

## Biofilme celulósico: Avaliação da influência de chás e fontes de carbono durante obtenção de kombucha

### Cellulosic biofilm: Evaluation of the influence of teas and carbon sources during kombucha production

#### RESUMO

O presente trabalho visou avaliar a utilização de chá (7g/L) verde, branco, assim como a mistura destes, acrescidos dos açúcares (100 g/L) branco ou demerara, como potenciais substratos na fermentação durante a obtenção de kombucha com consequente formação de biofilme celulósico, através de fermentações em Erlenmeyer de 250 mL com 200 mL dos meios e 10% (v/v) de inóculo, incubadas a 28°C, por 14 dias. Nos tempos 0, 7 e 14 dias os fermentados foram centrifugados a 4000 rpm por 15 minutos e avaliados em triplicata os sólidos solúveis ( $^{\circ}$ Brix) do sobrenadante e o peso seco da biofilme celulósico (a 100°C por 48 horas). Os resultados obtidos demonstraram que chá verde juntamente açúcar branco produziram 2,6 vezes mais biomassa que os outros cultivos com mesma fonte de carbono, e quase 9 vezes mais que os cultivos que empregaram açúcar demerara.

**PALAVRAS-CHAVE:** Celulose bacteriana. *Camellia sinensis*. Açúcar branco. Açúcar demerara.

#### ABSTRACT

The present work aimed to evaluate the use of green, white (7g/L) tea, as well as the mixture of these, white or raw sugars (100 g/L), as potential substrates in the fermentation during obtaining kombucha beverage with consequent formation of cellulosic biofilm by fermentation in Erlenmeyer 250 mL with 200 mL media and 10% (v/v) inoculum incubated at 28°C for 14 days. At times 0,7 and 14 days the fermented were centrifuged at 4000 rpm for 15 minutes and the soluble solids ( $^{\circ}$ Brix) of the supernatant were evaluated in triplicate and the dry weight of the cellulosic biofilm (at 100°C for 48 hours). The results showed that green tea together with white sugar produced 2.6 times more biomass than other crops with the same carbon source, and almost 9 times more than the crops that used raw sugar.

**KEYWORDS:** Bacterial cellulose. *Camellia sinensis*. White sugar. Raw sugar.

**Táise Cecchin**

[taise\\_cecchin@hotmail.com](mailto:taise_cecchin@hotmail.com)

Universidade Tecnológica  
Federal do Paraná, Toledo,  
Paraná, Brasil

**Jessica Cristina Zandonai**

[izandonai@alunos.utfpr.edu.br](mailto:izandonai@alunos.utfpr.edu.br)

Universidade Tecnológica  
Federal do Paraná, Toledo,  
Paraná, Brasil

**Danielle Camargo**

[daniellecamargo@utfpr.edu.br](mailto:daniellecamargo@utfpr.edu.br)

Universidade Tecnológica  
Federal do Paraná, Toledo,  
Paraná, Brasil

**Caroline M. Aguiar**

[cmaquiar@utfpr.edu.br](mailto:cmaquiar@utfpr.edu.br)

Universidade Tecnológica  
Federal do Paraná, Toledo,  
Paraná, Brasil

**Priscila Vaz de Arruda**

[priscilaarruda@utfpr.edu.br](mailto:priscilaarruda@utfpr.edu.br)

Universidade Tecnológica  
Federal do Paraná, Toledo,  
Paraná, Brasil

**Recebido:** 19 ago. 2019.

**Aprovado:** 01 out. 2019.

**Direito autoral:** Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



## INTRODUÇÃO

A kombucha é obtida por uma simbiose de leveduras e bactérias que tradicionalmente fermenta os chás derivados da *Camellia sinensis* juntamente de uma fonte de carbono (sacarose), obtendo dois componentes como produto: a bebida gaseificada de sabor agridoce e uma película celulósica flutuante (CHEN e LIU, 2000).

Os chás branco, verde, oolong e preto são os principais chás provenientes de folhas e brotos da *Camellia sinensis*, diferindo entre si pela variação na colheita, processamento e grau associado a oxidação de polifenóis das folhas da planta (UNACHUKWU et al., 2010). Sendo o chá verde produzido a partir de folhas frescas, as quais são apenas escaldadas e fervidas, ocorrendo uma rápida inativação da enzima polifenol oxidase, o que mantém preservado seu teor de polifenóis e o torna mais rico em catequinas e compostos com atividades funcionais. Já o chá branco é produzido a partir das folhas novas e brotos, parte mais nobre da planta, que são colhidos antes das flores se abrirem (CABRERA et al., 2006; DUARTE e MENARIM, 2006).

