

Isolamento e identificação de microrganismo produtor de biofilme celulósico a partir de cultura de *kombucha*

Isolation and identification of cellulosic biofilm production from *kombucha* culture

RESUMO

Nome Ana Clara Ozelhieri de Almeida
anaclaraozelhieri@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Nome Priscila Vaz de Arruda
priscilaarruda@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Ingrid Fernanda Silvano Pacheco Correa Furtado
ingridfurtado@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Kombucha é uma bebida fermentada preparada com chá preto ou verde açucarado a qual é adicionada o *SCOBY* (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts*), uma película de celulose bacteriana contendo um consórcio simbiótico de bactérias e leveduras. Nesse sentido, devido à crescente busca por polímeros sustentáveis, almejou-se isolar um microrganismo produtor de celulose presente na *kombucha*. Para isso realizou-se diluição seriada da *kombucha* e testou-se os meios de isolamento: Hestrin Schramm (HS), HS acrescido de Fluconazol® e meio com etanol e carbonato de cálcio. Os cultivos foram realizados em BOD a 30°C por 24h e selecionou-se colônias similares as reportadas na literatura como responsáveis pela produção de celulose. Isolou-se três colônias, as quais foram identificadas por métodos de biologia molecular. Duas apresentaram 99,72% de semelhança com *Pseudozyma aff. pruni* ou *Kalmanozyma brasiliensis*, também denominada *Pseudozyma brasiliensis* (86,62% de semelhança) e a terceira colônia apresentou 100% de semelhança com *Sporidiobolus pararoseus*. Nenhum dos microrganismos isolados é reportado como produtor de celulose, porém possuem características biotecnológicas interessantes. Apesar de não ter-se atingido o objetivo principal, foi possível expandir os conhecimentos de técnicas moleculares, bem como evidenciou-se que a bioprospecção é uma atividade árdua e complexa devido a diversidade de microrganismos na *kombucha*.

PALAVRAS-CHAVE: Biopolímeros. Bioprospecção. Biotecnologia.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

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

ABSTRACT

Kombucha is a fermented drink prepared with black or green sugary tea to which the *SCOBY* (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts*) is added, a bacterial cellulose film containing a symbiotic consortium of bacteria and yeasts. Due to the growing search for sustainable polymers, it aimed to isolate a microorganism cellulose-producing present in the *kombucha*. For this, a serial dilution of the *kombucha* was performed and the isolation media were tested: Hestrin Schramm (HS), HS plus Fluconazol® and medium with ethanol and calcium carbonate. The cultivations have grown in BOD at 30 ° C for 24h and the colonies similar to reported in the literature as responsible for cellulose production were selected. Three colonies were isolated and identified by molecular biology methods. Two showed 99.72% similarity to *Pseudozyma aff. pruni* or *Kalmanozyma brasiliensis*, also called *Pseudozyma brasiliensis* (86.62% similarity) and the third colony showed 100% similarity with



Sporidiobolus pararoseus. None of the isolated microorganisms is reported as a cellulose producer, but they have interesting biotechnological characteristics. Despite not having reached the main goal, it was possible to expand the knowledge of molecular techniques, and also it became evident that bioprospecting is an arduous and complex activity due to the diversity of microorganisms in the *kombucha*.

KEYWORDS: Biopolymersy. Biopolymers. Biotechnology.

INTRODUÇÃO

A celulose é um polímero formado por repetições de glicose denominadas celobiose, as quais são originadas por ligações do tipo β - 1,4 – glicosídicas. Este polímero é um dos mais abundantes na natureza, podendo ser proveniente de inúmeras fontes, como as de origem vegetal ou até mesmo microbiana (DONINI et. al., 2010).

Atualmente, a grande maioria dos produtos à base de celulose são de origem vegetal, dessa maneira tem-se buscado alternativas para sua produção por vias microbianas, uma vez que quimicamente o polímero advindo de ambas as fontes são similares, divergindo apenas no grau de polimerização. Com relação às características da celulose bacteriana esta é composta por uma rede de finas fibrilas, cristalina, com maior teor de pureza em comparação à vegetal, uma vez que esta é livre de hemicelulose e lignina (VIEIRA, 2013).

