

Kombucha e a Produção de Celulose: Um Perfil Microbiológico Detalhado por MALDI-ToF

Walter Paixão de Sousa Filho¹ ; Elisandra da Silva Pena da Fonseca² ; Liana da Silva Fernandes², Luiz Fernando Rodrigues Junior²; Daniel Assumpção Bertuol²; Roberto Christ Vianna Santos² ; Michele Rorato Sagrillo³

RESUMO

A Kombucha é uma bebida fermentada a partir de chá, gerada por uma complexa comunidade microbiana, composta principalmente por bactérias acéticas e leveduras. A diversidade e a dinâmica dessa microbiota durante a fermentação influenciam a produção de metabólitos, como ácidos orgânicos, que impactam as características sensoriais da bebida e seus potenciais benefícios à saúde. No entanto, ainda são escassos os estudos sobre a composição microbiana das culturas iniciadoras de Kombucha. O presente estudo teve como objetivo identificar as bactérias presentes durante o processo fermentativo e estabelecer um perfil microbiológico da bebida. Os resultados indicaram que *Bacillus subtilis* foi a bactéria predominante, desempenhando um papel central no processo fermentativo e possivelmente contribuindo para a atividade probiótica. Contudo, sua presença demonstrou ser prejudicial à morfologia da celulose produzida, comprometendo sua aplicação em contextos biomédicos.

Palavras-chave: Kombucha, Celulose, MALDI-ToF, Microbiologia, Fermentação.

ABSTRACT

Kombucha, a fermented tea beverage, is produced by a complex microbial community primarily composed of acetic acid bacteria and yeasts. The diversity and dynamics of this microbiota during fermentation influence metabolite production, such as organic acids, which affect the sensory characteristics of the beverage and its potential health benefits. Despite its growing popularity, the microbial composition of Kombucha starter cultures remains underexplored. This study aimed to identify the bacterial species present during fermentation and establish a microbiological profile of the beverage. Results revealed that *Bacillus subtilis* was the predominant bacterium, playing a central role in fermentation and possibly contributing to probiotic activity. However, its presence was found to negatively impact the morphology of the produced cellulose, thereby limiting its biomedical applications.

Keywords: Kombucha, Cellulose, MALDI-ToF, Microbiology, Fermentation

Eixo Temático: Eixo 4: Tecnologia, Inovação e Desenvolvimento Sustentável (TIDS).

1. INTRODUÇÃO

Kombucha é uma bebida fermentada à base de chá, amplamente popular, cuja origem é atribuída à China. A partir de então, seu consumo se expandiu para o Japão, Rússia e diversos países do Oriente Médio, tornando-se, eventualmente, um fenômeno global. O processo de fermentação da Kombucha geralmente envolve uma cultura simbiótica complexa de bactérias acéticas e leveduras, denominada *scooby* (Cultura Simbiótica de Bactérias e Leveduras), em uma infusão de chá adoçado, realizada à temperatura ambiente por um período de 7 a 10 dias. O sabor do Kombucha é levemente ácido e alcoólico (Arıkan *et al.*, 2020)

A composição química da Kombucha varia entre os diferentes produtos, influenciada por fatores como a composição microbiana da cultura iniciadora, as condições de fermentação e os substratos adicionados. A compreensão detalhada da composição microbiana das culturas iniciadoras utilizadas na fermentação da Kombucha, bem como de suas atividades metabólicas, é crucial para aprimorar o controle sobre o processo fermentativo (Kluz *et al.*, 2022). Além disso, o papel do *scooby* na produção de celulose bacteriana é de grande interesse de diversas indústrias, principalmente quando falamos na aplicação biomédica, pois essa matriz extracelular de celulose não apenas contribui para a textura e a estabilidade da cultura, como pode ser utilizada na produção de materiais e nanomateriais biomédicos. Portanto, investigar os fatores que afetam tanto a fermentação quanto a produção de celulose pelo *scooby* é essencial para otimizar tanto a qualidade da bebida quanto a geração de celulose de alta pureza (Molina-Ramírez *et al.*, 2017).

A interação entre diferentes espécies de leveduras e bactérias acéticas pode tanto promover quanto inibir o crescimento de outras espécies, e suas características metabólicas desempenham um papel crucial na determinação da composição química final da Kombucha. Contudo, os estudos sobre a composição microbiana das culturas iniciadoras de Kombucha e suas propriedades metabólicas ainda são escassos. Os principais desafios na compreensão dessas culturas residem na diversidade e complexidade das comunidades microbianas envolvidas, o que dificulta uma caracterização precisa e a padronização dos processos fermentativos (Nyhan *et al.*, 2022).

Dada a complexidade na caracterização das bactérias presentes na

fermentação da Kombucha, o presente estudo teve como objetivo identificar as bactérias presentes durante o processo fermentativo e estabelecer um perfil microbiológico da bebida, utilizando espectrometria de massas MALDI-ToF.