No Brasil, os dois principais açúcares fabricados industrialmente são o açúcar cristal branco e o demerara, sendo este último submetido a um sistema de clarificação menos eficiente, onde utiliza-se apenas leite de cal, deixando-o envolto por uma película aderente de mel. Para o açúcar branco, além do leite de cal, emprega-se também anidrido sulfuroso (MACHADO, 2012).

No consórcio microbiano de kombucha os procariotos mais abundantes pertencem a família *Acetobacteraceae*, sendo a *Gluconacetobacter xylinus* responsável pela sintetização da película de celulose bacteriana que se deposita na parte superior da fermentação como um metabólito secundário de todo o processo (LEAL et al., 2018). A celulose possui muitas propriedades únicas, como a alta resistência mecânica, alto teor de água, alta cristalinidade e uma rede nanofibril ultra-fina altamente pura, diferentemente da celulose vegetal (BÄCKDAHL et al., 2006).

Dentre as várias aplicações biotecnológicas da celulose bacteriana, destacam-se o uso como estabilizante em emulsões cosméticas, substituição da madeira na indústria de papel, tratamento de úlceras na medicina e também como pele artificial temporária para tratamento de queimaduras (DONINI et al., 2010). Desta forma, o presente trabalho visou avaliar a utilização de chá verde, chá branco, assim como a mistura deste, acrescidos dos açúcares branco e demerara, como potenciais substratos na fermentação durante a obtenção de kombucha com formação de biofilme celulósico.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### OBTENÇÃO DA CULTURA DE KOMBUCHA

Utilizou-se um consórcio de fungos e bactérias de origem doméstica, cedida à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Toledo, por uma produtora de kombucha caseira, da cidade de Santa Helena/PR.

## PREPARO DO INÓCULO

Para obtenção do inóculo Kombucha, a SCOBY foi cultivada por 14 dias à 28°C em BOD, no meio constituído por chá preto (7 g/L) acrescido de açúcar cristal (100g/L).

## PREPARO DOS MEIOS DE FERMENTAÇÃO

Os meios de fermentação foram preparados conforme metodologia adaptada de Malbasa et al (2006), utilizando (7 g/L) de diferentes chás derivados da *Camellia sinensis*, sendo identificados como: chá verde, chá branco e suas misturas. Os chás foram infundidos entre 10-15 minutos, acrescidos subsequentemente das fontes de carbono, açúcar cristal ou branco, nas concentrações de 10% (m/v), enquanto ainda estavam quentes. Os chás foram arrefecidos até temperatura ambiente, para posterior inoculação de 10% (v/v) do inóculo obtido anteriormente.

As fermentações foram realizadas em BOD a 28 °C por 14 dias com amostragens realizadas nos tempos inicial, 7 e 14 dias em triplicata. A amostragem consistiu em centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos de todos os conteúdos resultantes das fermentações, a fim de separar a biomassa do sobrenadante. O sobrenadante foi utilizado para determinação dos sólidos solúveis (°Brix).

## ANÁLISE DE CRESCIMENTO E °BRIX

Após a separação do sobrenadante, lavou-se a biomassa com água destilada nas mesmas condições da centrifugação. Então, determinou-se a formação de biofilme, secando-o por 48 horas em estufa a 100°C até peso constante. Quanto o °Brix foi determinado com refratômetro de bancada.

