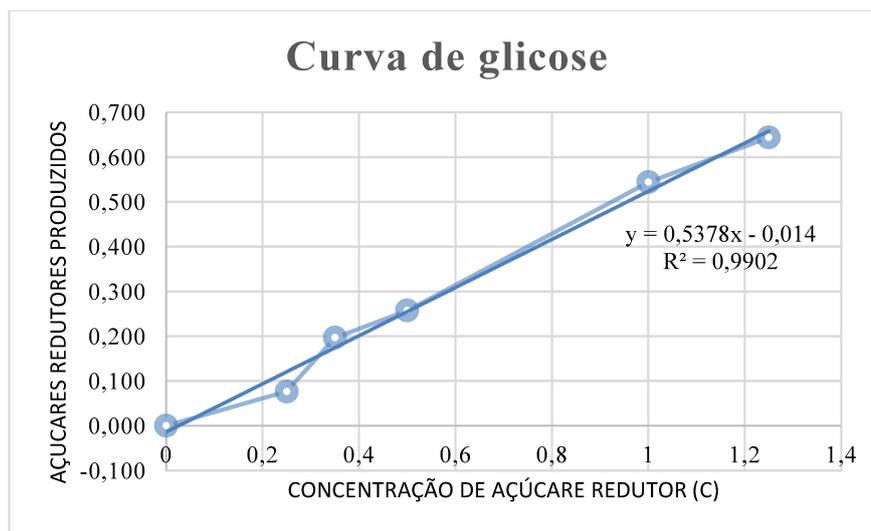
ZUBAIDAH, E. et al. Potential of snake fruit (*Salacca zalacca* (Gaerth.) Voss) for the development of a beverage through fermentation with the Kombucha consortium. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 13, n. September 2017, p. 198–203, 2018.

ANEXO

ATIVIDADE ENZIMÁTICA

ENZIMA CELLUCLAST

Gráfico 1. Curva de glicose.



EQUAÇÕES

$$C = \frac{(AR + 0,014)}{0,5378} \quad (1)$$

$$\frac{U}{mL} = ART * \frac{V_T}{0,18 * V_E * t} \quad (2)$$

Sendo que:

C – Concentração de AR

CE – Concentração da enzima

D – Diluição

AR – Açúcares redutores produzidos na etapa de hidrólise (mg/mL);

V_T – Volume total utilizado na hidrólise (Volume do tampão + Volume do extrato enzimático) (mL);

0,18 – Massa molar de glicose (mg/ μ mol);

V_E – Volume do extrato enzimático utilizado na hidrólise (mL);

t – Tempo de hidrólise (minutos).

	Diluição	ART	Média ART	C	C*D	C-CE	Atividade
Amostra 1	100	0,7	0,729	1,3816	138,16	133,41	37,06
		0,758					
Amostra 2	250	0,292	0,288	0,5615	140,39	127,84	35,51
		0,284					
Amostra 3	500	0,171	0,171	0,3440	172,00	143,18	39,77
		0,171					
CE1	100	0,011	0,0115	0,0474	4,74		
		0,012					
CE2	250	0,013	0,013	0,0502	12,55		
		0,013					
CE3	500	0,017	0,017	0,0576	28,82		
		0,017					
CE - Concentração de enzima, C- concentração de AR, D – diluição. Considerando que foi a enzima foi diluída 50X e depois em reação de adsorção mais 50X, pode ser considerada que a atividade enzimática da solução de adsorção foi de 1250X.							
Atividade enzimática		0,034					

Tabela 7. Dados da atividade enzimática.

ETAPA DE ADSORÇÃO-SEPARAÇÃO

Taxa de adsorção

$$= \frac{\text{Atividade inicial} \left(\frac{U}{g}\right) - \text{atividade enzimática após a adsorção} \left(\frac{U}{g}\right)}{\text{Atividade inicial} \left(\frac{U}{g}\right)} \quad (3)$$

Tabela 8. Dados de atividade enzimática e taxa de retenção da enzima na celulose após a etapa de retenção

Estágios	Atw. Inicial (U/mL)	Atw. Final (U/mL)	Atw. Enz. Inicial - Atw. Final (U/mL)	Taxa de retenção enzima (%)
1	0,034	0,0025	0,0315±0,001	92,57
2		0,0049	0,0291±0,004	85,52
3		0,0015	0,0325±0,001	95,70
4		0,0047	0,0293±0,001	86,31

Tabela 9. Dados de absorvância, atividade enzimática, taxa de retenção de enzima e a diferença de atividade enzimática da enzima e do sobrenadante, nas amostras dos estágios 1, 2, 3 e 4 estágios após a etapa de adsorção-separação.

