

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CURSO ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Giulia Valar Martini

**PERSPECTIVAS DE REAPROVEITAMENTO DE CELULOSE
BACTERIANA DE KOMBUCHA POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA
OBTENÇÃO DE AÇÚCARES**

Florianópolis - SC

2022

Giulia Valar Martini

**PERSPECTIVAS DE REAPROVEITAMENTO DE CELULOSE
BACTERIANA DE KOMBUCHA POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA
OBTENÇÃO DE AÇÚCARES**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof. Dra. Patrícia Poletto

Coorientador: M.Sc. Eduardo Leonarski

Florianópolis - SC

2022

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

Martini, Giulia Valar

Perspectivas de reaproveitamento de celulose bacteriana de kombucha por hidrólise enzimática para obtenção de açúcares / Giulia Valar Martini ; orientadora, Patrícia Poletto, coorientador, Eduardo Leonarski, 2022.

64 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico,
Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Celulose bacteriana. 3. Hidrólise enzimática. 4. Kombucha. I. Poletto, Patrícia. II. Leonarski, Eduardo. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Giulia Valar Martini

**PERSPECTIVAS DE REAPROVEITAMENTO DE CELULOSE
BACTERIANA DE KOMBUCHA POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA
OBTENÇÃO DE AÇÚCARES**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos

Florianópolis, 22 de março de 2022.

Prof. Dr. João Borges Laurindo
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof^a. Patrícia Poletto, Dr^a.
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Marco Di Luccio, Dr.
Avaliador
Universidade Federal de Santa Catarina

Lauren Bergmann, M.Sc.
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado aos amigos e à minha família, que me apoiam e incentivam todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar agradecendo minha família, por todo o apoio e suporte. À minha mãe, Grasielle Valar Martini, por todo o amor e carinho fornecido. Ao meu pai, Eduardo Luiz Martini, pelo companheirismo e incentivo todos os dias. Ao meu irmão, Bruno Valar Martini, por ser meu parceiro nas horas mais difíceis nesse período.

Ao meu namorado, Yago, por toda a força, apoio e carinho dedicados, além da compreensão e paciência nessa jornada.

Aos meus amigos queridos da faculdade, especialmente ao Kauê Vettorazzo Pigozzi, por todo o incentivo e companheirismo durante a trajetória da faculdade. Às minhas amigas de infância, Camila e Letícia, por me acompanharem sempre.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Patrícia Poletto, pela confiança e por todos os ensinamentos e auxílio nesse trabalho. Ao meu coorientador, M.Sc. Eduardo Leonarski, por me acompanhar nas atividades do laboratório e estar sempre disponível para me ajudar.

Ao Prof. Dr. Marco Di Luccio e à M.Sc. Laura Bergmann, por aceitarem fazer parte da banca e contribuir ainda mais para esse trabalho.

Ao LiEB, por conceder o espaço para realizar a pesquisa e à Pod Kombucha, por fornecer a matéria prima.

À Universidade Federal de Santa Catarina e a todos os professores que proporcionaram conhecimento para minha formação em Engenharia de Alimentos.

RESUMO

A kombucha é uma bebida adocicada à base de chá fermentado, e uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras (SCOBY) é responsável pelo processo de fermentação. O aumento global da produção de kombucha vem crescendo a um CAGR (taxa de crescimento anual composta) de 22,5%, e conseqüentemente a produção de celulose bacteriana aumenta. Com isso, boa parte do SCOBY é descartado inadequadamente, fazendo com que cientistas busquem alternativas para o reaproveitamento do biofilme. Neste trabalho, foi feito um levantamento das principais alternativas que estão sendo estudadas para o SCOBY, como aplicação na indústria alimentícia, indústria têxtil e da moda, engenharia de tecidos e aplicações biomédicas. O presente trabalho propõe como alternativa a hidrólise enzimática da celulose bacteriana de kombucha para obtenção de açúcares. O SCOBY, concedido pela indústria Pod Kombucha, foi seco e purificado para análises. Concluiu-se que a matéria prima se trata de uma celulose do tipo I e com uma cristalinidade alta de 88,27%. Os produtos da hidrólise da celulose bacteriana realizada em três diferentes concentrações 2%, 3% e 4% (m/v) foram analisados em HPLC. Os resultados mostraram que, a partir da celulose de kombucha, pode-se obter celobiose e glicose, com concentrações iguais a 11,28 g/L e 3,55 g/L, respectivamente, após 72 h de reação a 4% (m/v) de celulose bacteriana. Apesar de uma produção de açúcares satisfatória, a conversão da celulose foi baixa (34,78%) em 4% (m/v) de celulose bacteriana, sendo o maior rendimento em 2% (m/v) (40,44%). Apesar disso, a celulose bacteriana de kombucha apresentou potencial para a produção de açúcares, principalmente celobiose que pode ser usado como agente prebiótico.

Palavras-chave: Kombucha, celulose bacteriana, hidrólise enzimática, celobiose, glicose.

ABSTRACT

Kombucha is a sweet fermented tea-based drink, and a symbiotic culture of bacteria and yeast (SCOBY) is responsible for the fermentation process. The global increase in kombucha production is growing at a CAGR (compound annual growth rate) of 22.5%, and consequently bacterial cellulose production increases. As a result, much of the SCOBY is inappropriately discarded, causing scientists to look for alternatives to reuse the biofilm. In this work, a survey was made of the main alternatives that are being studied for SCOBY, such as application in the food industry, textile and fashion industry, tissue engineering and biomedical applications. The present work proposes as an alternative the enzymatic hydrolysis of bacterial cellulose from kombucha to obtain sugars. The SCOBY, awarded by the Pod Kombucha industry, was dried and purified for analysis. It was concluded that the raw material is a type I cellulose with a high crystallinity of 88.27%. The products of bacterial cellulose hydrolysis performed at three different concentrations 2%, 3% and 4% (w/v) were analyzed on HPLC. The results showed that, from kombucha cellulose, cellobiose and glucose can be obtained, with concentrations equal to 11.28 g/L and 3.55 g/L, respectively, after 72 h of reaction at 4% (w /v) of bacterial cellulose. Despite a satisfactory sugar production, the cellulose conversion was low (34.78%) at 4% (w/v) of bacterial cellulose, with the highest yield at 2% (w/v) (40.44%). Despite this, bacterial cellulose from kombucha showed potential for the production of sugars, mainly cellobiose, which can be used as a prebiotic agent.

Keywords: Kombucha, bacterial cellulose, enzymatic hydrolysis, cellobiose, glucose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processo de elaboração da kombucha.....	19
Figura 2 - Formação do SCOBY filho a partir de um SCOBY mãe na fermentação da kombucha.	24
Figura 3 - Imagem microscópica das fibras de celulose bacteriana. A figura "a" indica a parte inferior que está em contato com o líquido, e a figura "b" indica a parte superior em contato com o ar.	25
Figura 4 - Estrutura das fibras de celulose obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura, onde "PC" corresponde à celulose vegetal e "BC" à celulose bacteriana.	27
Figura 5 - Diferentes aplicações da celulose bacteriana produzidas em kombucha. .	28
Figura 6 - Mecanismo de ação catalítica da celulase sobre a celulose com produção de celobiose e glicose.	36
Figura 7 - Corte do biofilme de celulose de uma produção da bebida pela Pod Kombucha.....	39
Figura 8 - a) Celulose após 3 dias em solução de NaOH; b) após 5 dias; c) após 6 dias; d) após 9 dias.	40
Figura 9 - a) Celulose purificada e úmida; b) celulose após 24 h na estufa; c) celulose seca.	41
Figura 10 – A) FTIR e B) DRX da celulose bacteriana de indústria.	45
Figura 11 - A) FTIR e B) DRX da celulose bacteriana produzida em laboratório. ...	45
Figura 12 - Concentração (g/L) de celobiose e glicose obtidos por hidrólise enzimática de celulose bacteriana de kombucha a 2%, 3% e 4% (m/v) de celulose após 72 h.....	46
Figura 13 - Cromatogramas dos produtos da hidrólise enzimática com A) 2%, B) 3% e C) 4% (m/v) de celulose após 72 h.	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais estudos realizados sobre a hidrólise enzimática de celulose bacteriana.....	33
Quadro 2 - Enzimas atuantes na hidrólise da celulose.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros da fermentação de kombucha preparada com chá verde e chá preto (<i>Camelia Sinensis</i>).....	20
Tabela 2 – Microrganismos presentes na kombucha.....	22
Tabela 3 - Quantidades reacionais do substrato, enzima e tampão.	42
Tabela 4 – Rendimento (%) de celobiose e glicose obtidos por hidrólise enzimática da celulose bacteriana de kombucha.	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SCOBY *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*

SC Santa Catarina

MAPA Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

CAGR Taxa de crescimento anual composta

ABKOM Associação Brasileira de Kombucha

REE Elementos de terras raras

GH Glicosil hidrolases

EGs Endoglucanases

CBHI e IIs Celobiohidrolases ou exoglucanases

BGs β -glicosidases

COS Celo-oligossacarídeos

AGCCs Ácidos Graxos de Cadeia Curta

LiEB Laboratório de Engenharia Biológica

CP Ceratoplatanina tipo expansina

FTIR Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier

DRX Difrátômetro de raios X

HPLC Cromatografia Líquida de Alto Desempenho

ATR Refletância total atenuada

IR Índice de refração

BC Celulose bacteriana

KBI *Kombucha Brewers International*

MEV Microscopia Eletrônica de Varredura

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS	16
1.1.1	Objetivo Geral.....	16
1.1.2	Objetivos Específicos	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	DEFINIÇÃO DE KOMBUCHA	18
2.1.1	Histórico e futuro da Kombucha.....	18
2.2	PROCESSO FERMENTATIVO	19
2.2.1	Composição microbiana	22
2.3	FORMAÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA.....	23
2.3.1	Composição bioquímica da celulose.....	26
2.3.2	Estrutura molecular	26
2.3.3	Aplicações da celulose bacteriana	28
2.3.3.1	<i>Adsorvente e eletrônicos ecológicos.....</i>	29
2.3.3.2	<i>Indústria alimentícia.....</i>	30
2.3.3.3	<i>Desenvolvimento de biomateriais e indústria da moda.....</i>	30
2.3.3.4	<i>Outras aplicações</i>	31
2.4	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	32
2.4.1.1	<i>Mecanismo de ação das enzimas.....</i>	35
2.4.1.2	<i>Produtos da hidrólise enzimática</i>	36
3	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1	CELULOSE BACTERIANA	38
3.2	TRATAMENTO DA CELULOSE.....	39
3.2.1	Purificação da celulose bacteriana	39
3.2.2	Secagem da celulose.....	40

3.3	CARACTERIZAÇÃO DA CELULOSE.....	41
3.3.1	Propriedades físico-químicas.....	41
3.3.2	Cristalinidade.....	41
3.4	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	42
3.4.1	Secagem após hidrólise.....	43
3.4.2	Concentração dos sacarídeos.....	43
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA CELULOSE.....	44
4.1.1	Espectroscopia FTIR de amostras de celulose bacteriana.....	44
4.1.2	Análise de cristalinidade por difração de raios X.....	44
4.2	CONCENTRAÇÃO DE CELOBIOSE E GLICOSE OBTIDOS NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	46
4.2.1	Rendimentos de celobiose e glicose	50
4.3	POTENCIAL USO DO SCOPY PARA PRODUÇÃO DE CELOBIOSE: ESTUDO DE CASO “POD KOMBUCHA”	53
5	CONCLUSÃO.....	54
	REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

Kombucha é uma bebida fermentada de sabor adocicado, refrescante e levemente carbonatada. É obtida através da respiração aeróbia e fermentação anaeróbia, onde a cultura simbiótica de bactérias e leveduras (SCOBY) é responsável pelo processo de fermentação, e o chá verde ou preto (*Camellia sinensis*) é o extrato para a fermentação da bebida (CHAKRAVORTY et al., 2016). Suas características sensoriais podem variar de acordo com a combinação dos ingredientes, dependendo de fatores como o tempo e temperatura de fermentação, microrganismos presentes no SCOBY, assim como sua localização geográfica e climática (GAGGIÀ et al., 2019).

A fermentação da kombucha é uma combinação de três vias metabólicas (alcoólica, láctica e acética), e é considerada uma das principais etapas da sua produção. É na fermentação que ocorre a liberação de componentes como ácido acético, glucônico e o etanol provenientes da fase líquida fermentada, assim como o desenvolvimento do biofilme celulósico onde microrganismos ficam aderidos. Esse biofilme, tradicionalmente chamado de SCOBY “filho”, é comumente utilizado como inóculo em futuras fermentações de kombucha, sendo originado pelo alargamento do SCOBY “mãe”, inóculo proveniente de uma kombucha pré-fermentada (NEFFE-SKOCIŃSKA et al., 2017).

O biofilme celulósico gerado pela fermentação da kombucha é composto por fibrilas de celulose pura (DIMA et al., 2017). Sua produção é influenciada pela fonte de carbono utilizada no meio, além da composição microbiana do SCOBY. A celulose bacteriana possui propriedades únicas como alta cristalinidade, resistência à tração e ser muito insolúvel. Fazendo uma comparação com a celulose vegetal, esta possui lignina, pectina e hemicelulose em sua composição, necessitando de tratamentos altamente poluentes para sua utilização. A celulose bacteriana, por não conter esses compostos, possui um potencial econômico muito interessante, visto que sua rede de fibras é mais fina e menos rígida, sendo portanto considerada mais ecológica (KESHK, 2014).

Por conta dos inúmeros relatos de efeitos benéficos para a saúde como alta atividade antioxidante, hepatoprotetora e anticâncer (MORALES, 2020), e por ser uma bebida refrescante, a kombucha tem se tornado muito popular em âmbito mundial. Apesar de sua origem se datar há mais de 2 milênios no continente asiático, o chá vem ganhando espaço no mercado, principalmente, devido às mudanças alimentares e aumento da renda da população.

A previsão é de que ocorra um aumento no consumo e produção de cerca de 25,9% nos próximos 5 anos de acordo com o *Expert Market Research* (2021).

Diante desse aumento na produção da bebida, a produção de celulose conseqüentemente aumenta e a procura por métodos de reaproveitamento do biofilme está crescendo. Diversas alternativas para o uso da celulose vêm sendo estudadas, como adsorvente nos processos de biossorção de metais, suplementação de ração animal, eletrônicos ecológicos (HOPFE et al., 2017), indústria alimentícia (BASAK, 2015), aplicações biomédicas (ZHU et al., 2014), indústria têxtil e da moda (ROSA, 2019). No presente trabalho, um levantamento das perspectivas de reaproveitamento da celulose bacteriana de kombucha é feita de acordo com a literatura.