Por esta razão, esse biopolímero tem sido estudado devido às suas características mecânicas e de biodegradabilidade, o que acarreta em possíveis aplicações em diferentes áreas como na cosmetologia, nas indústrias têxtil e alimentícia, na purificação de águas residuais, na engenharia de materiais, entre outras (COSTA, BIZ, 2017).

De acordo com a literatura, a *kombucha* é uma bebida fermentada, resultante da ação simbiótica de bactérias acéticas e leveduras depositadas sob uma película celulósica, denominada *SCOBY* (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts*) (DOMENEGHETTI, SCHMIDT, SOARES, 2019). As bactérias acéticas presentes na bebida fermentada são as responsáveis pela formação da película celulósica, sendo as do gênero *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Gluconacetobacter* as mais reconhecidas pela produção de celulose na *kombucha* (SANTOS, 2016).

Portanto, frente à importância do biopolímero em questão, o presente trabalho visou isolar e identificar microrganismo(s) responsável(ais) pela sua formação durante a obtenção de *kombucha*.

MATERIAL E MÉTODO

A cultura simbiótica de bactérias e leveduras (*SCOBY*) foi cedida por uma produtora de *kombucha* caseira da cidade de Toledo/PR à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus de Toledo. Para manutenção do *SCOBY*, empregou-se chá verde e hibisco (10 g/L e 13 g/L, respectivamente) como fonte de fenólicos e o açúcar cristal (47 g/L), como fonte de carbono. O cultivo foi realizado por 14 dias à 28°C em BOD, conforme metodologia descrita por Malbasa et al. (2006).

Inicialmente, como o intuito de isolar o(s) microrganismo(s) produtor(es) de celulose bacteriana, coletou-se uma amostra do chá fermentado de *kombucha* e realizou-se uma diluição prévia de 10^{-1} em solução salina 0,9% (p/v) em um frasco *Erlenmeyer* estéril. Esta amostra foi incubada em agitador orbital à 30°C, 150 rpm por 30 minutos, com o intuito de homogeneizar a mesma e propiciar um meio isotônico (COIMBRA, 2016).

Depois, realizou-se diluição seriada, com solução salina 0,9% (p/v), até 10^{-5} . Então, inoculou-se, em placas de Petri com meio Hestrin Schramm (HS) sólido, 100

μL das diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} , conforme metodologia descrita por Coimbra, (2016). O experimento foi realizado em triplicata, sendo o meio HS constituído por (g/L): glicose (20), peptona bacteriológica (5), extrato de levedura (5), fosfato dissódico (2,7) e ácido cítrico (1,15). Neste caso, para formação de meio sólido, acrescentou-se ágar bacteriológico (15 g/L).

Posteriormente, avaliou-se as colônias obtidas e escolheu-se as mais semelhantes morfológicamente com os microrganismos produtores de celulose segundo referencial teórico. Estas colônias foram estriadas em novas placas de Petri com meio HS sólido, até o isolamento das mesmas.

Deste modo, os microrganismos isolados com características semelhantes aos reportados na literatura foram inoculados em meio HS líquido em BOD a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 dias, com o intuito de avaliar se haveria ou não produção de filme celulósico (JOZALA et al., 2015). Ademais, caso houvesse necessidade, realizar-se-ia repetição deste teste, a fim de confirmar o desenvolvimento de película, assim como sua resistência.

Com base nos resultados obtidos na etapa anterior, realizou-se a extração do DNA dos microrganismos isolados por kit comercial Promega (2019), segundo metodologia recomendada pelo fabricante.

Para reação de PCR, eletroforese e purificação foram seguidas metodologias de acordo com o kit do fabricante Invitrogen (2015), a fim de identificar a região de interesse, purificá-la, sequenciá-la, analisar a região em programa *Bioedit* e identificar o microrganismo por comparação em banco de dados (*Blast*).

Após a caracterização molecular (metodologia descrita anteriormente), verificou-se que não foi possível a correta promoção do isolamento de microrganismos produtores de celulose, então, optou-se em utilizar meios de cultivo alternativos reportados na literatura.

