

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MINAS GERAIS - *CAMPUS*

BAMBUÍ

BACHARELADO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Alice Geovana Silveira Barreiros

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS MICRORGANISMOS DA
KOMBUCHA**

ALICE GEOVANA SILVEIRA BARREIROS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS MICRORGANISMOS DA
KOMBUCHA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso Bacharelado em Engenharia de Alimentos do Instituto Federal de Minas Gerais - *Campus* Bambuí para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Alimentos.
Orientadora: Dr^a Rafaela Corrêa Pereira.

Catálogo na Fonte Biblioteca IFMG - *Campus Bambuí*

B271a Barreiros, Alice Geovana Silveira

Avaliação do potencial biotecnológico dos microrganismos da kombucha [manuscrito] / Alice Geovana Silveira Barreiros – 2025.

47 f. : il.

Orientadora: Rafaela Correa Pereira.

Coorientadora: Clara Suprani Marques.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais. *Campus Bambuí*, 2025.

1. Produção enzimática. 2. Kombucha. 3. Lipase. 4. Protease. 5. Amilase. I. Pereira, Rafaela Correa. II. Marques, Clara Suprani. III. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – *Campus Bambuí*. IV. Título.

CDD 660.62

Catálogo: João Batista Rodrigues - CRB-6/2022



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MINAS GERAIS

Campus Bambuí
Diretoria de Ensino

Departamento de Ciências Agrárias

Faz. Varginha - Rodovia Bambuí/Medeiros - Km 05 - Caixa Postal 05 - CEP 38900-000 - Bambuí - MG 37
3431 4900 - www.ifmg.edu.br

Alice Geovana Silveira Barreiros

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS MICRORGANISMOS DA
KOMBUCHA

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso Bacharelado em Engenharia de Alimentos do Instituto Federal de Minas Gerais - *Campus* Bambuí para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Aprovado em: 27/02/2025 pela banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Rafaela Corrêa Pereira (Orientadora) - IFMG *Campus* Bambuí

Prof^a. Dr^a. Clara Suprani Marques (Co-orientadora) - IFMG

Prof. Me. Jonas Guimarães e Silva - IFMG *Campus* Bambuí

Prof^a. Dr^a. Lairy Silva Coutinho - IFMG *Campus* Bambuí

Bambuí, 26 de fevereiro de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **Rafaela Correa Pereira, Professora**, em 27/02/2025, às 09:52, conforme Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Clara Suprani Marques, Usuário Externo**, em 27/02/2025, às 09:55, conforme Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Lairy Silva Coutinho, Professora EBTT**, em 27/02/2025, às 10:02, conforme Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Jonas Guimaraes E Silva , Professor**, em 27/02/2025, às 10:08, conforme Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.ifmg.edu.br/consultadocs> informando o código verificador **2215126** e o código CRC **BE7340D4**.

23209.002892/2024-28

2215126v1

Dedico à minha mãe, ao meu pai e ao meu irmão, por serem meu porto seguro, minha força e minha maior inspiração em cada passo desta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar realizando este trabalho e por nunca ter me abandonado. Com a honra e glória Dele consegui chegar até aqui.

Aos meus pais, Leonardo e Liliane, não há palavras que possam expressar o quanto sou grata por tudo o que fizeram por mim. Cada conquista minha carrega um pedaço de vocês, que sempre estiveram ao meu lado, acreditando em mim. O meu mais profundo e sincero obrigado. Sonho com o dia em que poderei retribuir, mesmo que de forma pequena, todo o amor, o apoio e os sacrifícios que vocês me deram. Cada gesto de carinho, cada palavra de sabedoria nos momentos de desânimo, cada ajuda para que eu jamais me sentisse sozinha nessa jornada, foram fundamentais para eu chegar até aqui. O colo de vocês, sempre acolhedor e reconfortante, foi o alicerce que me sustentou em cada passo.