Uma alternativa que vêm se mostrando promissora é a hidrólise enzimática da celulose bacteriana, visto que oligossacarídeos benéficos para a saúde podem ser um dos produtos dessa reação. Dito isso, o objetivo principal do trabalho foi analisar os produtos da hidrólise enzimática de celulose bacteriana de kombucha (SCOBY) fornecida por uma empresa de Itajaí (Santa Catarina). Após a purificação da celulose, análises físico-químicas foram realizadas a fim de caracterizá-la e compará-la com celulose produzida em laboratório. Durante a hidrólise, análises de concentração de celobiose e glicose foram realizadas para avaliar a taxa de conversão da celulose principalmente em celobiose, o qual é um oligossacarídeo com potencial atividade prebiótica.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a conversão da celulose bacteriana de kombucha por hidrólise enzimática para obtenção de oligossacarídeo (celobiose) como uma alternativa de reaproveitamento.

1.1.2 Objetivos Específicos

Para que o objetivo geral seja alcançado, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- Caracterizar propriedades físico-químicas da celulose bacteriana obtida da indústria e comparar com celulose produzida em laboratório;
- Avaliar a hidrólise enzimática em diferentes concentrações de celulose bacteriana como substrato para produção de celobiose como produto principal;
- Analisar o rendimento de conversão da celulose em celobiose e glicose.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DEFINIÇÃO DE KOMBUCHA

A kombucha, segundo a Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), é uma bebida fermentada com sabor adocicado resultante da respiração aeróbia e fermentação anaeróbia do mosto obtido pela infusão ou extrato do chá verde ou preto (*Camellia sinensis*) (BRASIL - MAPA, 2019), com a adição de açúcar e de uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras, chamada de SCOBY, responsável pelo processo fermentativo (BARBOSA et al., 2021; SOARES; DE LIMA; REOLON SCHMIDT, 2021).

Produzida apenas com ingredientes naturais, a kombucha pode variar em relação às características sensoriais, visto que ela depende da combinação dos ingredientes. Sua composição química depende de fatores como o tempo e temperatura de fermentação, concentração de substrato, fonte do inóculo; e sua composição microbiana também pode sofrer alterações de acordo com a localização geográfica, clima e da espécie das bactérias e leveduras (VILLARREAL-SOTO et al., 2018).

Apesar de algumas variações, a produção típica é feita com a fermentação do *Camellia sinensis* por aproximadamente 5 minutos, adicionado de sacarose como fonte de carbono da solução, e resfriado a uma temperatura de aproximadamente 20 °C (JAYABALAN et al., 2014). Em seguida, inocula-se com a cultura simbiótica, sendo uma parte do inóculo composto pela celulose bacteriana ou “SCOBY-mãe”, e a outra parte pela fração líquida proveniente de uma produção anterior (MAY et al., 2019). A fração líquida do inóculo também auxilia na redução do pH inicial, capaz de inibir o crescimento de microrganismos contaminantes (VILLARREAL-SOTO et al., 2018). A cultura é fermentada por 10 a 15 dias, sendo essencial o não prolongamento da fermentação devido a tendência de desenvolvimento de sabor ácido na bebida (LEONARSKI, 2020).

2.1.1 Histórico e futuro da Kombucha

Atualmente, a kombucha vem se tornando muito popular no mundo por ser uma bebida de alta aceitação sensorial, refrescante e levemente carbonatada. Apesar disso, ela já existe há mais de dois milênios e surgiu no nordeste da China como um chá fermentado (JAYABALAN; MARIMUTHU; SWAMINATHAN, 2007). Segundo Jayabalan et al. (2014), a bebida foi

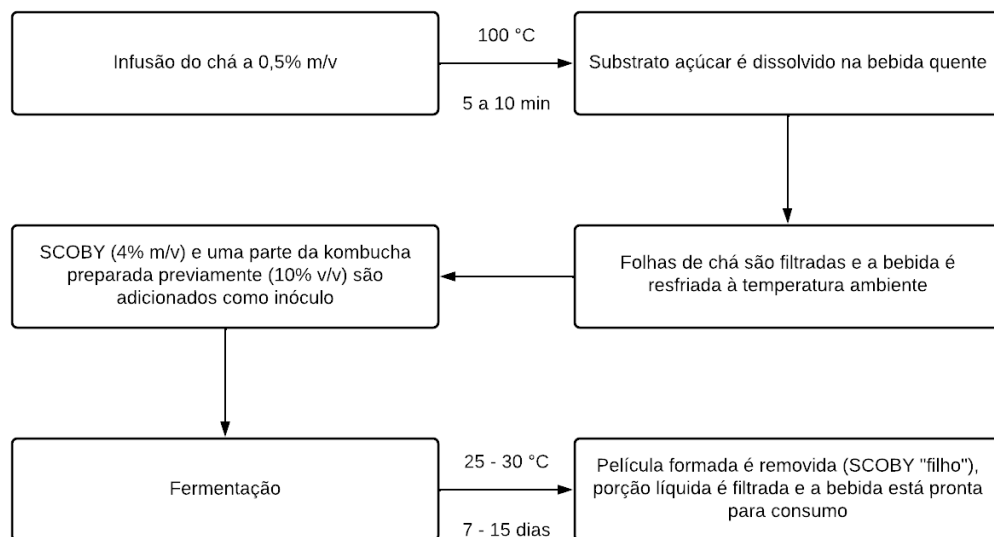
primeiramente valorizada na região chinesa por suas propriedades desintoxicantes e energizantes, sendo descoberta cerca de 220 a.C..

Hoje, devido principalmente à mudança de hábitos alimentares, urbanização e aumento da renda, a bebida é vendida em diversas regiões. Segundo a Expert Market Research de 2021, o mercado global da kombucha atingiu um valor de US\$ 2,15 bilhões em 2020, crescendo a uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 22,5% em 4 anos. Para os próximos 5 anos, a previsão dos cientistas é de um CAGR de 25,9% no período 2021-2026, atingindo um valor de US\$6,83 bilhões em 2026.

2.2 PROCESSO FERMENTATIVO

A fermentação da kombucha é uma combinação de três vias: alcoólica, láctica e acética. Isso se deve ao fato de que no líquido simbiótico coexistem diferentes bactérias e leveduras que geram diferentes produtos, portanto qualquer mudança nas condições de fermentação pode alterar o produto (VILLARREAL-SOTO et al., 2018). A Figura 1 mostra um esquema da elaboração da kombucha e a importância dos parâmetros da fermentação nesse processo.

Figura 1: Processo de elaboração da kombucha.



Fonte: Adaptado de (WATAWANA et al., 2015).

Após a filtração da porção líquida, ainda é possível fazer uma segunda fermentação adicionando-se 50% da kombucha que foi fermentada anteriormente e 50% de suco de fruta.

Essa fermentação deve ser feita em um recipiente fechado para que haja a produção de gás e por um período de 2 a 4 dias (LEONARSKI, 2020).

Segundo Villarreal-Soto (2018), a kombucha é composta por duas fases, sendo elas um biofilme flutuante (SCOBY) e a fase líquida ácida fermentada, que possui como principais componentes o ácido acético, ácido glucônico e o etanol. No início do processo de fermentação, as leveduras atuam na hidrólise da sacarose em glicose e frutose, além da produção de etanol e gás carbônico. Já as bactérias acéticas produzem o ácido acético que provém da frutose e o ácido glucônico e glucurônico proveniente da glicose. Conforme a fermentação vai avançando, a acidez do caldo aumenta devido à produção de ácidos orgânicos, assim como o aumento de bolhas pela produção de gás carbônico (WATAWANA et al., 2015).

Sabe-se que muitos fatores influenciam a fermentação e podem conseqüentemente alterar a qualidade do produto final. Sua composição química depende principalmente do tempo e temperatura de fermentação, concentração de substrato (sacarose), pH, além da sua composição microbiana (VILLARREAL-SOTO et al., 2018). Na Tabela 1 são apresentados os parâmetros utilizados na fermentação de kombucha de acordo com a literatura.

Diversos estudos como o de Goh et al. (2012) e Vohra et al. (2019) comprovaram o fato de que, quando se utiliza a sacarose para a fermentação do chá, a kombucha acaba tendo melhores resultados de atividade antioxidante, antimicrobiana, maior produção de ácido acético e menores valores de pH. Já o pH, o qual tende a baixar nos primeiros dias de fermentação, está ligado diretamente com a segurança contra o crescimento de microrganismos patógenos (JAYABALAN; MARIMUTHU; SWAMINATHAN, 2007). O tempo e a temperatura de fermentação podem variar entre 7 a 60 dias e 20 a 30 °C, respectivamente. Porém, pela Tabela 1, é possível perceber que o tempo mais comum de produção entre os trabalhos avaliados está na média de 15 dias e a temperatura por volta de 25 °C.

Finalmente, um dos fatores que mais influencia a fermentação da kombucha é a sua composição microbiana. Diferentes leveduras e bactérias podem ser encontradas no SCOBY, influenciando a cinética de fermentação, bem como os produtos liberados (MAY et al., 2019; VILLARREAL-SOTO et al., 2019).

Tabela 1 – Parâmetros da fermentação de kombucha preparada com chá verde e chá preto (*Camelia Sinensis*).

Chá	Concentração de chá (g/L)	Sacarose inicial (g/L)	Tempo de fermentação (dias)	Temperatura de fermentação (°C)	Referência
Chá preto	1,5	70	14	22	(MALBAŠA; LONČAR; DJURIC, 2008)
Chá preto	5,4	100	14	20-22	(TEOH; HEARD; COX, 2004)
Chá preto	10	70	15	25	(VILLARREA L-SOTO et al., 2020)
Chá preto	10	70	21	25	(VILLARREA L-SOTO et al., 2019)
Chá preto	8	90	20	30	(TORÁN- PEREG et al., 2021)
Chá preto	10	70	14	25	(RAHMANI et al., 2019)
Chá preto	10	60	14	Ambiente	(OLIVER- ORTEGA et al., 2021)
Chá preto	6	100	10	Ambiente	(BERTSCH; ETTER; FISCHER, 2021)
Chá preto	7,5	40	10	30	(AVCIOGLU; BIRBEN; SEYIS BILKAY, 2021)
Chá preto e verde	8	100	14	28±1	(JAKUBCZYK et al., 2021)
Chá preto	6	80	14	28	(ZOU et al., 2021)
Chá verde e preto	12	100	18	24± 3	(JAYABALAN ; MARIMUTHU ; SWAMINATH AN, 2007)
Chá verde	15	50	15	Ambiente	(URRUTIA et al., 2021)
Chá preto	1	100	7	28	(TU et al., 2019)

Chá preto	10	20	30	Ambiente	(EBRAHIMI PURE et al., 2017)
-----------	----	----	----	----------	------------------------------------

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

2.2.1 Composição microbiana

Diversos estudos mostram que a composição microbiológica do SCOBY pode variar durante as fermentações. Isso porque depende de fatores como a origem, clima, localização geográfica e o meio utilizado para a fermentação (WATAWANA et al., 2015). Apesar disso, sabe-se que as bactérias mais abundantes na cultura simbiótica pertencem aos gêneros *Acetobacter* e *Gluconobacter* (MACEDO et al., 2020), sendo que a responsável pela produção da película de celulose é a *Gluconacetobacter xylinus/ Komagataeibacter xylinus* (SANTOS, 2016). Ainda segundo Santos (2016), os microrganismos que dominam o início da fermentação da kombucha são as bactérias do ácido acético e as leveduras osmofílicas.

De acordo com Zhu et al. (2014), as bactérias lácticas podem chegar em até 35% da composição da cultura. Além disso, observou-se que o *Lactobacillus* prevalece em maior quantidade nas últimas fases da fermentação (MAY et al., 2019). A Tabela 2 mostra as principais bactérias e leveduras presentes na kombucha de acordo com as referências da literatura.

Tabela 2 – Microrganismos presentes na kombucha

Microrganismo	Gênero e espécie	Referência
Bactéria	<i>Gluconacetobacter hansenii</i>	(COSTA et al., 2017)
	<i>Komagataeibacter xylinus</i>	(CHINA et al., 2021)
	<i>Komagataeibacter saccharivorans</i>	(AVCIOGLU; BIRBEN; SEYIS BILKAY, 2021)
	<i>Komagataeibacter hansenii</i> , <i>K. europaeus</i> e <i>K. xylinus</i>	(BARBOSA et al., 2021)
	<i>Komagataeibacter rhaeticus</i>	(GUPTE et al., 2021)
	<i>Gluconobacter oxydans</i>	(HARRISON; CURTIN, 2021)

	<i>Gluconacetobacter europaeus,</i>	(COTON et al., 2017)
	<i>Gluconobacter oxydans, G.</i>	
	<i>saccharivorans e Acetobacter</i>	
	<i>peroxydans</i>	
Levedura	<i>Brettanomyces bruxellensis e</i>	(AVCIOGLU; BIRBEN;
	<i>Brettanomyces anomalus</i>	SEYIS BILKAY, 2021)
	<i>Dekkera bruxellensis, D. anomala,</i>	(COTON et al., 2017)
	<i>Zygosaccharomyces bailii e</i>	
	<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	
	<i>Zygosaccharomyces bailii,</i>	(HARRISON; CURTIN,
	<i>Rhodotorula mucilaginosa e</i>	2021)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	<i>Saccharomycodes ludwigii,</i>	(MALBAŠA; LONČAR;
	<i>Saccharomyces cerevisiae,</i>	DJURIĆ, 2008)
	<i>Saccharomyces bisporus, Torulopsis</i>	
	<i>sp. e Zygosaccharomyces sp</i>	
	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	(HARRISON; CURTIN,
		2021)
	<i>Zygosaccharomyces bailii,</i>	(TEOH; HEARD; COX,
	<i>Schizosaccharomyces pombe,</i>	2004)
	<i>Torulospora delbreuckii, Candida</i>	
	<i>stellata</i>	

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

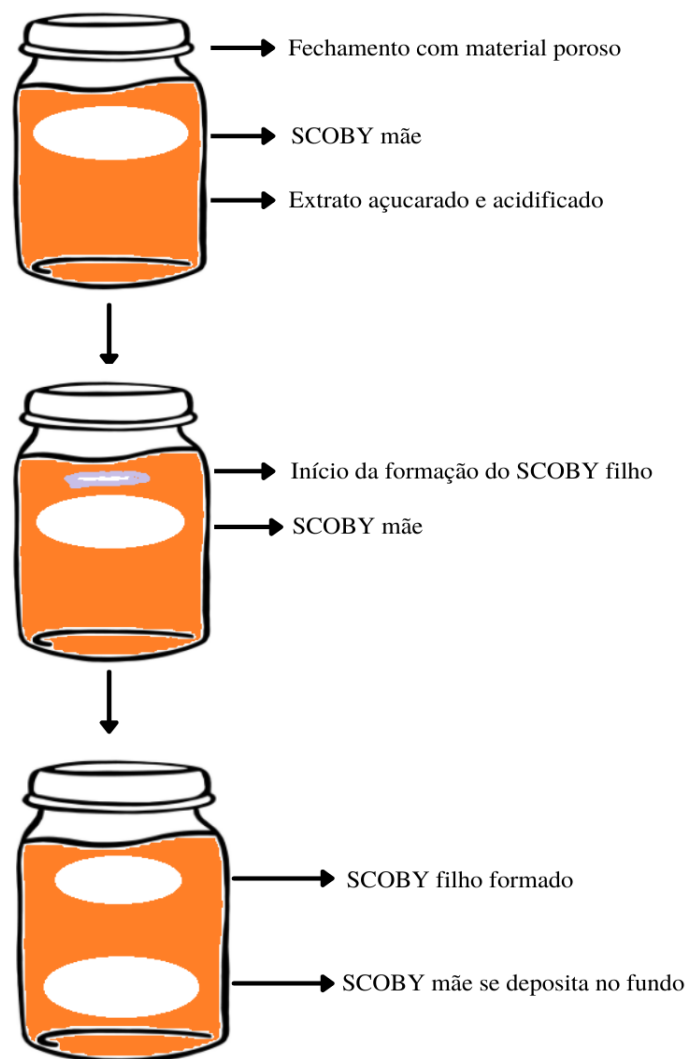
2.3 FORMAÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA

O biofilme formado durante a fermentação de kombucha é constituído de fibras de celulose sintetizadas por bactérias, geralmente descrito como um “tapete” fúngico quando cultivado em condições estáticas e chamado de SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts*) (MACEDO et al., 2020).