Primeiramente, realizou-se tentativa de isolamento em meio HS contendo 0,01% (m/v) Fluconazol® (antifúngico comercial), conforme reportado por Santos (2016) que em seu estudo explana sobre o isolamento de microrganismo produtor de celulose bacteriana, através de meio HS contendo 0,015% (m/v) de cicloheximida, a qual atua como antifúngico inibindo o crescimento de leveduras. A concentração utilizada de Fluconazol® seguiu especificação do “Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica” segundo a Anvisa (2002).

Paralelamente, executou-se a tentativa de isolamento em meio constituído por (g/L): glicose (30), extrato de levedura (5), peptona (3), carbonato de cálcio (10), 30 mL/L de etanol 95% (v/v) e 15 g/L de ágar bacteriológico. O carbonato de cálcio em conjunto com o etanol auxilia na identificação da produção de ácidos pela formação de halos, uma vez que as bactérias produtoras de celulose são acéticas (SHADE, 2011).

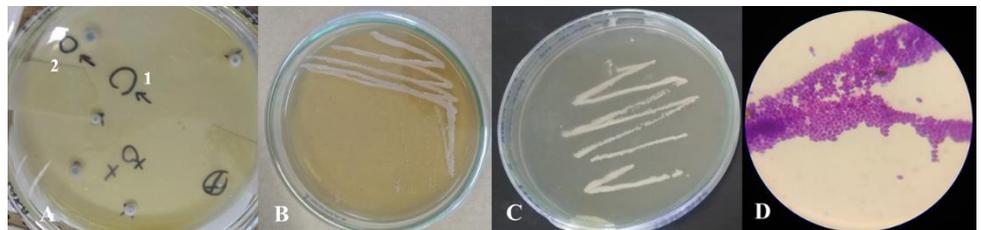
Para os meios alternativos realizou-se a mesma metodologia aplicada ao meio HS, desde a diluição seriada da amostra de *kombucha* até o isolamento do microrganismo.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Após a diluição seriada e inoculação da amostra (*kombucha*) em meio HS, selecionou-se as colônias com similaridade com a literatura e realizou-se esgotamento até obtenção de colônia pura, estriamento e coloração de gram. Essas etapas são demonstradas na Figura 1.

Utilizou-se meio HS como alternativa primária, uma vez que segundo Coimbra (2016) o mesmo induz a produção de celulose, de modo que as bactérias produtoras do polímero utilizam a fonte de carbono juntamente ao ácido cítrico. É reportado na literatura que a biossíntese de celulose é dependente de duas vias anfóblicas: a via das pentoses e o ciclo de Krebs. Dessa maneira, a glicose presente no meio é um açúcar de rápida e fácil assimilação, sendo oxidado na via das pentoses, enquanto o ácido cítrico (ácido orgânico) é oxidado no ciclo de Krebs, sendo que a produção de celulose só ocorrerá na presença de oxigênio, posto este tipo de bactéria só consegue assimilar glicose aerobicamente devido a carência da enzima fosfofrutoquinase-1, tornando a produção do polímero um mecanismo de flotação que as permite estar na interface líquido-ar promovendo seu crescimento. Ademais os outros constituintes são necessários para o metabolismo primário do microorganismo (DONINI, 2010).

Figura 1: Etapas de obtenção de colônias por meio da diluição seriada da *kombucha* esgotamento, estriamento e coloração de gram.



Legenda: A - representa uma das placas de diluição seriada da qual fez-se o estriamento das colônia demarcadas com 1 e 2; B - esgotamento de uma das colônias; C - estriamento de uma das colônia e D coloração gram de um dos microrganismos isolados.

Fonte: Autoria própria (2020).

Buscava-se por bactérias similares as reportadas em literatura, que segundo KADERE et al. (2008) e TOMITA e KONDO (2009), grande parte dos estudos emprega *Gluconacetobacter xylinus*, uma bactéria com forma bacilar (0,5 µm a 1,0 µm por 2,0 µm a 10,0 µm), Gram-negativa e aeróbia estrita (As células podem ser encontradas sozinhas, em pares, em cadeia ou em pequenos aglomerados. Quando móveis têm flagelos peritríquios e sintetizam celulose e acetana (GARRITY, 2005).