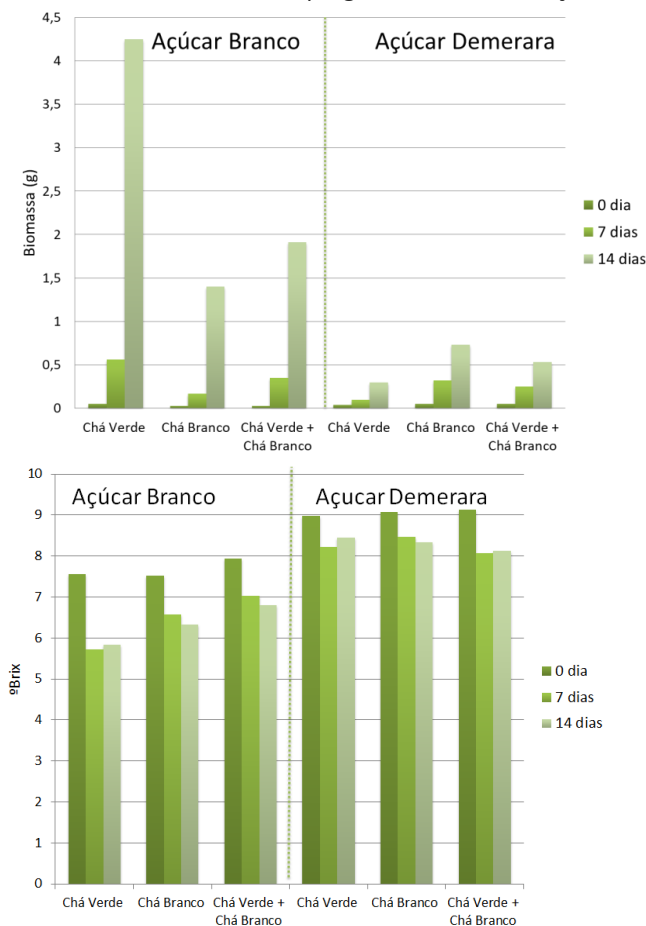
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1A apresenta a formação de biofilme, enquanto a Figura 1B, a variação de sólidos solúveis (°Brix) dos diferentes meios avaliados durante a fermentação. Observa-se que o emprego do açúcar branco independentemente do tipo de chá avaliado propiciou maiores valores de massa de biofilme em comparação aos valores obtidos durante o cultivo em açúcar demerara. Verificou-se que o cultivo na presença de chá verde propiciou ao final do processo, uma produção de 4,20 g de biomassa, sendo esta a máxima obtida em comparação às demais condições avaliadas (Fig. 1A), com consequente máxima diminuição (23%) de sólidos solúveis (Fig. 1B). Observa-se ainda com relação ao cultivo empregando-se como fonte de carbono, açúcar branco, formações de 1,36g e 1,88g de biofilme quando da utilização dos chás branco e mistura (verde + branco), respectivamente. Com relação à redução de sólidos solúveis, verifica-se nestas condições valores entre 15,7% - 14,2% dos chás citados anteriormente.

Ainda com relação à Figura 1A, observa-se que durante o cultivo em açúcar demerara, não foi verificado o favorecimento da formação do biofilme em chá verde, conforme observado no cultivo em açúcar branco. Naquela condição,

verificou-se que chá branco foi o que propiciou máxima formação (0,68g) de biofilme. Com relação à concentração de sólidos solúveis (Fig. 1B), verificou-se redução de no máximo 6 à 10% em relação à concentração inicial.

Figura 1 – (A) Crescimento de biomassa resultante das fermentações de kombucha; (B) Variação de sólidos solúveis dos meios empregados nas fermentações de kombucha



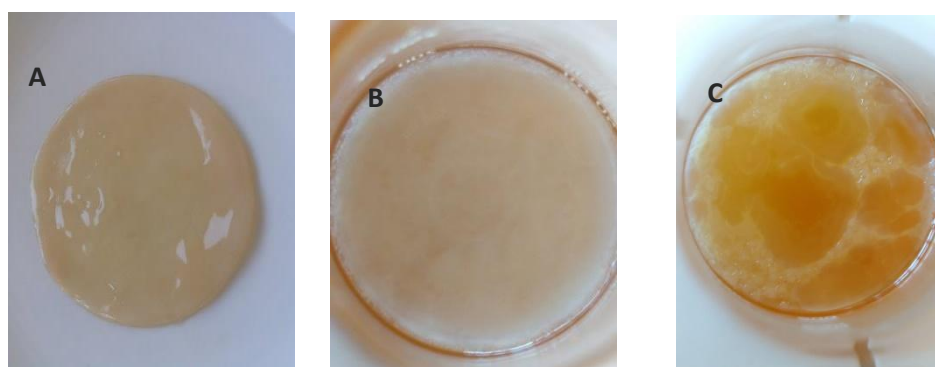
Fonte: Autoria Própria.

Destaca-se ainda que os resultados obtidos nos cultivos que utilizaram chá verde e açúcar demerara, demonstraram uma menor produção de biomassa (cerca de 16 vezes menor) quando comparado às análises realizadas com mesmo meio de cultivo, porém com açúcar branco como fonte de carbono, produzindo apenas 0,26 g ao final do processo (Fig. 1A), assim como um menor consumo de sólidos solúveis (5,9%, Fig. 1B), valor este quase 4 vezes menor que o observado com açúcar branco.

Assim, observou-se que nos cultivos realizados em açúcar demerara a condição que propiciou maior crescimento foram os realizados em chá branco, enquanto que nos cultivos realizados em açúcar branco favoreceram-se os cultivos em chá verde. Porém, de maneira geral, os maiores crescimentos prevaleceram com açúcar branco como fonte de carbono, sendo 5 vezes maior que os valores de biomassa observados em açúcar demerara, conforme observado na Figura 2, que demonstra os crescimentos de biomassa no decorrer dos 14 dias de fermentação com todos os meios de cultivo utilizados.