2. METODOLOGIA

Para a identificação microbiológica por espectrometria de massa, utilizando proteínas extraídas das bactérias presentes na fermentação da Kombucha, foram analisados tanto o líquido fermentado quanto o scoby para o isolamento bacteriano. As amostras foram inicialmente semeadas em placas de ágar MacConkey e ágar sangue, utilizando o método de esgotamento. As colônias isoladas foram então selecionadas para a extração de proteínas.

O preparo das amostras para análise por espectrometria de massa seguiu o protocolo descrito por Sogawa *et al.* (2011), com algumas adaptações conforme as instruções do fabricante. Primeiramente, 300 μ L de água Milli-Q foram transferidos para um microtubo de 1,5 mL. Usando uma alça de inoculação estéril de 1 μ L, as colônias isoladas das placas de cultura foram transferidas para o tubo contendo a água, misturando-se completamente até que o material estivesse totalmente em suspensão.

Em seguida, foram adicionados 900 μ L de etanol puro à suspensão, que foi homogeneizada em vórtex. A mistura foi centrifugada por 2 minutos a 13.000 rpm, e o sobrenadante removido cuidadosamente com uma pipeta. O pellet resultante foi deixado secar ao ar livre por pelo menos 5 minutos à temperatura ambiente.

Após a secagem, 50 μ L de ácido fórmico aquoso a 70% foram adicionados ao pellet, e a solução foi pipetada para ressuspender o material, seguido de mistura em vórtex e incubação por 25 minutos. Posteriormente, foram adicionados 50 μ L de acetonitrila a 100% ao tubo, e a mistura foi novamente centrifugada por 2 minutos a 15.000 rpm.

Após a centrifugação, 1 μ L do sobrenadante foi depositado em uma posição vazia de uma placa de alvo MALDI previamente limpa, e a placa foi deixada secar ao ar à temperatura ambiente. Para finalizar, 1 μ L de BTS foi pipetado em cada uma das posições designadas para controle de qualidade (QC) de Padrão de teste bacteriano Bruker (BTS), secando-se à temperatura ambiente. Cada posição de amostra e cada

posição QC de BTS foram sobrepostas com 1 µL de solução de matriz ácido 4-hidroxi- α -cianocínâmico (HCCA). Após a secagem, a placa MALDI foi inserida no espectrômetro de massa para análise.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Das 19 amostras coletadas, 15 foram possíveis identificar os microrganismos, conforme a tabela 1:

Tabela 1 - Análise de espectrometria de massa (Maldi-ToF)

Analito ID	Organismo (melhor match)	Score Valor	Organism (Segundo melhor match)	Score Valor
1	<i>Micrococcus luteus</i>	2.282	<i>Micrococcus luteus</i>	2.233
2	<i>Micrococcus luteus</i>	2.259	<i>Micrococcus luteus</i>	2.206
3	<i>Bacillus subtilis</i>	1.923	<i>Bacillus subtilis</i>	1.851
4	<i>Bacillus subtilis</i>	1.83	<i>Bacillus subtilis</i>	1.83
7	<i>Bacillus subtilis</i>	1.832	<i>Bacillus subtilis</i>	1.755
9	<i>Bacillus subtilis</i>	2.031	<i>Bacillus subtilis</i>	1.937
13	<i>Bacillus subtilis</i>	2.097	<i>Bacillus subtilis</i>	1.976
18	<i>Bacillus subtilis</i>	1.797	<i>Bacillus subtilis</i>	1.751
19	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.876	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.718

Fonte: construção do autor.

O microrganismo mais predominante nas análises foi o *Bacillus subtilis*, bactéria descrita na literatura com propriedade probiótica (Yang *et al.*, 2022), uma das características conhecidas da Kombucha está diretamente relacionada ao equilíbrio

de sua comunidade microbiana, que pode influenciar significativamente o pH, a produção de álcool e a formação do *scooby*. Este equilíbrio é crucial, pois qualquer alteração na composição microbiana pode levar a mudanças na morfologia da celulose produzida, tornando-a amorfa e irregular devido à degradação da celulose por certas bactérias.

Entre as bactérias identificadas na análise MALDI-TOF, destaca-se o *Bacillus subtilis*, conhecido por seu papel na fermentação, mas também capaz de degradar a celulose, prejudicando a integridade estrutural do *scooby*. Outra bactéria presente foi o *Micrococcus luteus*, que, embora esteja sendo estudada por suas propriedades probióticas em alimentos fermentados (Nwachukwu *et al.*, 2019), também compete com as bactérias produtoras de celulose, contribuindo para a má formação e irregularidade morfológica da celulose na Kombucha.

Além disso, o *Staphylococcus epidermidis* foi identificado na análise. Esta bactéria é conhecida por sua presença em processos de fermentação de produtos como queijos, carnes e soja (Heo; Lee; Jeong, 2020). Embora *S. epidermidis* não seja reconhecido como produtor de celulose, ele pode atuar como um competidor natural das bactérias celulolíticas, impactando negativamente a qualidade e a morfologia da celulose produzida na Kombucha.