Ademais, as bactérias dos gêneros *Acetobacter* e *Komagataeibacter* também são reportadas pela produção de celulose bacteriana, sendo as bactérias acéticas as mais encontradas. Estas também podem se apresentar na forma de bastonetes únicos, em pares ou em cadeia, são estritamente aeróbicas bem como gram-negativas. O crescimento ótimo destas bactérias, ocorre entre 25-30°C (GOMES et al., 2017). Também de acordo os mesmos autores, elas são responsáveis pela degradação do etanol a ácido acético.

Dessa forma, a partir das aparências morfológicas representadas na Figura 1-A, as colônias assinaladas (1 e 2) eram translúcidas, redondas e de aspecto brilhante, características estas reportadas em literatura como microrganismos produtores de celulose (COIMBRA, 2016). Além das colônias apresentadas na Figura 1 foi isolada outra colônia na placa duplicata com os mesmos aspectos, sendo essa denominada colônia 3 (Figura não apresentada).

Também detectou-se que as mesmas eram aglomerados de bastonetes gram-negativos, condizendo com os aspectos esperados, conforme exemplificado na Figura 1-D. Então, prosseguiu-se com teste de produção de película em meio líquido HS, sendo os microrganismos isolados, apresentaram aparentemente a formação de uma fina película. Desse modo, iniciou-se a identificação dos mesmos por técnicas de biologia molecular.

Primeiramente, acreditava-se que as colônias obtidas eram bactérias, devido a todas características visualizadas até o momento, no entanto na reação de amplificação do DNA, constatou-se que as mesmas eram leveduras devido a não pareamento da sequência 16S (específica de bactérias). Dessa maneira, realizou-se amplificação do primer adequado a leveduras (ITS) e, após sequenciamento e alinhamento da sequência utilizando programa *Bioedit* e comparação com o banco de dados no site *Blast*, identificou-se os microrganismos isolados, os quais estão representados na Figura 2.

Figura 2: Microrganismos isolados identificados como 1, 2 e 3.



Fonte: Autoria própria (2020).

Por meio da comparação, identificou-se que o microrganismo 1 possuía 99,72 % de semelhança com *Pseudozyma aff. pruni*, que segundo banco de dados Blast foi isolada por Ribeiro (2009) em sua tese sobre a diversidade de leveduras no manejo da cana-de-açúcar; e 86,62 % com a levedura *Kalmanozyma brasiliensis* ou *Pseudozyma brasiliensis*, a qual já foi registrada no banco de dados por diversos autores.

De acordo com Liou et al. (2009) a *P. pruni* é observada em placa como colônia irregular, enrugada, gelatinosa, alaranjadas ou branca pálidas, com células elipsoidais, cilíndricas ou fusiformes, sendo essas características semelhantes ao microrganismo isolado no presente estudo (Figura 3 - microrganismo 1). Já as características reportadas em relação à *P. brasiliensis* referem-se à mesma ser produtora de bioetanol a partir da degradação de xilose, o que torna a mesma bastante interessante no emprego para degradação de materiais lignocelulósicos

e produção deste biocombustível, assim como para obtenção de xilanases (enzimas que degradam a xilose) (SANTOS, 2018).

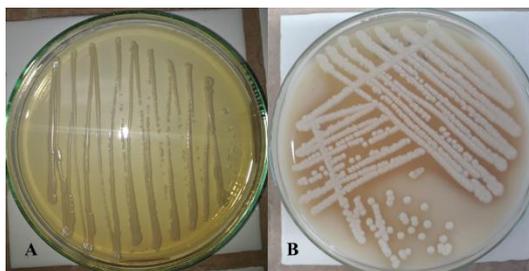
Com relação ao segundo microrganismo isolado (Figura 3 - microrganismo 2), verificou-se o mesmo resultado que o microrganismo 1, concluindo-se que os dois se tratavam da mesma espécie.

O terceiro microrganismo (Figura 2 - microrganismo 3), apresentou 100% de semelhança com o *Sporidiobolus pararoseus*. Levedura esta, que segundo Borba et al. (2018), possui coloração vermelha, característica detectada na levedura isolada no presente trabalho, e produtora de caratenóides, sendo explorada para produção destes pigmentos em meio de cultivos alternativos como: melação de cana-de-açúcar e resíduos da colheita de milho.