Esse filme gelatinoso mantém aderidas em suas fibras a grande maioria das bactérias produtoras de celulose, e por isso é geralmente usado como inóculo para facilitar a produção de um segundo biofilme celulósico espesso na interface ar-líquido (LAAVANYA; SHIRKOLE; BALASUBRAMANIAN, 2021). O biofilme que contém os microrganismos iniciais é chamada

de “SCOBY mãe”, sendo utilizada como inóculo para iniciar a fermentação, e a nova película formada é chamada de “SCOBY filho” (LEONARSKI, 2020). Na Figura 2, é possível visualizar o processo fermentativo utilizando a celulose, no qual o SCOBY mãe proveniente de uma kombucha pré-fermentada à concentração de 2,5-5% (m/v) é utilizada para a fermentação.

Figura 2 - Formação do SCOBY filho a partir de um SCOBY mãe na fermentação da kombucha.



Fonte: Adaptado de Leonarski et al., (2020).

Illana (2007) aponta que o crescimento do consórcio de bactérias e leveduras induz o crescimento de novas membranas mais espessas, assumindo a forma do recipiente em que a

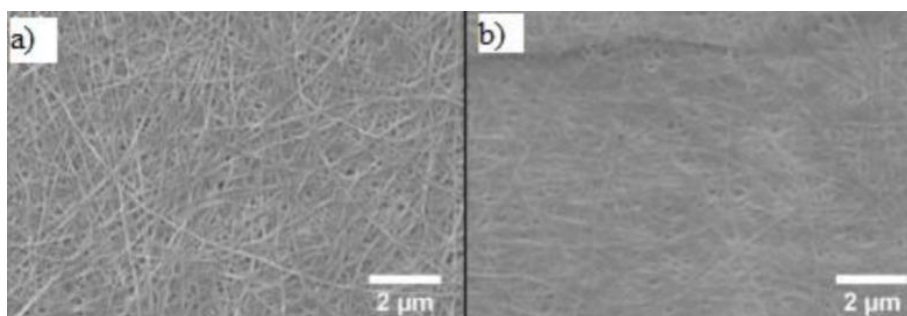
bebida é preparada e aumentando o efeito simbiótico entre os microrganismos. Além disso, segundo Chen e Liu (2000), a contagem das leveduras e células bacterianas aumenta até 14 dias de fermentação tanto nos SCOBY (mãe e filho) quanto no caldo. Reiss (1994) relata que a concentração de bactérias de ácido acético é maior na parte superior da camada de celulose, pois está mais exposta ao oxigênio do que a superfície em contato com o caldo. Essa camada de celulose acaba protegendo também as leveduras da ação do oxigênio, uma vez que essas ficam alojadas na parte inferior do filme, permitindo a realização da anaerobiose.

De acordo com China et al. (2021), a produção de celulose bacteriana tem influência principalmente de dois fatores. O primeiro é a fonte de carbono utilizada no meio, no entanto fontes de carbono puro podem aumentar o custo de produção, tornando o processo insustentável. Já o segundo ponto, está relacionado à capacidade do microrganismo de crescer e produzir a celulose bacteriana nas condições selecionadas, em que como exemplo podemos citar as habilidades das cepas pertencentes ao gênero *Komagataeibacter* presentes em culturas usadas em kombuchas (TEOH; HEARD; COX, 2004).

Devido à espessura física do biofilme, a camada polimérica pode inibir a difusão de células invasoras, que pelo acesso aos açúcares livres presentes na solução da bebida podem levar à produção de compostos indesejados, como bactérias tóxicas à saúde (MAY et al., 2019). Além disso, a celulose pode fornecer o armazenamento de recursos, atuando como reservatório de carbono (FLEMMING; WINGENDER, 2010), polissacarídeos (LIMOLI; JONES; WOZNIAK, 2015) e outras moléculas benéficas para o crescimento das bactérias associadas à kombucha.

Segundo Costa (2017), a celulose possui propriedades únicas como alta cristalinidade, resistência à tração e serinsolúvel, tendo um alto grau de polimerização, e, se comparado com as fibras de celulose originadas de plantas, é considerada 100 vezes mais fina. Uma imagem microscópica das fibras de celulose bacteriana pode ser vista na Figura 3.

Figura 3 - Imagem microscópica das fibras de celulose bacteriana. A figura "a" indica a parte inferior que está em contato com o líquido, e a figura "b" indica a parte superior em contato com o ar.



Fonte: Adaptado de (LEONARSKI et al., 2021a).

2.3.1 Composição bioquímica da celulose

A composição bioquímica do biofilme de celulose bacteriana de kombucha foi estudada por Ahmed e Dirar (2005) para avaliar seu valor nutritivo e suas possíveis aplicações. O estudo revelou que a celulose do chá possui na sua composição proteína bruta, fibra, lipídio bruto, ácido fólico e fibras (representada pela própria celulose). Moléculas como potássio, fósforo, cálcio e magnésio também foram encontradas em estudos realizados por Murugesan (2005) e colaboradores.

A composição bioquímica do biofilme também foi analisada por Jayabalan et al., (2010), e traços de sódio, ferro, manganês, zinco e cobre foram encontrados. Além disso, os autores verificaram que a celulose era rica em aminoácidos como lisina, proteína e lipídio na forma bruta, porém em porcentagens diferentes dos outros estudos, como por exemplo o aminoácido lisina estava presente em alta concentração quando comparado a outros autores. Isso ocorre devido à variação de fontes e regiões de origem, que podem revelar a variação na composição de cada componente (AHMED; DIRAR, 2005).

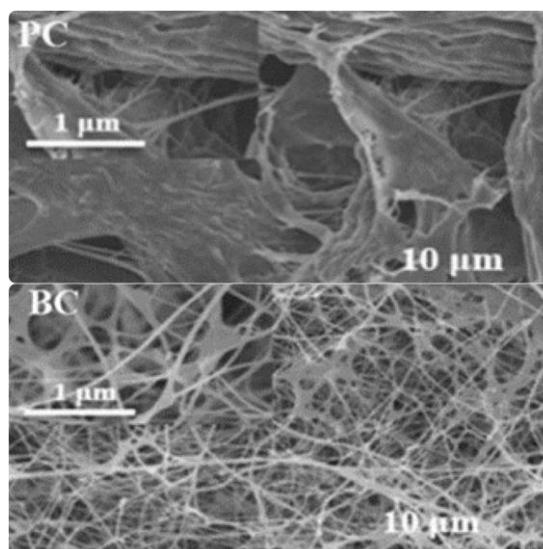
2.3.2 Estrutura molecular

A celulose bacteriana é muito comparada com a celulose vegetal por possuírem a mesma estrutura química, variando nas propriedades físicas e químicas (LAAVANYA; SHIRKOLE; BALASUBRAMANIAN, 2021). A celulose vegetal, por mais que seja usada para diversas aplicações industriais, possui a desvantagem de estar associada a compostos como lignina, hemicelulose e pectina, necessitando de tratamentos altamente poluentes para sua utilização. A celulose bacteriana, por ser produzida de uma maneira diferente e não possuir esses compostos em sua estrutura, possui um potencial econômico muito interessante, visto que não possui uma rede de fibras tão rígida (KESHK, 2014).

A estrutura é composta por moléculas de celulose que se combinam e formam uma rede de microfibras interligadas por ligações de hidrogênio (MOHITE; PATIL, 2014). Cada célula unitária da celulose é formada por duas celobioses, um dímero formado pela ligação de duas unidades anidras de D-glicose por β -1-4 unidades de ligação com grau de polimerização variado. O grau de cristalinidade da celulose bacteriana está relacionado à fração das moléculas ordenadas (região cristalina) em relação à menos ordenada (regiões amorfas) (REINIATI, 2017). A região amorfa é a parte mais vulnerável da molécula por ser mais flexível, dando maior abertura para o acesso das celulases, enzimas hidrolíticas que provocam a quebra da celulose. Já a região cristalina é altamente ordenada, sendo mais resistente à tração e ao ataque das enzimas (ALVES, 2021).

Como citado anteriormente, a celulose bacteriana é mais cristalina quando comparada à vegetal, por conta da estrutura tridimensional que constitui um sistema de nanofibras orientadas uniaxialmente, que não ocorre na celulose vegetal. A estrutura de fibras de celulose vegetal e bacteriana estão mostradas na figura 4. A cristalinidade e alta resistência mecânica podem ser justificadas pelas ligações de hidrogênio que mantêm as cadeias de celulose unidas e favorecem uma alta retenção de água (CZAJA et al., 2006). Por esses e tantos outros motivos, alternativas para o uso da celulose bacteriana vêm sendo estudadas.

Figura 4 - Estrutura das fibras de celulose obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura, onde "PC" corresponde à celulose vegetal e "BC" à celulose bacteriana.



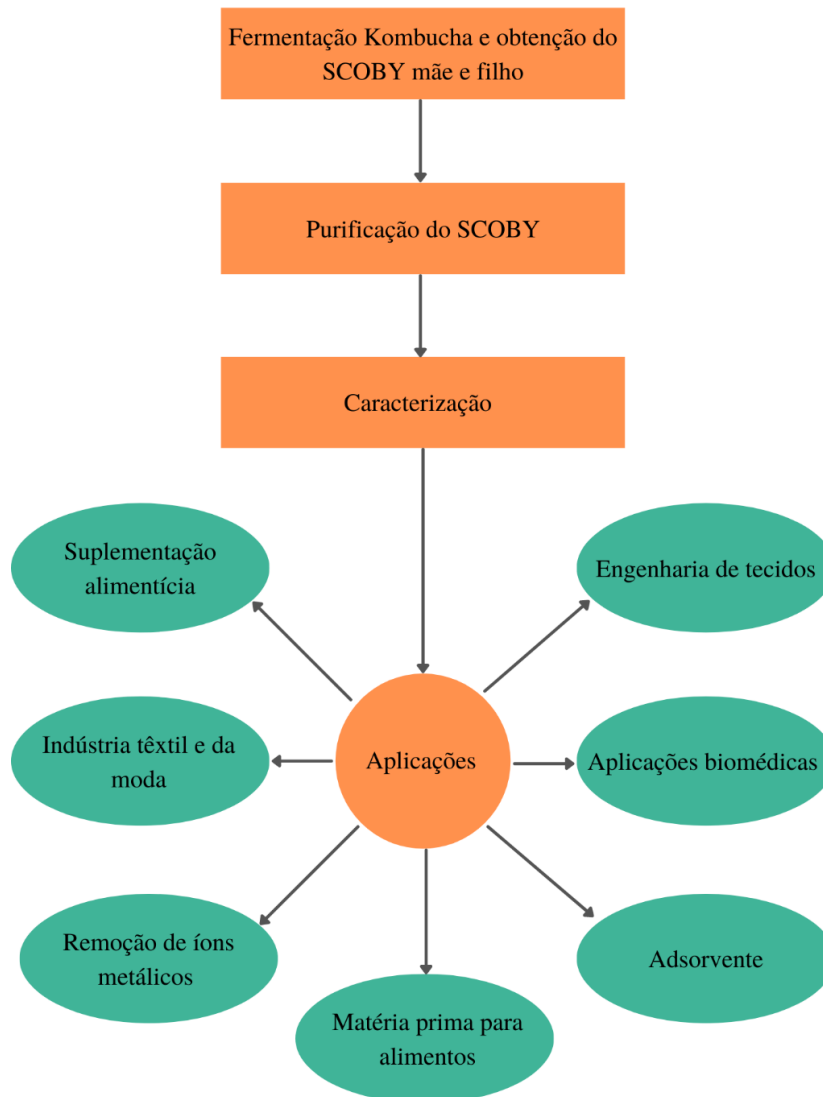
Fonte: Ul-Islam et al., (2019).

2.3.3 Aplicações da celulose bacteriana

A celulose bacteriana está passando por uma transição tecnológica, em que antes era considerado um resíduo sem valor agregado e agora é uma fonte promissora no desenvolvimento de novos materiais.

Pesquisas e experimentos de pequena escala estão sendo realizados para validar a eficiência do uso da celulose bacteriana, após purificação e caracterização do biofilme (LAAVANYA; SHIRKOLE; BALASUBRAMANIAN, 2021). Alguns exemplos de aplicações estão mostrados na Figura 4, como reutilização em cosméticos, indústria têxtil e alimentícia. Além disso, devido aos danos causados ao meio ambiente por processos industriais e geração de resíduos, há um interesse por biotecnologias como alternativa aos processos tradicionais (SOARES; DE LIMA; REOLON SCHMIDT, 2021).

Figura 5 - Diferentes aplicações da celulose bacteriana produzidas em kombucha.



Fonte: Adaptado de (LAAVANYA; SHIRKOLE; BALASUBRAMANIAN, 2021).

2.3.3.1 Adsorvente e eletrônicos ecológicos

A celulose bacteriana pode ser utilizada no processo de bioadsorção de metais pesados em águas residuais. A relação da função adsorvente com a área alimentícia consiste no fato do biofilme ser frequentemente utilizado para adsorver os metais presentes em bebidas embaladas, produzindo assim uma bebida segura ao consumo humano (LAAVANYA; SHIRKOLE; BALASUBRAMANIAN, 2021). Estudos realizados por Izah et al. (2017) relataram a ocorrência de quantidades pequenas de íons metálicos devido à lixiviação de latas, podendo ser justificada também pela utilização de água fluvial durante a produção da bebida.