O perfil microbiológico revelou que *Bacillus subtilis* foi a bactéria mais predominante entre os isolados da Kombucha e do *scooby* produzido. Este resultado indica que o equilíbrio da comunidade microbiana e a acidificação típica da bebida, ambos influenciados pela presença de *B. subtilis*, desempenham um papel crucial na definição do sabor característico da Kombucha e potencialmente contribuem para suas propriedades probióticas. No entanto, no que se refere à eficácia na produção de celulose, *B. subtilis* apresentou um impacto negativo, comprometendo a integridade estrutural das redes de fibras de celulose. Esse efeito é consistente com a literatura, que já aponta *Bacillus subtilis* como uma espécie que pode interferir na morfologia da celulose, resultando em uma estrutura menos robusta (Deng; Wang, 2022; Hamza *et al.*, 2022).

4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste estudo, concluímos que a composição microbiológica da Kombucha desempenha um papel fundamental na qualidade do *scooby* produzido, particularmente na formação e morfologia da celulose. O *Bacillus subtilis* foi identificado como a bactéria predominante durante o processo de fermentação, influenciando não apenas o sabor e as propriedades probióticas da bebida, mas também impactando negativamente a integridade estrutural da celulose. A presença de *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus epidermidis*, que atuam como competidores naturais das bactérias celulolíticas, também contribuiu para a irregularidade morfológica da celulose, comprometendo sua aplicação potencial em contextos biomédicos.

Esses achados destacam a importância do equilíbrio da comunidade microbiana na produção de Kombucha, não apenas em termos de seus efeitos sensoriais e potenciais benefícios à saúde, mas também em relação à qualidade do biopolímero celulósico produzido. Para otimizar a produção de celulose de alta qualidade na Kombucha, seria necessário um controle mais rigoroso da composição microbiana durante a fermentação, visando minimizar a influência de espécies que possam comprometer a estrutura e a funcionalidade do *scooby*.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de expressar nossa sincera gratidão à CAPES (Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo generoso apoio e investimento em nossa pesquisa. Através de seu comprometimento com o avanço da educação e da pesquisa no Brasil, a CAPES desempenhou um papel fundamental em tornar este projeto possível e a empresa Yam! Kombucha pela colaboração e cedências das amostras.

REFERÊNCIAS

ARIKAN, Muzaffer; MITCHELL, Alex L.; FINN, Robert D.; GÜREL, Filiz. Microbial composition of Kombucha determined using amplicon sequencing and shotgun metagenomics. **Journal of Food Science**, v. 85, n. 2, p. 455–464, 20 fev. 2020. Disponível em: <<https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1750-3841.14992>>.

DENG, Yijie; WANG, Shiao Y. Sorption of Cellulases in Biofilm Enhances Cellulose

Degradation by *Bacillus subtilis*. **Microorganisms**, v. 10, n. 8, p. 1505, 26 jul. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2607/10/8/1505>>.

HAMZA, Isam Shaker; ALZUBAIDI, Labeeb Ahmed; JARALLAH, Aziz Latif; RAMADHAN, Rehab S. Improvement Efficacy of *Bacillus Subtilis* Cellulose Hydrolyzing by Using Cold Plasma Technique. **Iraqi Journal of Science**, v. 63, n. 4, p. 1423–1430, 30 abr. 2022. Disponível em: <<https://ijs.uobaghdad.edu.iq/index.php/eijs/article/view/4409>>.

KLUZ, Maciej Ireneusz; PIETRZYK, Karol; PASTUSZCZAK, Miłosz; KACANIOVA, Miroslava; KITA, Agnieszka; KAPUSTA, Ireneusz; ZAGUŁA, Grzegorz; ZAGROBELNA, Edyta; STRUŚ, Katarzyna; MARCINIAK-LUKASIAK, Katarzyna; STANEK-TARKOWSKA, Jadwiga; TIMAR, Adrian Vasile; PUCHALSKI, Czesław. Microbiological and Physicochemical Composition of Various Types of Homemade Kombucha Beverages Using Alternative Kinds of Sugars. **Foods**, v. 11, n. 10, p. 1523, 23 maio 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2304-8158/11/10/1523>>.

MOLINA-RAMÍREZ, Carlos; CASTRO, Margarita; OSORIO, Marlon; TORRES-TABORDA, Mabel; GÓMEZ, Beatriz; ZULUAGA, Robin; GÓMEZ, Catalina; GAÑÁN, Piedad; ROJAS, Orlando; CASTRO, Cristina. Effect of Different Carbon Sources on Bacterial Nanocellulose Production and Structure Using the Low pH Resistant Strain *Komagataeibacter Medellinensis*. **Materials**, v. 10, n. 6, p. 639, 11 jun. 2017. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1996-1944/10/6/639>>.

NYHAN, Laura M.; LYNCH, Kieran M.; SAHIN, Aylin W.; ARENDT, Elke K. Advances in Kombucha Tea Fermentation: A Review. **Applied Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 73–103, 15 jan. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2673-8007/2/1/5>>.

YANG, Jieping; LAGISHETTY, Venu; KURNIA, Patrick; HENNING, Susanne M.; AHDOOT, Aaron I.; JACOBS, Jonathan P. Microbial and Chemical Profiles of Commercial Kombucha Products. **Nutrients**, v. 14, n. 3, p. 670, 5 fev. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6643/14/3/670>>.