A fim de se verificar novamente a formação do “biofilme”, um novo cultivo foi realizado e verificou-se que a fina camada formada em meio líquido não eram películas de celulose e sim células flotadas, visto que ao serem agitadas rapidamente as películas se rompiam e aderiam a parede do Erlenmeyer, o que não ocorreria se as mesmas fossem filmes celulósicos, já que os mesmo possuem resistência mecânica (COIMBRA, 2016).

Posteriormente, realizou-se outras tentativas de isolamento a primeira em meio contendo Fluconazol® e outra em meio contendo carbonato de cálcio, sendo os resultados obtidos exemplificados na Figura 3. Entretanto, nenhuma delas apresentou crescimento de película quando cultivados em meio líquido.

Figura 3: A – microrganismo isolado em meio HS e Fluconazol®; B – microrganismo isolado em meio contendo carbonato de cálcio na qual pode-se observar a formação de halo.



Fonte: Autoria própria (2020).

Diante do exposto, verificou-se que a bioprospecção de um microrganismo de interesse é uma atividade complexa, posto que a microbiota presente na *kombucha* é extremamente diversa possuindo bactérias e leveduras, sendo os gêneros de levedura predominantes: *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida*, *Torulospora*, *Kloeckera/Hanseniaspora*, *Pichia*, *Torula*, *Torulopsis*, *Mycotorulae*, *Mycoderma*; e bactérias majoritariamente acéticas: *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Gluconacetobacter*, bem como já foram reportadas a presença de *A. xylinoides*, *A. pasteurianus*, *A. aceti*, *Bacterium gluconicum*, *Gluconobacter oxydans* (SANTOS, 2016), tornando a possibilidade de isolamento estaticamente dificultada, conforme pode ser observado no presente trabalho.

Apesar de objetivo de isolamento de microrganismo produtor de celulose não ter sido alcançado foi possível ter conhecimento da quantidade diversificada dos mesmos na amostra de *kombucha*. Além disto, os experimentos possibilitaram a expansão do conhecimento, principalmente com relação às técnicas de microbiologia e biologia molecular envolvidas, além do isolamento de leveduras com características interessantes na área de biotecnologia.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que o isolamento de um microrganismo em específico é um trabalho árduo e complexo, uma vez que a microbiota presente em uma amostra é diversa, o que pode tornar as estratégias de prospecção reduzidamente eficazes, uma vez que diferentes tipos de microrganismos podem se enquadrar nos testes preliminares, sendo os métodos moleculares mais eficazes para identificação dos microrganismos. No presente estudo, foi possível o isolamento de *Pseudozyma aff. pruni*, *Kalmanozyma brasiliensis* ou *Pseudozyma brasiliensis* e *Sporidiobolus pararoseus* a partir de amostras de *kombucha*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Toledo pela toda infraestrutura disponibilizada. E ao professor Tiago Cintra Maniglia pela ajuda na identificação genética dos microrganismos e por todo conhecimento transmitido.

REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada – M27A2, v.17, n.15, p.51, 2002. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicos/audite/manuais/clsi/clsi_OPAS1M27-A2. Acesso em: 01 abril 2020.

BORBA, C. M.; TAVARES, M. das N.; MORAES, C. C.; BURKERT, J. F. de M. Carotenoid production by *Sporidiobolus pararoseus* in agroindustrial medium: optimization of culture conditions in shake flasks and scale-up in a stirred tank fermenter. *Braz. J. Chem. Eng.*, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 509-520, 2018. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66322018000200509&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 17 fev. 2020. Doi:10.1590/0104-6632.20180352s20160545.

COIMBRA, C. G. de O. Produção de celulose bacteriana por *Gluconacetobacter xylinus* e elaboração de filmes comestíveis. 2016. 139f. Tese (Doutorado em Biotecnologia RENORBIO) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

COSTA, P. Z. R. da; BIZ, Pedro. Cultivando materiais: o uso da celulose bacteriana no design de produtos. In: SIMPÓSIO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESIGN DA ESCOLA SUPERIOR DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL - SPGD, 3., 2017, Rio de Janeiro. Anais [...]. Rio de Janeiro, 2017, p. 1-12.