Pelo fato da celulose bacteriana ser porosa e possuir características adsorptivas, ela também pode ser utilizada como um aditivo condutor de corrente elétrica. Segundo Kalaiappan et al., (2020), o consórcio microbiano presente na celulose pode degradar os elementos de terras raras (REE), sendo usado como agente de lixiviação, produzindo ácidos e outros metabólitos de uma maneira mais ecológica que a tradicional.

2.3.3.2 *Indústria alimentícia*

Na indústria alimentícia, o biofilme celulósico pode ser utilizado para fins comestíveis e não comestíveis. Murugesan (2005) e colaboradores analisaram a utilização da celulose bacteriana como suplementação na alimentação de frangos de corte, adicionado à farinha de frango em diferentes concentrações. Após algum tempo, observou-se que a adição da celulose na ração aumentou a frequência de alimentação e ingestão de água pelos frangos, aumentando assim o peso e eficiência. Isso se deve pelo biofilme ser rico em nutrientes, fornecendo energia aos frangos sem apresentar taxa de mortalidade, podendo-se concluir então sua eficiência como suplemento alimentar devido à taxa de absorção da celulose (BASAK, 2015).

Além disso, a celulose bacteriana pode ser utilizada como material para embalagem de alimentos, por ser um composto biodegradável e substituto do plástico. Por mais que a celulose possa manter a qualidade dos alimentos embalados respeitando o *shelf life*, a maior dificuldade enfrentada é o controle da umidade dos alimentos, sendo uma das limitações para a continuidade desse estudo, visto que o biofilme possui uma alta retenção de água (LAAVANYA; SHIRKOLE; BALASUBRAMANIAN, 2021). Apesar disso, a propriedade antioxidante do biofilme é analisada nos estudos para embalagens e, portanto, é um potencial material para a fabricação de embalagens em contato com alimentos.

2.3.3.3 *Desenvolvimento de biomateriais e indústria da moda*

O material resultante da fermentação da kombucha tem sido usada na indústria da moda para produzir couro vegano. O couro tem sido utilizado na produção, tratamento e fabricação de roupas, sapatos, joias e bolsas, porém sua produção em larga escala ainda é limitada (SOARES; DE LIMA; REOLON SCHMIDT, 2021). A limitação é ocasionada pelo aroma adocicado, que remete à produção de cerveja artesanal, e alta absorção de água, fazendo com que esses desafios inviabilizam a produção industrial do couro vegano (ROSA, 2019).

O principal objetivo dos designers da indústria têxtil é experimentar o uso da celulose bacteriana na substituição de tecidos não biodegradáveis, como poliésteres e polipropileno, e assim produzir roupas ecológicas. Vale destacar que, assim como o couro animal, o couro vegano também precisa ser revestido. Portanto, a celulose bacteriana tende a ser revestida com plastificantes e utilizada na fabricação de vestuários para o desenvolvimento de roupas sustentáveis (LAAVANYA; SHIRKOLE; BALASUBRAMANIAN, 2021).

Outro ponto interessante para avaliar é a influência da temperatura na fabricação de roupas com a celulose bacteriana oriunda da fermentação da kombucha. O SCOBY é sensível às temperaturas do processo de secagem utilizado para a produção têxtil, e baixas temperaturas tornam o tecido quebradiço. Também vale destacar a intenção de compra de roupas sustentáveis, em que a consciência social é importante para o crescimento do setor (SOARES; DE LIMA; REOLON SCHMIDT, 2021).

2.3.3.4 Outras aplicações

Além de estudos da aplicação da celulose bacteriana estarem sendo feitos em maior quantidade nas áreas da indústria alimentícia, têxtil e eletrônica, diversas outras pesquisas têm sido realizadas para verificar a viabilidade do uso do biofilme em diferentes setores. Um deles é em aplicações biomédicas, onde a estabilidade mecânica da celulose da kombucha é um dos motivos para analisar sua participação na preparação de condutos nervosos devido à sua natureza biocompatível (ZHU et al., 2014). Com esse estudo, foi possível observar a boa biocompatibilidade e quantidade insignificante de efeitos tóxicos e histológicos no biofilme.

Outras aplicabilidades que estão sendo investigadas é no design de arquitetura de interiores, em que a celulose foi utilizada para fazer protótipos de lâmpadas devido a sua capacidade de resistência ao calor, substituindo lâmpadas de plástico (FAIDI, 2017).

Segundo estudos realizados por Shanmugavel (2020) e colaboradores, nanopartículas de prata foram preparadas com extrato do SCOBY da kombucha e testadas em diferentes células de câncer de mama humano, confirmando uma alta atividade antibacteriana do SCOBY por ser eficaz no tratamento cancerígeno.

Ainda na área médica, o biofilme foi testado como curativo para feridas por El-Wakil et al. (2019). Logo após o SCOBY ser cultivado em extrato de chá, ele é cultivado em extrato de café para estudar sua preservação e liberação de materiais que possam contribuir para a cicatrização de feridas. Com isso, confirma-se ainda mais o poder antibacteriano do biofilme e a absorção dos exsudados da ferida.

Dito isso, a celulose bacteriana é vista como um material de alto potencial ecológico por ser sustentável e biodegradável. As pesquisas realizadas até o momento estão voltadas para estudos piloto em baixa escala, com experimentos preliminares de sua utilização como alternativa sustentável em diversas aplicações. Porém, é necessário a realização de mais pesquisas para compreender sua capacidade ampliada, sendo considerada um desafio entre os pesquisadores desvendar as aplicações do SCOBY.

Uma alternativa promissora que pode ser destacada é a hidrólise da celulose bacteriana para a obtenção de oligossacarídeos. Poucos trabalhos são encontrados na literatura sobre a hidrólise de celulose (vegetal) para produção de oligossacarídeos de celulose (ÁVILA et al., 2021) e nenhum trabalho até o momento foi encontrado sobre a hidrólise de celulose bacteriana originada da kombucha com esse foco. O principal tipo de hidrólise que vêm sendo estudado por pesquisadores é a hidrólise enzimática, devido a maior seletividade à produção de oligossacarídeos, sendo este tipo de hidrólise o foco do presente trabalho.

2.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A hidrólise feita por enzimas é ecologicamente correta por requerer uma quantidade menor de água quando comparada com os métodos ácidos tradicionais, não gerar resíduos químicos, além de auxiliar na recuperação de açúcares solubilizados (RANA; FROLLINI; THAKUR, 2021). Além disso, as condições de reação são relativamente mais brandas e geram menos subprodutos.

Segundo Zhang e colaboradores (2004), alguns fatores podem influenciar diretamente na eficiência e velocidade da hidrólise. Entre eles, estão as propriedades do substrato, grau de polimerização, porosidade, teor de umidade, constituintes não hidrolisáveis e índice de cristalinidade. Quanto maior o índice de cristalinidade, menor é a taxa de hidrólise pela presença de fortes ligações de hidrogênio, fazendo com que em celuloses com porções amorfas e cristalinas, a porção amorfa hidrolise primeiro (KASHCHEYEVA et al., 2019). Já em relação à superfície do substrato, quanto maior a porosidade e área de superfície, melhor é a adsorção da enzima celulase, ocasionando em uma destruição enzimática mais eficaz. Além disso, parâmetros relacionados à enzima podem afetar o rendimento da reação, como carga, sinergia, temperatura, pH e agitação (ÁVILA et al., 2021).

Kashcheyeva et al. (2019) estudaram o efeito das propriedades da celulose bacteriana no desempenho da hidrólise comparando a matéria prima em três estados diferentes: celulose seca; seca e purificada; úmida e purificada. Depois de acompanhar a reação por 72 h, chegou-se à conclusão de que as amostras purificadas possuem um rendimento maior que as não purificadas. Além disso, as amostras secas demoraram mais para atingir a taxa de hidrólise por terem uma estrutura porosa estendida, não impactando na eficiência, mas sim no tempo de reação.

Outros estudos vêm sendo feitos em relação à hidrólise enzimática de celulosas bacterianas, porém ainda são escassos em relação ao volume de estudos realizados sobre a celulose vegetal. O Quadro 1 resume alguns trabalhos realizados e diferentes aplicações.

Quadro 1 - Principais estudos realizados sobre a hidrólise enzimática de celulose bacteriana.

Enzima	Objetivo	Resultados	Referência
Endo-1,4- β -glucanases (EGs) de <i>Thermobifida halotolerans</i> e celulase de <i>Trichoderma reesei</i>	Obter nanocristais de celulose bacteriana a partir de hidrólise enzimática para aplicação na indústria de embalagens de alimentos com barreira de oxigênio.	A celulose bacteriana foi hidrolisada por dois diferentes tratamentos enzimáticos (endo-1,4- β -glucanases (EGs) e com adição de celulase. O tratamento com adição de celulases produziu maior quantidade de nanocristais, e ambos tratamentos permitiram um aumento no desempenho de barreira de oxigênio quando carregados em biopolímero de pululano, concluindo assim o potencial para gerar revestimentos de alta barreira ao oxigênio nas embalagens alimentícias.	(ROVERA et al., 2020)
Celobiohidrolase do fungo <i>Scytalidium Candidum 3C</i>	Observar as mudanças estruturais que ocorrem na celulose bacteriana após hidrólise por celobiohidrolase de <i>Scytalidium Candidum 3C</i> , além de observar efeitos cicatrizantes do substrato.	As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram a estrutura da celulose bacteriana “afrouxando” após hidrólise enzimática. Além disso, experimentos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> revelaram efeito positivo no tratamento de queimaduras de terceiro grau em ratos, concluindo que o estudo pode servir de base para desenvolvimento de curativos biodegradáveis.	(IVANOVA et al., 2020)

Celluclast 1,5 L - Novozymes	Produzir celulose bacteriana utilizando glicerol como fonte de carbono e isolar nanocristais por meio de hidrólise enzimática.	O método enzimático possuiu melhor desempenho utilizando 2 g de hidrogel de celulose a 40 µL de enzima (endoglucanase) e 1 mL de tampão citrato. Foi observado uma diminuição do rendimento de nanocristais com o aumento da hidrólise.	(BRANDES et al., 2020)
Celluclast 1,5 L	Comparar o efeito de hemiceluloses na hidrólise enzimática de celulose bacteriana utilizando celulose bacteriana livre e na presença de hemiceluloses.	O material biomimético consistindo de celulose bacteriana e hemicelulose à base de madeira mostrou-se mais suscetível à hidrólise enzimática do que a celulose bacteriana livre, podendo estar relacionada à estrutura em nanoescala do substrato.	(PENTTILÄ et al., 2018)
Celulase de <i>Trichoderma reesei</i> (ATCC26921) Sigma Aldrich	Produzir nanocristais de celulose bacteriana por hidrólise enzimática e analisar morfologicamente a celulose após reação, assim como avaliar a cinética e rendimento da hidrólise e seu potencial como alternativa para a hidrólise química.	Conforme o rendimento da reação aumentava, a turbidez da mistura enzima e celulose diminuía. Os valores de rendimento após 74 h de hidrólise foram maiores para as misturas ricas em substrato do que para as misturas ricas em enzimas, porém a maior produção de nanocristais ocorreu em maiores concentrações de enzima. Além disso, a análise MEV mostrou uma mudança na rede de fibrilas para um formato de agulha à medida que as razões de enzima/celulose aumentavam.	(ROVERA et al., 2018)
Celulase de <i>Trichoderma reesei</i> (ATCC26921) Sigma Aldrich	Observar a atividade da proteína ceratoplatanina tipo expansina (CP) como pré-tratamento para hidrólise enzimática de celulose bacteriana.	Para maiores concentrações de enzimas, a hidrólise não é dependente da proteína CP, e para concentrações maiores de celulose bacteriana, a hidrólise é dificultada pela presença da proteína, confirmado pelo menor teor de celobiose e glicose produzidos na presença da proteína. Além disso, foi observado que na presença de CP, o tamanho da partícula de celulose aumenta, sugerindo que a presença da proteína não foi positiva para a	(ROVERA et al., 2021)

		hidrólise de celulose bacteriana.	
--	--	-----------------------------------	--

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

2.4.1.1 Mecanismo de ação das enzimas

A transformação da celulose em monossacarídeos por meio da hidrólise enzimática é realizada pelo grupo de enzimas celulasas (RIBEIRO et al., 2019). As celulasas catalisam a quebra da celulose em ramos menores do polímero, como a celobiose e a glicose. Essas enzimas pertencem à família das glicosil hidrolases (GH), que apresentam capacidade de quebrar ligações glicosídicas β -1,4 em cadeias de celulose (ÁVILA et al., 2021). Para a realização da hidrólise completa, são necessárias três enzimas que atuam em atividades diferentes de forma sinérgica e que estão apresentadas no Quadro 2.

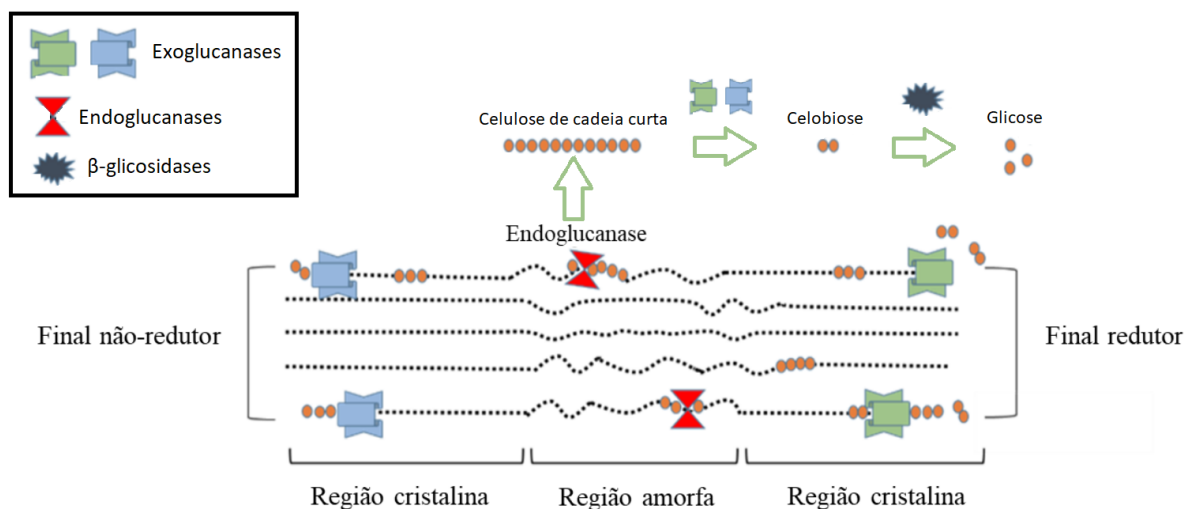
Quadro 2 - Enzimas atuantes na hidrólise da celulose.