Tal favorecimento dos meios contendo chá verde e açúcar branco para a produção de biofilme (celulose) pode ser explicada pela maior concentração de cafeína no chá verde com relação ao chá branco, conforme reportado por Unachukwo et al (2010), cafeína esta que possivelmente, pode estar atuando como fonte de nitrogênio na fermentação. Com relação aos açúcares, de acordo com estudo de Iqbal et al (2016), por passar por mais etapas de purificação que o açúcar demerara, o açúcar cristal acaba tendo em média 95% menos teor de cromo em sua composição. Esta purificação retira a camada de mel que envolve os cristais de açúcar demerara, fazendo com que o açúcar cristal seja uma fonte de carbono mais acessível aos microorganismos (Machado, S. S. 2012).

Figura 2. Biomassa obtida pela fermentação de kombucha em diferentes substratos, sendo (A) chá verde e açúcar branco; (B) chá branco e açúcar demerara e (C) chá verde e açúcar demerara.



Fonte: Autoria Própria.

A Figura 2 apresenta a morfologia dos biofilmes obtidos em função das diferentes condições avaliadas. A Figura 2A, mostra o biofilme produzido à partir de açúcar branco e com os chás verde e branco, no qual verificou-se mesma aparência, ou seja, biofilmes consistentes, de aparência regular e com maiores massas. Já com relação ao cultivo realizado em açúcar demerara, tal comportamento não foi observado, uma vez que os biofilmes apresentaram-se inconsistente (Fig. 2B) e disforme (Fig. 2C) em função do tipo de chá. De acordo com Keshk e Sameshima (2005), a eficiência de produção de celulose pela bactéria *G. xylinus* reside na capacidade de sintetizar glicose à partir de diferentes fontes de carbono, refletindo no índice de cristalinidade, no grau de emaranhamento das microfibrilas, na capacidade de retenção de água e na viscosidade da celulose. Dessa forma, o açúcar branco pode ter propiciado a melhor formação de celulose, favorecendo um maior grau de emaranhamento das microfibrilas, contrariamente do observado com açúcar demerara.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que as condições dos meios de cultivos submetidos a fermentação interferem na cristalinidade, na quantidade (massa de biofilme) e no emaranhamento da rede de celulose formada pela kombucha. De acordo com os resultados, verificou-se

que o chá verde juntamente açúcar branco produziu 2,6 vezes mais massa de biofilme, que os outros cultivos com mesma fonte de carbono, e quase 9 vezes a mais que os cultivos que empregaram açúcar demerara.

### AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a Fundação Araucária – Paraná e a Universidade Tecnológica Federal do Paraná por todo o apoio durante todo o trabalho.

### REFERÊNCIAS

- BÄCKDAHL et al; 2006. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. **Biomaterials**. Volume 27, Issue 9, Pages 2141 - 2149. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.10.026>.
- CABRERA et al.; (2006). Beneficial effects of Green tea: a review. **Journal of the American College of Nutrition**, Clearwater, v. 25, n. 2, p. 79-99, 2006.
- CHEN, C.; LIU, B. Y. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, 89, pag. 834 - 839. (2000). <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01188.x>
- DONINI et al.; 2010. Biosynthesis and recent advances in production of bacterial cellulose. **Eclat. Quím.**, São Paulo, 35 - 4: 165 – 178.
- DUARTE, M.R.; MENARIM, D.O.; Morfodiagnose da anatomia foliar e caulinar de *Camelliasinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia** Brazilian Journal of Pharmacognosy, 16(4): 545-551, Out./Dez. 2006.
- IQBAL et al.; 2017. Total phenolic, chromium contents and antioxidant activity of raw and processed sugars. **Information Proc. Agric.** 4, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.inpa.2016.11.002>.
- KESHK, S. M. A. S., SAMESHIMA, K. Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n 6, p. 478- 482, 2005.
- LEAL et al; 2018. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites, **CYTA J Food**, 16:1, 390-399, DOI: 10.1080/19476337.2017.1410499
- MACHADO, S. S.; Tecnologia da Fabricação do Açúcar. **Inhumas: IFG**; Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2012. 56 p.
- MALBASA et al.; 2006. Sacale-up of Black Tea Batch Fermentation. **Trans IChemE**, Part C. 84, 193-199.
- UNACHUKWU et al.; (2010), White and Green Teas (*Camellia sinensis* var. *sinensis*): Variation in Phenolic, Methylxanthine, and Antioxidant Profiles. **Journal of Food Science**, 75: C541-C548. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01705.x