Ao meu irmão Arthur, mesmo com à distância, você sempre esteve presente de forma tão especial. Com suas conversas leves e descontraídas e seus puxões de orelha (que sei que foram feitos com muito amor), você cumpriu com maestria o papel de irmão mais velho. Sou imensamente grata por todos os momentos de companhia e apoio que você me proporcionou.

À minha avó materna, Marlene, minha eterna gratidão por sempre estar ao meu lado com tanto amor e carinho. Agradeço por todas as histórias sobre sua graduação, que me encantavam e me inspiravam a seguir em frente. Seu exemplo de dedicação e força sempre foi uma luz em minha jornada e cada palavra sua foi um incentivo precioso para que eu não desistisse.

À minha avó paterna, Dirce, meu agradecimento eterno por sempre estar ao meu lado, pelos gestos de carinho e apoio. Sempre se fazendo presente com o icônico "Bom dia a todos nós, princesa", que sempre arrancava boas risadas e aquecia meu coração.

Aos amigos que já estavam ao meu lado, mesmo à distância, e que de tantas formas se fizeram presentes e aos novos amigos que conquistei durante essa jornada, minha imensa gratidão. A todos aqueles que tornaram esse processo mais leve, especialmente às amigas que foram minhas verdadeiras sessões de terapia gratuitas, prontas para ouvir e me apoiar sempre que precisei desabafar, além de estarem torcendo por mim a cada passo dessa longa caminhada.

Agradeço à minha orientadora, professora Doutora Rafaela Corrêa Pereira, por todos os ensinamentos dentro e fora de sala de aula e por todo o auxílio na escrita deste trabalho.

À minha co-orientadora, professora Doutora Clara Suprani Marques, por me auxiliar tanto na parte experimental quanto na escrita deste trabalho, agradeço-lhe também por todas as conversas, ensinamentos dentro e fora de sala e por ter aceitado entrar de cabeça comigo nessa aventura quando os momentos não eram os mais favoráveis.

Agradeço aos responsáveis pelo laboratório de microbiologia por todo auxílio e disponibilidade do local.

Meu sincero obrigado a todos que, de alguma maneira, contribuíram e estiveram ao meu lado. Este trabalho também é de vocês.

“A felicidade pode ser encontrada mesmo nas horas mais sombrias, se a pessoa se lembrar de acender a luz.”

Alvo Dumbledore, Harry Potter e o Prisioneiro de Azkaban

RESUMO

O uso de enzimas em processos industriais tem crescido de forma expressiva e contínua, impulsionando a demanda por novas cepas microbianas com potencial biotecnológico. A busca por microrganismos produtores de enzimas abrange diversas fontes naturais, dentre as quais se destaca a kombucha, uma bebida fermentada amplamente apreciada por consumidores que buscam alternativas mais saudáveis, livres de aditivos químicos e nutricionalmente enriquecidas. Este estudo teve como objetivo o isolamento e cultivo de bactérias acéticas e outros microrganismos presentes na kombucha, bem como a avaliação de seu potencial enzimático para a produção de amilases, proteases e lipases. Os resultados demonstraram atividade amilolítica, evidenciada pela formação de halos de degradação do amido. No entanto, apesar do crescimento microbiano, não foram observados halos de proteólise e lipólise, indicando ausência de atividade proteolítica e lipolítica nas condições experimentais adotadas. A incapacidade de degradação da lipase e da protease pode estar relacionada à ausência de genes codificadores de lipases e proteases extracelulares ou à inadequação das condições ambientais para sua expressão. Dessa forma, conclui-se que as bactérias isoladas possuem a capacidade de degradar amido, mas não demonstram eficiência na degradação de lipídeos e proteínas nas condições avaliadas.