Nome da enzima	Nº EC	Atuação	Referências
Endoglucanases (EGs)	EC 3.2.1.4	Hidrolisam ligações internas da cadeia de celulose em posições aleatórias atuando principalmente em regiões amorfas	(RIBEIRO et al., 2019)
Celobiohidrolases ou exoglucanases (CBHI e IIs)	EC 3.2.1.91 e EC 3.2.1.176	Degradam as regiões cristalinas da celulose pela clivagem da celobiose nas extremidades (reduzoras ou não) das cadeias celulósicas	(OGEDA, 2011)
β -glicosidases (BGs)	EC 3.2.1.21	Hidrolisam ligações glicosídicas da celobiose em glicose	(ÁVILA et al., 2021)

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

O sinergismo entre as enzimas exo e endo é explicado pelo fato das endoglucanases fornecerem mais moléculas no final da cadeia, fazendo com que as celobiohidrolases possam degradá-las (OGEDA, 2011). O esquema do mecanismo de ação catalítico do complexo enzimático é representado pela Figura 5, onde as exoglucanases atuam na região cristalina com finais redutores ou não mediante a clivagem de dímeros de celobiose; a endoglucanase atua em regiões internas aleatórias e majoritariamente amorfas; e a β -glicosidase atua na conversão da celobiose para glicose, minimizando a ação inibitória que a celobiose pode exercer sobre as atividades endo e exo (THORESEN et al., 2021).

Figura 6 - Mecanismo de ação catalítica da celulase sobre a celulose com produção de celobiose e glicose.



Fonte: Adaptado de (ÁVILA et al., 2021).

A hidrólise enzimática da celulose engloba três etapas, a de adsorção da enzima, a de quebra da celulose pela ação sinérgica das celulases e a dessorção enzimática no sobrenadante (BANSAL et al., 2009). Segundo estudos realizados por Bommarius e colegas (2008), a acessibilidade de adsorção da celulase sobre a celulose impacta na taxa de hidrólise, sendo diretamente proporcional, ou seja, quanto maior a área, maior a taxa de hidrólise. Para que a área superficial acessível à adsorção aumente, o substrato é normalmente pré tratado com tratamento alcalino.

A etapa inicial de adsorção é rápida em comparação com a hidrólise, no entanto sua velocidade diminui nas etapas de quebra e dessorção. Essa desaceleração pode ser explicada pelos influenciadores da eficiência e velocidade da hidrólise citadas anteriormente por Zhang et al. (2004) na seção 2.4.1.

2.4.1.2 Produtos da hidrólise enzimática

Como dito anteriormente, as celulases quebram a celulose bacteriana em porções menores do polímero, além de gerar celo-oligossacarídeos (COS) e o monossacarídeo glicose. Os celo-oligossacarídeos são oligômeros de β -1,4 ligados por unidades de glicose. Podem ser definidos como intermediários do processo de hidrólise da celulose em glicose, e são

diferenciados de acordo com seu número de monômeros de glicose: celobiose (2 monômeros), celotriose (3), celotetraose (4), celopentose (5) e celohexose (6) (BARBOSA et al., 2020).

A celobiose, principal produto a ser analisado na hidrólise enzimática deste trabalho, pode ser utilizada em produtos cárneos e embutidos, na área de bebidas, comprimidos (comprimidos) e tecnologias de encapsulamento (HETZLER; STEINBÜCHELA, 2013). De acordo com a literatura, esse composto é geralmente utilizado como substrato para processos biotecnológicos (GUO et al., 2011; HU et al., 2016), entretanto, atualmente alguns estudos *in vitro* e em animais têm relatado possíveis propriedades prebióticas nesses compostos (HEINRITZ et al., 2018; NAKAMURA; OKU; ICHINOSE, 2004; PASSLACK et al., 2021; PASSLACK; VAHJEN; ZENTEK, 2020) semelhantes a frutooligossacarídeos, galactooligossacarídeos e inulina (GIBSON et al., 2017).

Estudos vêm sendo feitos em relação às suas atividades prebióticas, estimulando o crescimento *in vitro* de *Lactobacilus* e *Bifidobactérias* (ÁVILA et al., 2021). Eles são capazes de resistir às etapas iniciais de digestão no estômago, chegando ao intestino grosso e servindo de substrato para microrganismos benéficos da microbiota intestinal, promovendo assim a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) (MANO et al., 2018).

Segundo Chu e colaboradores (2014), a β – glicosidase impede o acúmulo dos COS, hidrolisando a ligação glicosídica dentro da celobiose e produzindo então glicose. Portanto, para que a produção de COS seja viável, é necessário realizar a eliminação de algumas enzimas do coquetel enzimático, além de inserir enzimas específicas para estimular a produção de celo-oligossacarídeos. Entre elas, estão a celobiohidrolase da família 6 e 7 (CBH7 e CBH6), assim como endoglucanases da família 5 e 7 (EG5 e EG7) (KARNAOURI et al., 2018).

Quando o coquetel enzimático possui enzimas com a presença da β -glicosidase, estudos feitos por Karnaouri (2018) e Barbosa (2020) comprovam que os produtos gerados pela hidrólise enzimática da celulose serão compostos majoritariamente por glicose (ÁVILA et al., 2021). Neste caso, o subproduto glicose poderá ser utilizado para a produção de etanol, ou ainda reaproveitado para o crescimento de bactérias ácidas que produzem celulose bacteriana (ROVERA et al., 2018).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo principal analisar os principais produtos gerados pela hidrólise enzimática da celulose bacteriana de kombucha utilizando o coquetel enzimático Celluclast® e analisar a produção de celo-oligossacarídeos, principalmente a celobiose, para futura utilização como composto prebiótico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CELULOSE BACTERIANA

A celulose bacteriana utilizada neste estudo foi fornecida pela empresa Pod Kombucha, localizado na cidade de Itajaí, Santa Catarina. O biofilme foi retirado de uma

produção da bebida em um reator com capacidade de 1000 L. A celulose foi mantida refrigerada até sua utilização. A Figura 6 mostra a retirada de 2,615 kg de celulose úmida da produção de kombucha para posterior utilização.

Figura 7 - Corte do biofilme de celulose de uma produção da bebida pela Pod Kombucha.



Fonte: elaborado pela autora (2022).

3.2 TRATAMENTO DA CELULOSE

Todo o estudo foi realizado no Laboratório de Engenharia Biológica (LiEB) localizado no departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, incluindo equipamentos como balanças, estufas, banho maria digital, phmetro, shaker, centrífuga, agitador magnético e vidrarias para auxílio nas análises. Para a análise HPLC, as amostras foram enviadas para a Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Os métodos foram baseados nos trabalhos de Leonarski et al. (2021b) e Alves (2021).

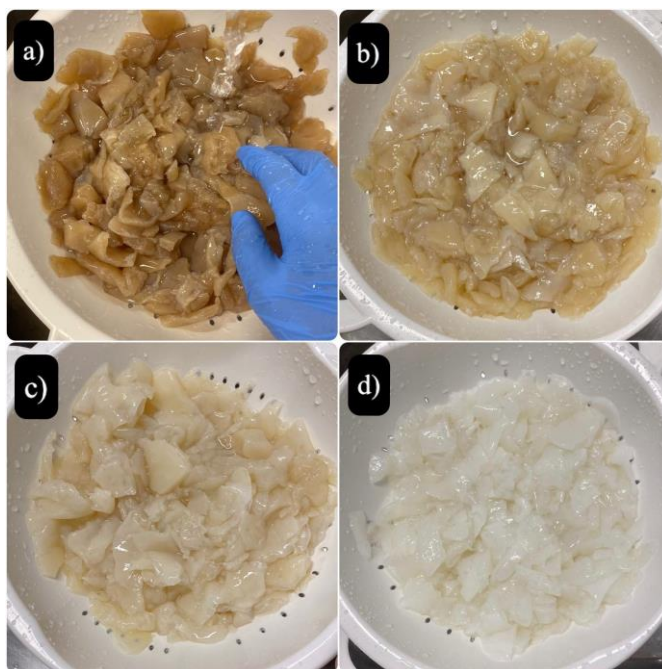
3.2.1 Purificação da celulose bacteriana

Como dito anteriormente, segundo estudos realizados por Kashcheyeva et al. (2019), as amostras de celulose bacteriana purificadas possuem um rendimento maior na taxa de hidrólise. Portanto, para uma melhor purificação, primeiro cortou-se o biofilme em porções

menores. Depois, os fragmentos foram lavados em água corrente para uma primeira retirada das leveduras e impurezas fixadas nas camadas e poros da celulose.

Em seguida, a celulose foi purificada com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L em estufa a 50 °C. Após 24 h, a celulose foi lavada e colocada em nova solução básica até que o biofilme ficasse com uma cor próxima do branco. Após a coloração branca ser atingida, trocou-se a solução básica por água destilada, e a celulose foi mantida em estufa (50 °C) até que o pH ficasse neutro. A Figura 7 mostra a evolução da purificação da celulose entre as trocas de solução de NaOH após 9 dias.

Figura 8 - a) Celulose após 3 dias em solução de NaOH; b) após 5 dias; c) após 6 dias; d) após 9 dias.



Fonte: elaborado pela autora (2022).

3.2.2 Secagem da celulose

Para posterior reação de hidrólise enzimática, a celulose bacteriana foi seca em estufa a 50 °C com circulação de ar durante 72 h. Após secagem, as membranas purificadas foram pesadas para obtenção da massa seca. A Figura 8 mostra a aparência do biofilme durante a secagem.

Figura 9 - a) Celulose purificada e úmida; b) celulose após 24 h na estufa; c) celulose seca.



Fonte: elaborado pela autora (2022).

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA CELULOSE

3.3.1 Propriedades físico-químicas

A espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier fornece as propriedades físico-químicas da celulose seca e foi registrada em um Agilent Cary 600 Séries (Santa Clara, Estados Unidos). Foi utilizada a faixa de comprimento de onda de 4000 a 500 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e acúmulo de 16 varreduras no modo de refletância total atenuada (ATR).

3.3.2 Cristalinidade

A difratometria de raios X foi usada para determinar a cristalinidade do material, a qual foi medida com o equipamento marca Rigaku DRX MiniFlex600 (Tóquio, Japão), utilizando radiação $CuK\alpha$, a uma voltagem de 40 kV e emissão de filamento de 1,5 mA. As amostras foram escaneadas na faixa de 5° a 50° 2θ com uma velocidade de varredura de $0,05^\circ$ /passo. Os padrões de difração foram calculados com o software OriginLab Pro, assim como a cristalinidade foi calculada utilizando a equação (3) de acordo com Mohammadkazemi et al. (2015):

$$\text{Cristalinidade (\%)} = \left(\frac{S_c}{S_t} \right) \times 100 \quad (3)$$

Onde S_c é a soma da área dos picos e S_t é a soma da área total.

3.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Para a hidrólise enzimática, a enzima utilizada foi o coquetel Celluclast® 1.5 L, celulase de *Trichoderma reesei* que catalisa a quebra da celulose em glicose, celobiose e polímeros de celulose. A enzima foi diluída em 50x no tampão acetato de sódio 0,1 mol/L, pH 5 medido em pHmetro, e utilizada na concentração de 6% em relação ao teor de celulose.

A reação foi feita em frascos Schott® de 100 mL com tampa, com volume reacional de 50 mL e em três concentrações de celulose bacteriana para posterior comparação, 2%, 3% e 4% (p/v). A Tabela 3 contém as informações de quantidades de substrato, enzima e tampão para as diferentes concentrações.

Tabela 3 - Quantidades reacionais do substrato, enzima e tampão.

Substrato (%)	Celulose (g)	V _T reação (mL)	*Enzima (mL)	Tampão (mL)
2	1	50	3	47
3	1,5	50	4,5	45,5
4	2	50	6	44

V_T = volume total de reação; * Volume correspondente a enzima diluída 50X.

Fonte: elaborado pela autora (2022).

A reação ocorreu em incubadora shaker a 150 rpm e 50 °C, e as amostras foram recolhidas em triplicata nos tempos 24 h, 48 h e 72 h, totalizando em 27 amostras. Para cada amostra, foi realizada a inativação enzimática em banho maria a 90 °C por 10 min. Após a inativação, as amostras foram centrifugadas (HT-MCD2000) por 5 min a 10.000 rpm e o sobrenadante foi filtrado (0,2 µm) e transferido para novos eppendorfs. As amostras filtradas foram congeladas para posterior quantificação de açúcares em HPLC. O cálculo dos rendimentos de glicose e celobiose foi realizado com as equações (1) e (2).

$$Y_{glicose} = 100 * \left(\frac{C_{gli} * 0,9 * V}{T_{cel}} \right) \quad (1)$$

$$Y_{celobiose} = 100 * \left(\frac{C_{celo} * 0,95 * V}{T_{cel}} \right) \quad (2)$$

Sendo:

C_{gli} : concentração de glicose medida na amostra (g/L);

C_{celo} : concentração de celobiose medida na amostra (g/L);

V: volume total da reação (L);

T_{cel} : teor de celulose no substrato (g). Considerou-se que o substrato é 100% celulose.

3.4.1 Secagem após hidrólise

O conteúdo sólido restante no final da hidrólise foi colocado em placas de petri e papel alumínio e secado em estufa a 50 °C por 72 h. Após secagem da celulose restante, essa foi pesada para confirmar os dados de rendimento de conversão em celobiose e glicose obtidos na hidrólise.

3.4.2 Concentração dos sacarídeos

As concentrações dos açúcares celobiose e glicose foram estimadas por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Accela TM, Thermo Scientific, Waltham, MA) usando um detector de índice de refração (IR) com uma coluna HPX 87-H (Bio-Rad ®) a 45 °C, com um fluxo de 0,6 mL/min e uma solução de ácido sulfúrico 0,005 M (pH 2,6) como fase móvel (eluente). As concentrações foram determinadas a partir de padrões analíticos para a construção das curvas de calibração e posterior cálculo das concentrações nas amostras.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o software Past. Para determinar as diferenças significativas das análises, o Teste de Tukey foi realizado a um nível de probabilidade inferior a 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente, são apresentadas e discutidas as análises de caracterização e propriedades físico-químicas da celulose, e, em seguida, as análises da hidrólise enzimática.

4.1 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA CELULOSE

4.1.1 Espectroscopia FTIR de amostras de celulose bacteriana

As propriedades da celulose bacteriana foram caracterizadas por FTIR e DRX, mostradas na Figura 9. Os espectros de infravermelho da Figura 9a mostram as bandas de absorção, sendo que a banda 3342 cm^{-1} é atribuída ao alongamento de grupos OH-, assim como a 2895 cm^{-1} corresponde ao trecho CH dos grupos CH_2 e CH_3 , e os picos 1650 cm^{-1} e 1427 cm^{-1} ao grupo carbonila de glicose (C=O). A presença de regiões cristalinas na estrutura da celulose é demonstrada entre os picos 1318 cm^{-1} e 1161 cm^{-1} . Com o pico 1161 cm^{-1} é possível perceber a presença do grupo C_1CO_4 , além de vibrações de alongamento de C_2O_2 , C_3O_3 e C_6O_6 segundo as bandas de 1033 , 1054 e 1108 cm^{-1} , respectivamente (KASHCHEYEVA et al., 2019; LEONARSKI et al., 2021b). O espectro da celulose obtida da indústria foi comparado com o espectro de uma celulose bacteriana de kombucha produzida em laboratório e com dados já publicados na literatura apenas com o objetivo de confirmar as suas propriedades, mostrado na Figura 10, comprovando que os resultados foram semelhantes para ambas as análises.