Estágios	ABS	[] de glicose (mg/mL)	Média ([] de glicose)	CE	C-CE	Atw. Enzimática (sobrenadante) (eq. 1)	Taxa de retenção enzima (%)	Taxa de retenção enzima (%) (DP)																																																																			
1	0,008	0,015	0,018	0,008	0,0105	0,0029	91,3918	1,174																																																																			
	0,011	0,021							1	0,005	0,010	0,015	0,006	0,0077	0,0021	93,7395	0,011	0,021	2	0,006	0,011	0,011	0	0,0038	0,0011	96,8698	0,004	0,006	0,011	2	0,021	0,040	0,039	0,003	0,0316	0,0088	74,1755	0,020	0,038	3	0,005	0,010	0,009	0,003	0,0010	0,0003	99,2174	0,001	0,004	0,008	3	0,009	0,017	0,017	0,008	0,0096	0,0027	92,1744	0,009	0,017	4	0,008	0,015	0,019	0,004	0,0115	0,0032	90,6093	0,001	0,012	0,023	4	0,017	0,033	0,030
1	0,005	0,010	0,015	0,006	0,0077	0,0021	93,7395																																																																				
	0,011	0,021							2	0,006	0,011	0,011	0	0,0038	0,0011	96,8698	0,004	0,006	0,011	2	0,021	0,040	0,039	0,003	0,0316	0,0088		74,1755	0,020	0,038	3	0,005	0,010	0,009	0,003	0,0010	0,0003	99,2174	0,001	0,004	0,008	3	0,009	0,017	0,017	0,008	0,0096		0,0027	92,1744	0,009	0,017	4	0,008	0,015	0,019	0,004	0,0115	0,0032	90,6093	0,001	0,012	0,023	4	0,017	0,033	0,030	0,007		0,0220	0,0061	82,0011	0,014	0,027	
2	0,006	0,011	0,011	0	0,0038	0,0011	96,8698	0,004																																																																			
	0,006	0,011							2	0,021	0,040	0,039	0,003	0,0316	0,0088	74,1755		0,020	0,038	3	0,005	0,010	0,009	0,003	0,0010	0,0003	99,2174	0,001	0,004	0,008	3	0,009	0,017	0,017	0,008	0,0096	0,0027	92,1744		0,009	0,017	4	0,008	0,015	0,019	0,004	0,0115	0,0032	90,6093	0,001	0,012	0,023	4	0,017	0,033	0,030	0,007	0,0220	0,0061	82,0011		0,014	0,027												
2	0,021	0,040	0,039	0,003	0,0316	0,0088	74,1755																																																																				
	0,020	0,038							3	0,005	0,010	0,009	0,003	0,0010	0,0003	99,2174	0,001	0,004	0,008	3	0,009	0,017	0,017	0,008	0,0096	0,0027	92,1744		0,009	0,017	4	0,008	0,015	0,019	0,004	0,0115	0,0032	90,6093	0,001	0,012	0,023	4	0,017	0,033	0,030	0,007	0,0220	0,0061	82,0011		0,014	0,027																							
3	0,005	0,010	0,009	0,003	0,0010	0,0003	99,2174	0,001																																																																			
	0,004	0,008							3	0,009	0,017	0,017	0,008	0,0096	0,0027	92,1744		0,009	0,017	4	0,008	0,015	0,019	0,004	0,0115	0,0032	90,6093	0,001	0,012	0,023	4	0,017	0,033	0,030	0,007	0,0220	0,0061	82,0011		0,014	0,027																																		
3	0,009	0,017	0,017	0,008	0,0096	0,0027	92,1744																																																																				
	0,009	0,017							4	0,008	0,015	0,019	0,004	0,0115	0,0032	90,6093	0,001	0,012	0,023	4	0,017	0,033	0,030	0,007	0,0220	0,0061	82,0011		0,014	0,027																																													
4	0,008	0,015	0,019	0,004	0,0115	0,0032	90,6093	0,001																																																																			
	0,012	0,023							4	0,017	0,033	0,030	0,007	0,0220	0,0061	82,0011		0,014	0,027																																																								
4	0,017	0,033	0,030	0,007	0,0220	0,0061	82,0011																																																																				
	0,014	0,027																																																																									