Palavras-chave: Produção Enzimática. Kombucha. Lipase. Protease. Amilase. Bactérias Acéticas

ABSTRACT

The use of enzymes in industrial processes has been growing significantly and continuously, driving the demand for new microbial strains with biotechnological potential. The search for enzyme-producing microorganisms encompasses various natural sources, among which kombucha stands out as a widely appreciated fermented beverage among consumers seeking healthier alternatives, free of chemical additives, and nutritionally enriched. This study aimed to isolate and cultivate acetic acid bacteria and other microorganisms present in kombucha, as well as to evaluate their enzymatic potential for the production of amylases, proteases, and lipases. The results demonstrated amylolytic activity, evidenced by the formation of starch degradation halos. However, despite microbial growth, no proteolysis or lipolysis halos were observed, indicating the absence of proteolytic and lipolytic activity under the experimental conditions adopted. The inability to degrade lipase and protease may be related to the absence of genes encoding extracellular lipases and proteases or to inadequate environmental conditions for their expression. Thus, it is concluded that the isolated bacteria can degrade starch but do not efficiently degrade lipids and proteins under the evaluated conditions.

Keywords: Enzyme Production. Kombucha. Lipase. Protease. Amylase. Acetic Acid Bacteria.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Objetivos.....	13
1.1.1 Objetivo Geral.....	13
1.1.2 Objetivos Específicos.....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 Fermentação: Contexto Histórico.....	15
2.2 Enzimas.....	15
2.2.1 Produção industrial de enzimas:.....	17
2.3 Aplicação das enzimas na indústria alimentícia.....	18
2.3.1 Protease.....	19
2.3.2 Amilase.....	20
2.3.3 Lipase.....	20
2.4 Formas de obtenção enzimática.....	21
2.4.1 <i>Isolamento de microrganismos</i>	25
2.4.2 <i>Kombucha</i>	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 Materiais.....	27
3.2 Métodos.....	29
3.2.1 Isolamento dos microrganismos do SCOBY de kombucha.....	29
3.2.2 Preparo dos inóculos para bioprospecção.....	30
3.2.3 Investigação da produção de amilase.....	30
3.2.4 Investigação da produção de protease.....	31
3.2.5 Investigação da produção de lipase.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1. Características Morfológicas.....	33
4.2. Contagem das colônias.....	34
4.3. Isolamento dos microrganismos.....	35
4.4. Coloração de Gram.....	36

4.5. Investigação de produção enzimática.....	37
5. CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

As enzimas atuam como catalisadores de reações químicas. Elas são provenientes de fontes vegetais, animais e microbiana, sendo a obtenção por produção microbiana a mais desejável, tendo em vista maiores vantagens em comparação às demais, como: maior rendimento em menor tempo, menor volume residual, produção independente de questões sazonais, opção de obter o substrato, oriundo de resíduos agroindustriais, destinado à produção das enzimas, além da possibilidade de produção por processos fermentativos em grande escala, de forma constante e padronizada, com requisitos nutricionais simplificados.

Entre as principais enzimas de interesse para as indústrias, destacam-se as amilases, proteases, celulasas e lipases, as quais são amplamente empregadas em vários setores industriais, como na indústria de alimentos, têxtil, de cosméticos, de bebidas, farmacêutica, dentre outras. A indústria alimentícia é a maior empregadora de enzimas industriais, utilizando mais de 50% de sua produção, aplicando-as na busca por melhorias no processo de produção e outros componentes relacionados, como sabor, aroma, cor, textura, aparência, vida de prateleira e valor nutritivo.

Devido ao extenso e gradativo uso de enzimas nos processos industriais, ocorreu o aumento significativo da demanda por novas cepas microbianas produtoras. O isolamento dessas novas cepas produtoras de enzimas abrange a exploração de diversas fontes, sendo uma delas a kombucha.

A kombucha é uma bebida produzida pela fermentação de chá adoçado (tradicionalmente chá verde ou preto) por uma simbiose de bactérias e leveduras que produzem uma camada de celulose, o SCOBY (cultura simbiótica de bactérias e leveduras, do inglês *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*).