Com essas bandas de absorção, é possível concluir que a estrutura cristalina é da celulose tipo I, que é considerada a celulose nativa com propriedades mecânicas mais avançadas quando comparada com a celulose tipo II, que possui cristal distorcido (LI et al., 2019; YANG et al., 2013) A alteração da celulose tipo I para tipo II pode ocorrer no tratamento da celulose bacteriana, visto que se esse for muito alcalino, pode ocasionar na alteração da estrutura cristalina (VAZQUEZ et al., 2013).

4.1.2 Análise de cristalinidade por difração de raios X

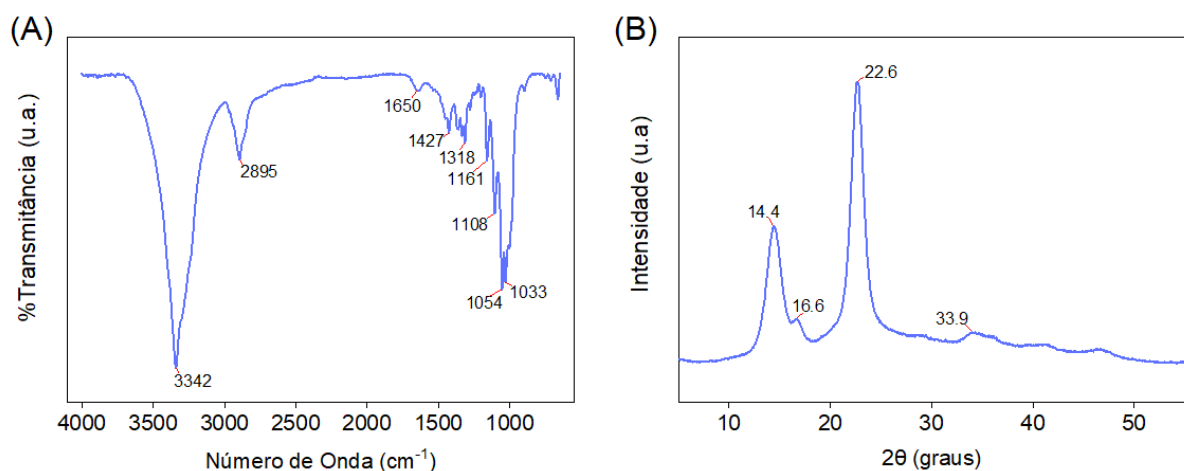
Como citado anteriormente por Kashcheyeva et al. (2019), a alta pureza e cristalinidade da celulose bacteriana promovem propriedades mecânicas exclusivas desse composto. A Figura 9b mostra quatro picos de difração que correspondem à celulose do tipo I e são eles: $2\theta = 14,4^\circ$; $16,6^\circ$; $22,6^\circ$ e $33,9^\circ$, que pertencem aos planos cristalinos (101), (10),

(002) e (040) respectivamente (MACHADO et al., 2018; YANG et al., 2013). Os picos são bastante próximos aqueles encontrados por Leonarski et al. (2021b) para celulose produzida em kombucha em condições de laboratório, como mostra a Figura 10.

A celulose bacteriana produzida a partir de kombucha obteve uma cristalinidade de 88,27%, que é um valor alto. Comparando com trabalhos realizados na área, Zhou et al. (2021) obteve cristalinidade próximo a 85%, Nascimento et al. (2021) entre 76-79%, e Kashcheyeva et al. (2019) encontrou uma cristalinidade de 90%, próxima a análise do presente trabalho. Leonarski et al. (2021b), usando o mesmo protocolo de caracterização obteve 74,3% de cristalinidade.

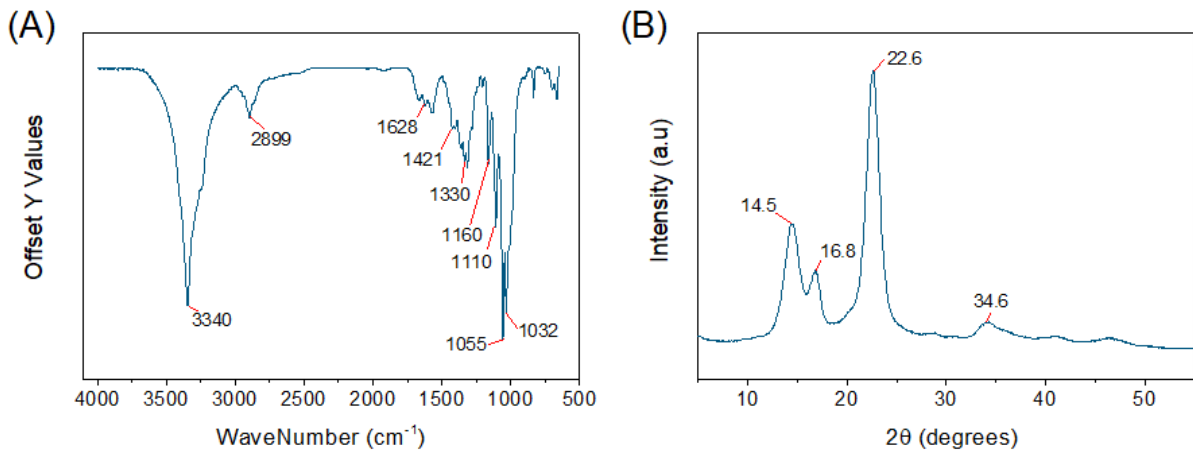
Um índice de cristalinidade alto gera nanocristais de celulose mais estáveis em relação à degradação do biopolímero, podendo ter dificuldades na solubilização do material. Uma possível explicação para a alta cristalinidade pode ser o intenso tratamento alcalino realizado com hidróxido de sódio por um longo período. A purificação da celulose bacteriana industrial necessitou de um tratamento mais longo (9 dias) que aquele geralmente realizado para celuloses produzidas em laboratório, com duração de 2 a 5 dias (dados não publicados). Segundo Leonarski et al. (2021b), o tratamento alcalino com altas concentrações e tempo de contato pode resultar em maior cristalinidade após a purificação, o que também foi relatado por Kashcheyeva et al. (2019).

Figura 10 – A) FTIR e B) DRX da celulose bacteriana de indústria.



Fonte: elaborado pela autora (2022).

Figura 11 - A) FTIR e B) DRX da celulose bacteriana produzida em laboratório.

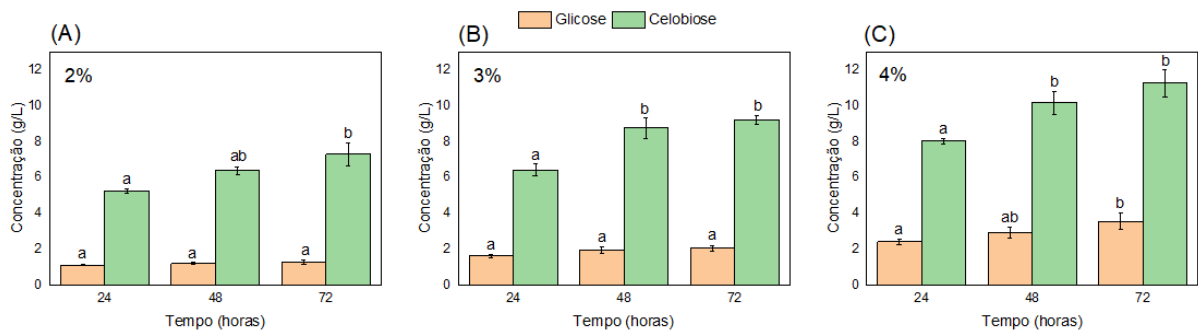


Fonte: LEONARSKI et al., (2021b).

4.2 CONCENTRAÇÃO DE CELOBIOSE E GLICOSE OBTIDOS NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A hidrólise enzimática foi acompanhada por 72 h, sendo que a degradação da celulose foi avaliada a cada 24 h. A análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi utilizada para quantificar celobiose e glicose como produtos finais da reação. As concentrações dos produtos analisados por HPLC estão apresentados na Figura 11.

Figura 12 - Concentração (g/L) de celobiose e glicose obtidos por hidrólise enzimática de celulose bacteriana de kombucha a 2%, 3% e 4% (m/v) de celulose após 72 h.



Fonte: elaborado pela autora (2022).

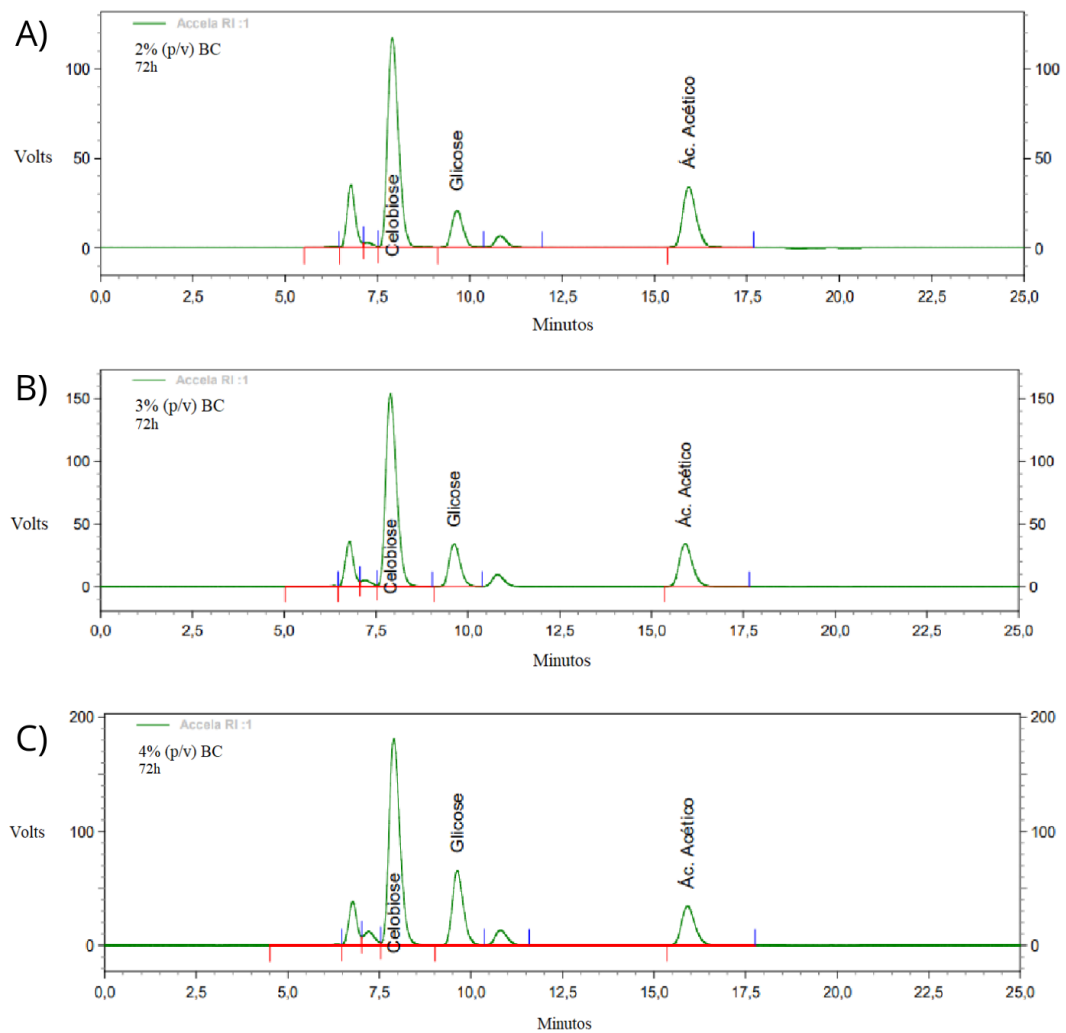
Houve um aumento na produção de celobiose de 24 h para 48 h em todas as concentrações, sendo que depois de 48 h não houve diferença significativa de acordo com o

teste de Tukey ($p < 0,05$). Em 2%, a diferença de produção de celobiose foi inferior em relação às outras amostras, o que está de acordo com a literatura, onde quanto maior for a quantidade de celulose bacteriana, maior será a quantidade de açúcar produzida no final da hidrólise (ROVERA et al., 2021).

Já para a glicose, nas concentrações de 2% e 3% de celulose não houve diferença significativa durante toda a reação (72 h). Porém, com 4% (m/v) de substrato, houve um aumento significativo no decorrer da hidrólise com comportamento similar a produção de celobiose, no entanto em proporções menores.

A produção de açúcares pela hidrólise enzimática da celulose bacteriana apresentou bons resultados no decorrer da cinética, sendo 48 h suficientes para parar a reação. O foco do trabalho foi a produção de celobiose e glicose, sendo observado a celobiose como produto de maior concentração. Para confirmar se ocorreu a produção de outros oligossacarídeos, analisou-se os cromatogramas obtidos durante a análise de HPLC ao final da hidrólise (72 h) para todas as concentrações, de acordo com a Figura 12.

Figura 13 - Cromatogramas dos produtos da hidrólise enzimática com A) 2%, B) 3% e C) 4% (m/v) de celulose após 72 h.



Fonte: elaborado pela autora (2022).

Na amostra de menor concentração de celulose bacteriana (2%), após 72 h, obteve-se 7,29 g/L de celobiose, 1,28 g/L de glicose e 5,38 g/L de ácido acético. O mesmo padrão se repete para a amostra de 3%, porém, conforme dito anteriormente, com um aumento da concentração de celulose bacteriana ocorreu um aumento na concentração de celobiose (9,23 g/L), glicose (2,05 g/L) e ácido acético (5,42 g/L). No caso da amostra 4%, após 72 h a concentração de celobiose foi de 11,28 g/L, glicose 3,55 g/L e ácido acético 5,49 g/L.

A concentração de ácido acético em todas as amostras é referente ao acetato utilizado como tampão. Os picos em tempos de retenção anteriores a celobiose apresentados no cromatograma possivelmente são de outros oligossacarídeos, sendo em 2% um destes picos mais expressivos (maior que glicose) e diminuindo com o aumento da concentração de celulose.

Isso indica possivelmente a presença de outros oligossacarídeos, porém não foi possível quantificá-los devido a necessidade de equipamento, coluna e padrões adequados.