DOMENEGHETTI, P. A.; SCHMIDT, V. C. R.; SOARES, M. G. Caracterização de scoby do *kombucha* para a produção de biofilmes. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 13., 2019, Minas Gerais. Resumos [...]. Minas Gerias, 2019, p.840-846.

DONINI, Í. A.; SALVI, D. T. B. de; FUKUMOTO, F. K.; LUSTRI, W. R.; BARUD, H. S.; MARCHETTO, R.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. Revista Eclética Química, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 165-178, 2010. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-46702010000400021&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 26 jan. 2020.

GARRITY, G. M. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2 ed, v 2. United States of America: Springer. 2005.

GOMES, R. J.; ANDRADE, T. N.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H.; SPINOSA, W. A. Isolamento de Bactérias Acéticas a Partir de Vinagres e Avaliação do Potencial de Síntese de Celulose Bacteriana. In: Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia – SIMBBTEC, 2017, Londrina, Anais...Londrina, 2017, p. 1-15.

KADERE, T. T.; MIYAMOTO, T.; ONIANG`O, R. K.; KUTIMA, P. M.; NJOROGI, S. M. Isolation and identification of the genera *Acetobacter* and *Gluconobacter* in coconut toddy (mnazi). African Journal of Biotechnology, v. 7, n. 16, p. 2963-2971, 2008.

MALBASA, R.V; LONCAR, E.S; DJURIC, M.; KLASNJA, M.; KORALOV, L. J.; MARKOV, S. Sacale-up of Black Tea Batch Fermentation. Food and Bioproducts. 84, 193-199, 2006.

INVITROGEN. PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit, Thermo Fisher, p.1-4, 2015. Disponível em: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0014332_PureLinkMicrobiome_CultureMedia_UG.pdf. Acesso em: 26 jan. 2020.

JOZALA, A. F.; PÉRTILE, R. A. N.; SANTOS, C. A. dos.; EBINUMA, V. de C. S.; SECKLER, M. M.; GAMA, F. M.; PESSOA Jr. A. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media. Appl Microbiol Biotechnol, v. 99, p. 1181–1190, 2015. Doi: 10.1007/s00253-014-6232-3.

LIOU, Guey-Yuh; WEI, Yu-Hui, LIN, Shie-Jea; LEE, Chiou-Yen Wenand Fwu-Ling. *Pseudozyma pruni* sp. nov., a novel ustilaginomycetous anamorphic fungus from flowers in Taiwan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 23, p. 1813-1817, 2009. Doi: 10.1099/ijms.0.007765-0.

PROMEGA. Wizard genomic DNA purification kit: Instructions for Use of Products, Madison, p. 1-19, 2019. Disponível em: <https://ita.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol.pdf>. Acesso em: 26 jan. 2020.

SANTOS, M. J. dos. *Kombucha*: Caracterização da microbiota e desenvolvimento de novos produtos alimentares para uso em restauração. 2016. 119f. Dissertação (Mestrado em Ciências Gastronômicas) - Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

SANTOS, R. A. C. dos. Análise genômica da levedura xilanolítica *Pseudozyma brasiliensis* GHG001. 2018. 154f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2018.

SHADE, A. *The Kombucha Biofilm: a Model System for Microbial Ecology*. Marine Biological Laboratories, Woods Hole, MA, 2011.

TOMITA, Y.; KONDO, T. Influential factors to enhance the moving rate of *Acetobacter xylinum* due to its nanofiber secretion on oriented templates. *Carbohydrate Polymers*, v. 77, p. 754–759, 2009.

VIEIRA, D. C. M. Produção de biofilme (membrana de celulose) por *Glucanoacetobacter xylinus* em meio de resíduos de frutas e chá verde. 2013. 177f. Tese (Doutorado em Fermentações) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

ZHANG, W.; WANG, X.; QI, X.; REN, L.; QIANG, T. Isolation and identification of a bacterial cellulose synthesizing strain from *kombucha* in different conditions: *Gluconacetobacter xylinus* ZHCJ618. *Revista Food Science and Biotechnology*, v. 27, n.3, p. 705–713, 2018. Doi:10.1007/s10068-018-0303-7.