O crescente interesse no consumo de kombucha é baseado na tendência dos consumidores pela procura de um estilo de vida mais saudável, tendo como preferência produtos minimamente processados, sem aditivos químicos e com alto valor nutricional. Atendendo a esses requisitos, o chá de Kombucha apresenta-se como uma bebida gaseificada refrescante, natural, probiótica, semelhante a um espumante, rico em bactérias acéticas e leveduras, responsáveis pela fermentação e gaseificação natural da bebida.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial biotecnológico dos microrganismos presentes na kombucha.

1.1.2 *Objetivos Específicos*

- a) Cultivo e isolamento de microrganismos do kombucha;
- b) Investigação do potencial das bactérias isoladas em produzir amilases;
- c) Investigação do potencial das bactérias isoladas em produzir proteases;
- d) Investigação do potencial das bactérias isoladas em produzir lipases.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fermentação: Contexto Histórico

A fermentação é tão antiga quanto a civilização humana na Terra e foi aprimorada, como processo, por sociedades da antiguidade, para a conservação de alimentos durante as sazonalidades, com o intuito de melhorar a qualidade sensorial dos alimentos (HAN *et al.*, 2021).

Seus benefícios, que são conhecidos desde a era pré-histórica, foram descobertos por um acaso. A contaminação das matérias-primas in natura eram ocorrências cotidianas. Na ocasião, teria ocorrido um desfecho mais favorável advindo da ação dos homens ao armazenarem leite no estômago de animais, verificando assim que esse armazenamento resultava na transformação do leite em queijo, isso era resultado da ação da renina, uma enzima que existe no estômago e alguns animais. Com o passar do tempo, houve relatos da utilização da fermentação para a produção de vinhos e cervejas, usufruindo das enzimas que estão presentes naturalmente na uva e na cevada, respectivamente, ou em microrganismos que compõem a sua microbiota (MOLINA *et al.*, 2013). Essa técnica milenar difundida entre as diversas culturas, além de modificar as características físico-químicas dos alimentos, ocasionando uma maior conservação, promove também a produção de compostos que beneficiam a saúde (STREDA; SEVERO, 2024).

Ainda que já se conhecesse os efeitos benéficos da fermentação há milhares de anos, no caso dos balcânicos em relação ao iogurte e dos chineses em relação à kombucha, por exemplo, só foi possível a comparação científica referente às propriedades funcionais de alimentos fermentados após o aperfeiçoamento de novos métodos de pesquisa sobre a microbiota e os metabólitos resultantes do processo fermentativo (MARTIN; LINDNER, 2022).

2.2 Enzimas

As enzimas, na maioria das vezes, são cadeias proteicas formadas por aminoácidos, tendo potencial catalítico para inúmeros tipos de reação. Esse potencial catalítico é responsável por aumentar a velocidade das reações químicas que ocorrem nas células e no organismo, sem que sofra alterações (KRUGER *et al.*, 1982). Os reagentes que participam dessas reações são denominados substratos, podendo variar de acordo com a enzima, que possui seu caráter específico. Com isso, ao atuar sobre um determinado

substrato, ele é convertido em um determinado produto (TAIPA; GAMA, 2003). Em contrapartida, as proteínas não são as únicas substâncias com propriedades catalíticas nos sistemas biológicos. Existem também as ribozimas, moléculas de ácido ribonucleico (RNA), compostas por cadeia de carboidrato, formada pelo monossacarídeo ribose, que também catalisam algumas reações fundamentais para os seres vivos (KRUGER *et al*, 1982).

Mota (2011) afirma que, para ser classificada como uma enzima, a proteína deve apresentar as seguintes condições:

- a) Apresentar eficiência catalítica;
- b) Demonstrar alto grau de especificidade em relação aos seus substratos e seus produtos;
- c) Acelerar a velocidade das reações de 10^6 a 10^{12} vezes em relação às reações não catalisadas;
- d) Ao participar da atividade catalítica, a proteína não pode ser consumida ou alterada;
- e) Sua atividade metabólica deve ser regulada geneticamente ou a partir das condições metabólicas.