Como citado anteriormente, não foram encontrados outros trabalhos que estudam a hidrólise enzimática de celulose bacteriana originada de kombucha, com foco na celobiose. Porém, outros trabalhos foram realizados com celulose bacteriana originada de outros substratos para diferentes aplicações, relatando a quantificação dos açúcares produzidos.

Rovera e colaboradores et al. (2018) realizaram a hidrólise enzimática de celulose bacteriana produzida por *Komagataeibacter sucrofermentans* para obtenção de nanocristais de maneira ecológica, comparando a produção de açúcares de acordo com o aumento da quantidade de enzima utilizada, fazendo uso da celulase ATCC26921 de *Trichoderma reesei*. Foram analisadas cinco relações de mistura de celulase/celulose bacteriana (1:4, 1:3, 1:2, 1:1 e 2:1) a cada 2 h por 74 h, onde a solução aquosa foi de 5 mg/g para a enzima e 12% em peso para a celulose. Como resultado, foi observado que as concentrações de celobiose e glicose foram inversamente relacionadas em função da relação enzima/celulose, pois a concentração de celobiose diminuiu à medida que a razão diminuiu, e a concentração de glicose aumentou com o aumento da enzima.

Esses resultados mostram que a atividade hidrolítica é mais intensa com concentrações mais altas de enzima, e que a conversão de celobiose em glicose foi maior para misturas mais ricas em enzimas, pois não foi detectado presença de celobiose na mistura 2:1. Isso pode ser explicado pela alta presença das β -glicosidades, que hidrolisam especificamente a celobiose em unidades de glicose, o que não foi analisado no presente trabalho visto que a produção de celobiose foi maior em todos os tempos e concentrações de celulose. Para uma análise mais aprofundada do impacto da concentração da enzima na produção de açúcares, recomenda-se para trabalhos futuros realizar ensaios alterando a concentração enzimática de 6 g de enzima /g de celulose usada no presente trabalho.

Já em outro estudo de Rovera et al. (2020), o foco foi comparar a reação de diferentes enzimas diante da celulose. Os autores realizaram a hidrólise enzimática de celulose bacteriana produzida por *Komagataeibacter sucrofermentans* em dois tratamentos enzimáticos diferentes: uma endo-1,4- β -glucanase de *Termobifida halotolerans*, e uma celulase de *Trichoderma reesei*, ambos tratamentos na proporção 1:4 de enzima/celulose. Tanto a celobiose quanto a glicose foram encontradas no final do processo de hidrólise envolvendo as celulases ($1,54 \pm 0,04$ g/L e $2,25 \pm 0,12$ g/L, respectivamente), e apenas celobiose ($1,36 \pm 0,11$ g/L) foi encontrada quando foram utilizadas as enzimas endo sozinhas. Isso pode ser explicado pela ausência das β -

glicosidades, que acabou impedindo a conversão de celobiose em glicose, reforçando a importância da escolha da enzima de acordo com o objetivo do trabalho.

4.2.1 Rendimentos de celobiose e glicose

De acordo com as equações (1) e (2) apresentadas na seção 3.4. de Materiais e Métodos, os rendimentos da celobiose e celulose foram calculados e apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Rendimento (%) de celobiose e glicose obtidos por hidrólise enzimática da celulose bacteriana de kombucha.

Celulose (m/v)	Tempo (h)	Rendimento (%)		
		Glicose	Celobiose	Total
2%	24	4,97 ± 0,13aA*	24,93 ± 0,63aA	29,89
	48	5,44 ± 0,21aA	30,40 ± 0,98abA	35,84
	72	5,77 ± 0,61aA	34,67 ± 3,12bA	40,44
3%	24	4,85 ± 0,23aA	20,38 ± 1,03aB	25,22
	48	5,82 ± 0,49abA	27,75 ± 1,75bAB	33,57
	72	6,17 ± 0,46bA	29,25 ± 0,78bAB	35,41
4%	24	5,45 ± 0,37aA	19,08 ± 0,32aB	24,53
	48	6,60 ± 0,73abA	24,19 ± 1,52bB	30,79
	72	7,99 ± 1,04aA	26,79 ± 1,78bB	34,78

Fonte: elaborado pela autora (2022).

*Análise de minúsculas (ab) do teste de Tukey ($p < 0,05$) referem à mesma concentração em diferentes tempos. Análise de letras maiúsculas (AB) do teste de Tukey ($p < 0,05$) referem à diferentes concentrações avaliadas no mesmo tempo.

De acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$), não houve diferenças significativas para o rendimento de glicose nas diferentes concentrações de celulose bacteriana avaliadas no mesmo tempo, mas houve diferença no decorrer do tempo para a concentração de 3% (m/v). Já para o rendimento de celobiose de acordo com o Teste, houve diferenças significativas tanto para a variação da concentração de celulose no mesmo tempo avaliado quanto para a variação do tempo na mesma concentração.

Para a glicose, o rendimento aumentou proporcionalmente com o aumento da concentração de celulose e com o tempo. Já para a celobiose, foi observado que, conforme o tempo passava, o rendimento aumentava na mesma concentração avaliada, mas o maior rendimento foi para a amostra de 2% (m/v), ao contrário da glicose que foi em 4% (m/v). Conseqüentemente, a conversão da celulose em glicose e celobiose (soma de ambos rendimentos) foi menor conforme aumento da concentração de substrato.

Para amostra contendo 2% de celulose, o rendimento total em glicose e celobiose foi de 40,4% após 72 h; para 3%, foi de 35,4%; e para 4%, 34,8%. É possível concluir, portanto, que o maior rendimento foi obtido em 2% de celulose bacteriana, e a maior produção de açúcares foi em 4% (p/v). Segundo Chu et al., (2014), uma possível explicação é o fato de que a alta concentração de celo-oligossacarídeos pode causar inibição das enzimas celulasas (endo e exo), levando a uma diminuição do rendimento da hidrólise enzimática e aumento da conversão de celobiose em glicose.

Após hidrólise enzimática, a celulose restante foi seca a 50°C e pesada para avaliar a influência da massa da celulose no rendimento. Para 2% (p/v) de celulose bacteriana, 52,4% da massa não foi hidrolisada; para 3% (p/v), 58,68% não hidrolisou; e para 4% (p/v), 64,9% da celulose não reagiu. Percebe-se que conforme a massa do substrato aumenta, menor é a quantidade de massa que reagiu, ou seja, menor é o rendimento da celulose, o que está de acordo com o rendimento calculado anteriormente.

Em seu trabalho, Chu e colaboradores (2014) fizeram uma hidrólise em vários estágios como alternativa, no qual os açúcares produzidos foram separados do sistema de reação após cada estágio de hidrólise. Inicialmente, as enzimas foram adsorvidas na celulose e em seguida o sistema era submetido as condições de reação. Após tempos determinados, o sobrenadante da reação contendo os produtos de hidrólise era removido e uma nova quantidade de tampão era adicionada aos sólidos remanescentes contendo a enzima adsorvida para um novo estágio de reação. O rendimento da reação aumentou de 50,46% para 75,56%, concluindo que a reação em estágios contribui para aliviar a inibição da enzima.

Outros trabalhos discutiram o rendimento da celulose depois da hidrólise enzimática. Brandes e colaboradores (2020) produziram celulose bacteriana utilizando glicerol como fonte de carbono e isolaram nanocristais por meio da hidrólise enzimática, utilizando a enzima Celluclast 1,5 L da Novozymes, mesma enzima utilizada neste trabalho. Ensaios foram feitos variando a quantidade de celulose, de 1 g a 10 g de celulose bacteriana em 40 µL de enzima.

Os melhores rendimentos foram obtidos quando se utilizou até 3 g de celulose para a mesma quantidade de enzima, em que o melhor rendimento foi de 25,55% com 2 g de celulose.

Já Kashcheyeva et al., (2019) observou o rendimento em três diferentes situações com 1% de celulose bacteriana: 1) celulose seca ao ar em temperatura ambiente sem purificação de componentes do meio de cultura, na qual a conversão foi de 66,6% em açúcares redutores após 72 h; 2) celulose seca e purificada com solução de NaOH 2% e solução diluída de HCl (pH 3), seguida por lavagem com água destilada até reação neutra, obtendo conversão de 99,5% de açúcares redutores; e 3) celulose purificada e úmida, em que ocorreu a diminuição da taxa de hidrólise enzimática, mas não afetou o grau de conversão, mantendo em 99,5%. O rendimento máximo da matéria prima purificada foi atingido em 56 h de reação para a celulose seca e em 16 h para a úmida.

Foi concluído pelo autor que as principais propriedades que afetam a conversão da celulose bacteriana são as impurezas e a umidade. Uma celulose purificada aumenta o número de locais acessíveis à enzima, aumentando o rendimento da reação, e uma celulose bacteriana úmida possui uma estrutura porosa natural mais estendida, favorecendo a velocidade de difusão das celulasas no substrato. Para maior comprovação, sugere-se a realização de um ensaio com celulose bacteriana úmida produzida em indústria, para que se possa comparar com a hidrólise do substrato seco.

Por mais que a cristalinidade da celulose obtida pelo autor (90%) tenha sido semelhante à do presente trabalho (88,27%), o alto índice não foi determinante para a eficiência da reação. Uma possível explicação para o alto rendimento obtido por Kashcheyeva et al., (2019) pode ser o coquetel enzimático, visto que as enzimas utilizadas pelo autor foram a CelloLux-A e BrewZyme BGX, diferente da Celluclast® utilizada no presente trabalho. Além disso, a celulose bacteriana foi produzida pela cultura simbiótica *Medusomyces gisevii* Sa-12, a 27°C e por 7 dias em um meio de glicose sintético. Pelo fato de a celulose utilizada no presente trabalho ser originada de uma kombucha industrial, diferentes características da estrutura da celulose podem acontecer, influenciando nos resultados da hidrólise enzimática.

O baixo rendimento de conversão da celulose obtido neste trabalho ainda precisa ser mais bem estudado para avaliar possíveis fenômenos e/ou parâmetros que possam afetar a reação. O açúcar predominante após a hidrólise enzimática foi a celobiose, o que alinhado ao objetivo de produzir oligossacarídeos é uma vantagem. No coquetel enzimático, estão presentes as enzimas endoglucanases, que hidrolisam cadeias maiores em celobiose, e a β -glicosidase,

responsável por hidrolisar a celobiose em glicose. Uma das explicações para o baixo rendimento seria uma possível inibição da enzima endoglucanase pela própria celobiose. Além disso, aparentemente a atividade da β -glicosidase foi baixa, resultando na baixa concentração de glicose como produto.

4.3 POTENCIAL USO DO SCOBY PARA PRODUÇÃO DE CELOBIOSE: ESTUDO DE CASO “POD KOMBUCHA”

O mercado global dos alimentos prebióticos é um dos setores que mais cresce, atingindo U\$ 2,5 bilhões investidos em 2020 (AHMED; HIKAL; ABOU-TALEB, 2020). A demanda da bebida kombucha está aumentando cada vez mais e, de acordo com a *Kombucha Brewers International* (KBI), existem atualmente mais de 300 indústrias produtoras da bebida no mundo. No Brasil, a Associação Brasileira de Kombucha (ABKOM) cita 25 produtores associados. Com a produção em crescimento, as empresas produzem muita celulose (SCOBY) durante o preparo da kombucha, e o descarte muitas vezes é inadequado. Portanto, sua aplicação na produção de oligossacarídeos pode ser uma alternativa a ser considerada, já que prebióticos são produtos de alto valor agregado.

A indústria “Pod Kombucha”, que concedeu a celulose bacteriana para o presente trabalho, possui uma produção média da bebida em torno de 2000 L por mês, produzindo cerca de 40 kg de celulose. Porém, parte da celulose é reaproveitada para posteriores produções, e somente 15 kg são descartados por mês. Com o aumento da produção, esse descarte pode vir a ser preocupante. Devido à alta capacidade de absorção de água da celulose bacteriana, o rendimento em massa seca é de aproximadamente 0,9 a 1%.

A hidrólise enzimática pode ser interessante para esse tipo de celulose bacteriana, visto que ela vem de uma fermentação focada na produção da bebida e, assim, reaproveitar a celulose descartada na produção. No entanto, a celulose é produzida de forma não controlada, que pode apresentar variação na espessura, na densidade de fibras, na cristalinidade e em outras propriedades físicas e químicas. Para aplicações biomédicas, por exemplo, essa celulose geralmente é produzida com características necessárias para a aplicação, produzidas sobre suportes para gerar um material com formato específico e espessura específica (ZHU et al., 2014).

Portanto, a hidrólise pode ser uma alternativa viável para a diminuição do descarte de celulose bacteriana na produção de kombucha, usando um coquetel enzimático comercial

disponível, desde que os rendimentos possam ser melhorados através de outros estudos sobre condições de como conduzir a reação enzimática com esse tipo de celulose.

5 CONCLUSÃO

Com o aumento da produção de kombucha no mundo, o descarte de celulose bacteriana está crescendo, fazendo com que novas alternativas de reaproveitamento da matéria prima estejam sendo estudadas. Através dos resultados obtidos da hidrólise enzimática de celulose bacteriana originada de kombucha como uma alternativa de reaproveitamento do substrato, pode-se concluir que a hidrólise é uma alternativa interessante para a produção de celobiose em diversas aplicações, principalmente porque baixas concentrações de glicose foram obtidas.

Por se tratar de uma celulose originada de uma fermentação em escala industrial, as propriedades físico-químicas foram analisadas apenas como forma de certificar a similaridade com celulose de kombucha produzida em escala de laboratório usando outro SCOBY. Pode ser confirmado que se trata de uma celulose do tipo I com alta cristalinidade (88,27%), mais cristalina que a obtida em laboratório (74,3%).

Na hidrólise enzimática, foi observado que com 4% (m/v) de celulose bacteriana, foi obtido a maior concentração de celobiose e glicose, não sendo possível quantificar outros oligossacarídeos pela necessidade de equipamento, coluna e padrões adequados. O maior rendimento foi obtido em 2% (m/v) de celulose (40,44% após 72 h), o que pode ser explicado pela inibição da enzima endoglucanase pela celobiose e baixa atividade da β -glicosidase.

Em uma hidrólise, é esperado atingir uma alta conversão quando se usa uma alta concentração de celulose para tornar o processo mais atrativo. Para isso, novas estratégias de reação precisam ser avaliadas para aumentar o rendimento, além de um estudo mais aprofundado para avaliar os possíveis efeitos de inibição dos produtos liberados sobre as enzimas.

Ainda como sugestão para trabalhos futuros, é interessante realizar ensaios variando a concentração da enzima sobre a celulose, para avaliar o impacto da concentração enzimática na produção de açúcares. Além disso, realizar a hidrólise enzimática utilizando celulose bacteriana úmida para identificar se ocorre um aumento no rendimento da reação.

REFERÊNCIAS

- AHMED, R. F.; HIKAL, M. S.; ABOU-TALEB, K. A. Biological, chemical and antioxidant activities of different types Kombucha. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 65, n. 1, p. 35–41, 2020.
- AHMED, S. E.; DIRAR, H. A. U. of K. J. Agric. Sci. 13 (1), 2005. v. 13, n. 1, 2005.
- ALVES, H. APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DE ACEROLA VERDE (*Malpighia emarginata* DC.) PARA A OBTENÇÃO DE AÇÚCARES UTILIZANDO TRATAMENTO ÁCIDO E ENZIMÁTICO. v. 4, n. 1, p. 6, 2021.
- 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, 2021.
- ÁVILA, P. F. et al. Cello-oligosaccharides production from lignocellulosic biomass and their emerging prebiotic applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 1–11, 2021.
- BANSAL, P. et al. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 833–848, 2009.
- BARBOSA, C. D. et al. Microbial–physicochemical integrated analysis of kombucha fermentation. **Lwt**, v. 148, n. April, 2021.
- BARBOSA, F. C. et al. Optimization of cello-oligosaccharides production by enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated sugarcane straw using cellulolytic and oxidative enzymes. **Biomass and Bioenergy**, v. 141, n. June, 2020.
- BASAK, A. K. Drying Characteristics of Bacterial Cellulose Produced From Fermentation of Black Tea by Symbiotic Colony of Yeast and Bacteria. **International Journal of Science and Research (IJSR)**, v. 4, n. 6, p. 2013–2016, 2015.
- BERTSCH, P.; ETTER, D.; FISCHER, P. Transient: In situ measurement of kombucha biofilm growth and mechanical properties. **Food and Function**, v. 12, n. 9, p. 4015–4020, 2021.
- BOMMARIUS, A. S. et al. Cellulase kinetics as a function of cellulose pretreatment. **Metabolic Engineering**, v. 10, n. 6, p. 370–381, 2008.

- BRANDES, R. et al. Production with a High Yield of Bacterial Cellulose Nanocrystals by Enzymatic Hydrolysis. **International Journal of Nanoscience**, v. 19, n. 3, p. 1–8, 2020.
- BRASIL - MAPA. Instrução Normativa 41, de 17/10/2019 - Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha. p. 7042, 2019.
- CHAKRAVORTY, S. et al. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 220, p. 63–72, 2016.
- CHEN, C.; LIU, B. Y. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 5, p. 834–839, 2000.
- CHINA, S. LA et al. Kombucha tea as a reservoir of cellulose producing bacteria: Assessing diversity among komagataeibacter isolates. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 11, n. 4, p. 1–18, 2021.
- 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.
- COSTA, A. F. S. et al. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* using corn steep liquor as nutrient sources. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. OCT, p. 1–12, 2017.
- COTON, M. et al. Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 5, p. 1–16, 2017.
- CZAJA, W. et al. Microbial cellulose - The natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p. 145–151, 2006.
- DIMA, S. O. et al. Bacterial nanocellulose from side-streams of kombucha beverages production: Preparation and physical-chemical properties. **Polymers**, v. 9, n. 8, p. 5–10, 2017.
- EBRAHIMI PURE, A. et al. Chemical composition of garlic fermented in red grape vinegar and kombucha. **Journal of Functional Foods**, v. 34, p. 347–355, 2017.
- EL-WAKIL, N. A. et al. Bacterial cellulose/phytochemical's extracts biocomposites for potential active wound dressings. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 26, p. 26529–26541, 2019.
- FAIDI, M. Feasability of Bacterial Cellulose in Furniture Design. p. 29, 2017.
- FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623–633, 2010.

- GAGGIÀ, F. et al. Kombucha beverage from green, black and rooibos teas: A comparative study looking at microbiology, chemistry and antioxidant activity. **Nutrients**, v. 11, n. 1, p. 1–22, 2019.
- GIBSON, G. R. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491–502, 2017.
- GOH, W. N. et al. Fermentation of black tea broth (kombucha): I. effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 1, p. 109–117, 2012.
- GUO, Z. PENG et al. Development of an industrial ethanol-producing yeast strain for efficient utilization of cellobiose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 1, p. 105–112, 2011.
- GUPTE, Y. et al. Characterization of nanocellulose production by strains of *Komagataeibacter* sp. isolated from organic waste and Kombucha. **Carbohydrate Polymers**, v. 266, n. February, p. 118176, 2021.
- HARRISON, K.; CURTIN, C. Microbial composition of scoby starter cultures used by commercial kombucha brewers in North America. **Microorganisms**, v. 9, n. 5, p. 1–21, 2021.
- HEINRITZ, S. N. et al. Effect of cellobiose supplementation on in vitro fermentation activity and bacterial numbers of porcine inocula. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 102, n. 2, p. 474–482, 2018.
- HETZLER, S.; STEINBÜCHELA, A. Establishment of cellobiose utilization for lipid production in *Rhodococcus opacus* PD630. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 9, p. 3122–3125, 2013.
- HOPFE, S. et al. Leaching of rare earth elements from fluorescent powder using the tea fungus Kombucha. **Waste Management**, v. 62, p. 211–221, 2017.
- HU, M. L. et al. Enhanced bioconversion of cellobiose by industrial *Saccharomyces cerevisiae* used for cellulose utilization. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. MAR, p. 1–11, 2016.
- ILLANA ESTEBAN, C. El hongo Kombucha. p. 269–272, 2007.
- IVANOVA, L. A. et al. Crystal and supramolecular structure of bacterial cellulose hydrolyzed by cellobiohydrolase from *scytalidium candidum* 3C: A basis for development of biodegradable wound dressings. **Materials**, v. 13, n. 9, 2020.
- IZAH, S. C. et al. A review of heavy metal concentration and potential health implications of beverages consumed in Nigeria. **Toxics**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 2017.
- JAKUBCZYK, K. et al. Evaluation of Fluoride and Selected Chemical Parameters in

Kombucha Derived from White, Green, Black and Red Tea. **Biological Trace Element Research**, v. 199, n. 9, p. 3547–3552, 2021.

JAYABALAN, R. et al. Biochemical characteristics of tea fungus produced during kombucha fermentation. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 843–847, 2010.

JAYABALAN, R. et al. A review on kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 538–550, 2014.

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

KALAIAPPAN, K. et al. Kombucha SCOBY-based carbon and graphene oxide wrapped sulfur/polyacrylonitrile as a high-capacity cathode in lithium-sulfur batteries. **Frontiers of Chemical Science and Engineering**, v. 14, n. 6, p. 976–987, 2020.

KARNAOURI, A. et al. Fine-tuned enzymatic hydrolysis of organosolv pretreated forest materials for the efficient production of cellobiose. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. APR, p. 1–17, 2018.

KASHCHEYEVA, E. I. et al. A study of properties and enzymatic hydrolysis of bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 26, n. 4, p. 2255–2265, 2019.

KESHK, S. M. Bacterial Cellulose Production and its Industrial Applications. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 04, n. 02, 2014.

LAAVANYA, D.; SHIRKOLE, S.; BALASUBRAMANIAN, P. Current challenges, applications and future perspectives of SCOBY cellulose of Kombucha fermentation. **Journal of Cleaner Production**, v. 295, p. 126454, 2021.

LEONARSKI, E. Produção de bebida tipo Kombucha e Celulose Bacteriana utilizando subproduto da acerola como matéria-prima. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 68, n. 1, p. 1–12, 2020.

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.

LI, J. et al. Production of high crystallinity type-I cellulose from *Komagataeibacter hansenii* JR-02 isolated from Kombucha tea. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 66, n. 1, p. 108–118, 2019.

LIMOLI, D. H.; JONES, C. J.; WOZNIAK, D. J. Bacterial Extracellular Polysaccharides in

- Biofilm Formation and Function. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 3, p. 1–30, 2015.
- MACEDO, R. et al. International Journal of Gastronomy and Food Science Kombucha: Review. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 22, n. October, p. 100272, 2020.
- MACHADO, R. T. A. et al. Komagataeibacter rhaeticus grown in sugarcane molasses-supplemented culture medium as a strategy for enhancing bacterial cellulose production. **Industrial Crops and Products**, v. 122, n. June, p. 637–646, 2018.
- MALBAŠA, R.; LONČAR, E.; DJURIĆ, M. Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. **Food Chemistry**, v. 106, n. 3, p. 1039–1045, 2008.
- MANO, M. C. R. et al. Oligosaccharide biotechnology: an approach of prebiotic revolution on the industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 1, p. 17–37, 2018.
- MAY, A. et al. Kombucha: A novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem. **PeerJ**, v. 2019, n. 9, p. 1–22, 2019.
- MOHAMMADKAZEMI, F.; AZIN, M.; ASHORI, A. Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 518–523, 2015.
- MOHITE, B. V.; PATIL, S. V. A novel biomaterial: Bacterial cellulose and its new era applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 61, n. 2, p. 101–110, 2014.
- MORALES, D. Biological activities of kombucha beverages: The need of clinical evidence. **Trends in Food Science and Technology**, v. 105, n. August, p. 323–333, 2020.
- MURUGESAN, G. S.; SATHISHKUMAR, M.; SWAMINATHAN, K. Supplementation of waste tea fungal biomass as a dietary ingredient for broiler chicks. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 16, p. 1743–1748, 2005.
- NAKAMURA, S.; OKU, T.; ICHINOSE, M. Bioavailability of cellobiose by tolerance test and breath hydrogen excretion in humans. **Nutrition**, v. 20, n. 11–12, p. 979–983, 2004.
- NASCIMENTO, E. S. et al. All-cellulose nanocomposite films based on bacterial cellulose nanofibrils and nanocrystals. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 29, n. June, p. 100715, 2021.
- NEFFE-SKOCIŃSKA, K. et al. Contenido de ácido y efectos de las condiciones de fermentación en las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales de bebidas de té de Kombucha. **CYTA - Journal of Food**, v. 15, n. 4, p. 601–607, 2017.
- OGEDA, T. L. Hidrólise Enzimática de Celuloses Pré-tratadas. p. 110, 2011.
- 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.
- PASSLACK, N. et al. Effects of dietary cellobiose on the intestinal microbiota and excretion of nitrogen metabolites in healthy adult dogs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 105, n. 3, p. 569–578, 2021.
- PASSLACK, N.; VAHJEN, W.; ZENTEK, J. Impact of Dietary Cellobiose on the Fecal Microbiota of Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 91, p. 103106, 2020.
- PENTTILÄ, P. A. et al. Enzymatic hydrolysis of biomimetic bacterial cellulose–hemicellulose composites. **Carbohydrate Polymers**, v. 190, n. February, p. 95–102, 2018.
- RAHMANI, R. et al. Kombucha fermentation of African mustard (*Brassica tournefortii*) leaves: Chemical composition and bioactivity. **Food Bioscience**, v. 30, n. April, p. 100414, 2019.
- RANA, A. K.; FROLLINI, E.; THAKUR, V. K. Cellulose nanocrystals: Pretreatments, preparation strategies, and surface functionalization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 182, p. 1554–1581, 2021.
- REINIATI, I. Bacterial Cellulose Nanocrystals: Production and Application. n. September, p. 4826, 2017.
- REISS, J. Original paper Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. **Z Lebensm Unters Forsch**, v. 198, p. 258–261, 1994.
- RIBEIRO, R. S. A. et al. Production of nanocellulose by enzymatic hydrolysis: Trends and challenges. **Engineering in Life Sciences**, v. 19, n. 4, p. 279–291, 2019.
- ROSA, K. S. Aproveitamento no mundo da moda: “Couro Vegano”. **Paper Knowledge . Toward a Media History of Documents**, 2019.
- 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.
- ROVERA, C. et al. Enzymatic hydrolysis of bacterial cellulose for the production of nanocrystals for the food packaging industry. **Nanomaterials**, v. 10, n. 4, p. 1–11, 2020.
- ROVERA, C. et al. Enzymatic hydrolysis of bacterial cellulose in the presence of a non-catalytic cerato-platanin protein. n. July, p. 1–11, 2021.
- SANTOS, M. J. DOS. Kombucha: caracterização da microbiota e desenvolvimento de novos produtos alimentares para uso em restauração. **Master Dissertation, universidade de Lisboa**, p. 1–119, 2016.
- SHANMUGAVEL, M. et al. Kombucha Fungus Mediated Silver Nanoparticles and Their Biological Activities. n. May, 2020.

- SOARES, M. G.; DE LIMA, M.; REOLON SCHMIDT, V. C. Technological aspects of kombucha, its applications and the symbiotic culture (SCOBY), and extraction of compounds of interest: A literature review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 110, n. May 2020, p. 539–550, 2021.
- TEOH, A. L.; HEARD, G.; COX, J. Yeast ecology of Kombucha fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, n. 2, p. 119–126, 2004.
- THORESEN, M. et al. Revisiting the phenomenon of cellulase action: Not all endo- and exocellulase interactions are synergistic. **Catalysts**, v. 11, n. 2, p. 1–13, 2021.
- TORÁN-PEREG, P. et al. Microbiological and sensory characterization of kombucha SCOBY for culinary applications. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 23, n. January, 2021.
- TU, C. et al. Use of kombucha consortium to transform soy whey into a novel functional beverage. **Journal of Functional Foods**, v. 52, n. November 2018, p. 81–89, 2019.
- URRUTIA, M. A. D. et al. Effects of supplementation with kombucha and green banana flour on Wistar rats fed with a cafeteria diet. **Heliyon**, v. 7, n. 5, 2021.
- VAZQUEZ, A. et al. Bacterial Cellulose from Simple and Low Cost Production Media by *Gluconacetobacter xylinus*. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 21, n. 2, p. 545–554, 2013.
- 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. April, 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. June, p. 108778, 2020.
- VOHRA, B. et al. Effects of medium variation and fermentation time towards the pH level and ethanol content of Kombucha. **AIP Conference Proceedings**, v. 2111, n. 1998, p. 298–302, 2019.
- WATAWANA, M. I. et al. Health, Wellness, and Safety Aspects of the Consumption of Kombucha. v. 2015, 2015.
- YANG, Y. et al. Isolation and characteristics analysis of a novel high bacterial cellulose producing strain *Gluconacetobacter intermedius* CI26. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 2012–2017, 2013.
- ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis

of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797–824, 2004.

ZHOU, J. et al. Biotransformation of nylon-6,6 hydrolysate to bacterial cellulose. **Green Chemistry**, v. 23, n. 19, p. 7805–7815, 2021.

ZHU, C. et al. Kombucha-synthesized bacterial cellulose: Preparation, characterization, and biocompatibility evaluation. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 102, n. 5, p. 1548–1557, 2014.

ZOU, C. et al. Zijuan tea- based kombucha: Physicochemical, sensorial, and antioxidant profile. **Food Chemistry**, v. 363, n. June, p. 3–10, 2021.