As enzimas são classificadas pela União Internacional de Bioquímica (IUB) em seis classes: (I) oxidorreduções, (II) transferases, (III) hidrolases, (IV) liases, (V) isomerases e (VI) ligases. Cada uma das classes apresenta critérios específicos. As oxidorreduções agrupam as enzimas que catalisam reações de oxi-redução por meio da transferência de elétrons, enquadrando-se nessa classe as desidrogenases, redutases e as oxidases. As transferases são enzimas que catalisam reações de transferência de grupos funcionais, como grupos amina, quinases, fosfato etc. As hidrolases são enzimas que catalisam reações de hidrólise de ligação covalente, como ocorre nas peptidases. As liases são enzimas que catalisam a quebra de ligações covalentes e dispõe de moléculas de água, amônia e gás carbônico, como por exemplo as desidratases e as descarboxilases. As isomerases são aquelas que catalisam reações de interconversão entre isômeros ópticos ou geométricos, como as epimerases. Por fim, as ligases classificam-se como as enzimas que catalisam, à custa de energia (ATP), reações de formação de novas moléculas, a partir da ligação entre duas já existentes (FORGIARINI, 2006).

A estrutura primária das proteínas é caracterizada por ligações peptídicas que unem as cadeias lineares de aminoácidos. Ao considerar apenas essa estrutura primária, a molécula deveria ser muito fina e extensa. Entretanto, a maioria das enzimas apresenta uma forma globosa ao contrário de uma fina fita linear, enfatizando estruturas de ordem

superior, conhecidas como estruturas secundária, terciária e quaternária, que acontecem devido aos blocos constituintes da molécula interagirem entre si, de forma intrínseca (BARRETT, 2001). A estrutura secundária de uma proteína caracteriza-se pela formação de alfa hélices e folhas beta, que são conformações resultantes das interações mencionadas acima. Somente esta estrutura adicional explica como uma molécula de proteína pode ser tão compacta (LEHNINGER *et al.*, 2014). Na estrutura terciária, a proteína está enovelada de forma complexa e irregular, resultando na formação de um prisma compacto, triangular, podendo ser também, na minoria das vezes, achatado (LEWIN, 2000). A repetição das cadeias polipeptídicas, na construção de uma macromolécula de proteína, caracteriza a estrutura quaternária que esta pode assumir (DIXON & WEBB 1964).

Em relação à atividade catalítica das enzimas, existem condições destacadas por Lopes e outros (2022), com o objetivo de otimizá-la ao máximo. São elas:

- f) Temperatura ideal: Com a elevação da temperatura, a reação acontece de forma mais rápida, resultado de uma maior vibração de moléculas reagentes, que favorece o encontro das enzimas com o substrato. Em contrapartida, temperaturas muito elevadas podem prejudicar a estrutura tridimensional da enzima, conseqüentemente, prejudicando sua atividade enzimática.
- g) pH ideal: Sabendo que as enzimas são formadas por aminoácidos, mudanças no pH podem resultar na ionização de cadeias laterais dos aminoácidos e na constituição de cargas momentâneas, que afetam a configuração das proteínas, afetando diretamente sua atividade catalítica. Cada enzima possui um valor de pH ótimo.
- h) Cofatores: A maioria das enzimas necessita de outras moléculas não proteicas para que sua atividade catalítica seja realizada. Algumas vezes, essas outras moléculas podem aumentar sua atividade enzimática.
- i) Inibidores: Os inibidores são compostos que possuem a capacidade de inibição da ação catalítica de algumas enzimas. Podem agir, influenciando indiretamente ou diretamente o sítio ativo. Essa inibição pode ser reversível ou irreversível.

2.2.1 Produção industrial de enzimas:

As enzimas têm valor comercial, pois apresentam uma vasta área de aplicações em diversos setores industriais, como nas indústrias de alimentos, detergentes, têxteis,

farmacêuticas, cosméticos, diagnósticos e química fina. Seu uso em processos industriais vem sendo sugerido com ênfase, devido ao fato de os processos enzimáticos não serem tóxicos, o que consequentemente diminui o impacto ambiental. Além disso, a utilização das enzimas apresenta como vantagens: economia de água, energia, produtos químicos e redução do custo no tratamento de efluentes (SANTOS *et al.*, 2017).

O mercado de enzimas para biotecnologia e diagnóstico tem liderado o crescimento, uma vez que sua aplicação reduz custos de sequenciamento de DNA, nos últimos anos. A demanda da indústria de bebidas, alimentos e indústria de ração animal por enzimas para aplicação em seus processos produtivos, tem impulsionado mercados emergentes (DAMASCENO, 2016).

Segundo Santos e outros (2017), o Brasil corresponde em torno de 60% do consumo total de enzimas na América Latina, mas, ainda sim, importando (86%) muito mais do que exportando (14%). Isso evidencia um atraso nas tecnologias referentes à produção nacional de biocatalisadores e, simultaneamente, salienta que a expansão da biocatálise é particularmente relevante para o país, não apenas pelo tamanho do mercado interno para esse setor, que é bastante promissor, mas também pela existência do conhecimento suficiente das tecnologias para a produção de enzimas em larga escala, por processos fermentativos e extrativos, assim como a maior biodiversidade do planeta como fonte de biocatalisadores.

Atualmente, aproximadamente 60% das enzimas industriais são produzidas por fungos filamentosos, 24% por bactérias, 4% por leveduras e 10% por animais e plantas (RAVEENDRAN *et al.*, 2018). A indústria alimentícia é a maior empregadora das enzimas industriais, utilizando mais de 50% de sua produção em seus processos. (SINGH; SINGH; SACHAN, 2019). Em 2019, o mercado mundial de enzimas industriais foi estimado em US\$2,4 bilhões, podendo chegar a US\$3,2 bilhões em 2025 (ZHANG *et al.*, 2021; BAPTISTE, 2020).

2.3 Aplicação das enzimas na indústria alimentícia

O uso das enzimas na indústria alimentícia é vasto considerando que sempre está envolvido na busca por melhorias no processo de produção e outros componentes relacionados, como sabor, aroma, cor, textura, aparência, vida de prateleira, valor nutritivo etc (SRIVASTAVA, 2019). Uma vez que as matérias-primas alimentares são, em sua maior parte, tecidos de plantas ou animais, as enzimas além de serem um componente de extrema importância dos alimentos, estão, de modo direto, envolvidas com esses processos.

Elas geralmente preservam suas funções catalíticas mesmo depois que a homeostase dos tecidos é perdida (abate animal ou colheita de vegetais por exemplo), resultando em consequências positivas para a indústria (VITOLLO, 2021). As enzimas são utilizadas principalmente em laticínios, panificação e bebidas como sucos de frutas, vinho e cerveja (GUERRAND, 2017).

Diante da ampla aplicação e da geração de resultados positivos referentes à aplicação das enzimas, surge a possibilidade dessa aplicação acontecer de forma intencional para a modificação dos alimentos nas indústrias. E, com o surgimento da biotecnologia moderna – interferindo de forma positiva através da diminuição de custos, otimização de processos e na melhoria de ingredientes e produtos, bem como seu valor nutricional, sua funcionalidade e suas propriedades sensoriais, benefícios estes que estão ligados ao emprego de enzimas, ao desenvolvimento de culturas *starter* e novos biocatalisadores melhorados geneticamente – fez-se possível a produção de enzimas de maneira mais econômica, somada à possibilidade da produção de enzimas que, até mesmo em condições extremas de temperatura e pH, conseguem executar suas atividades enzimáticas (MOLINA *et al.*, 2013).

Sabendo que as enzimas são imprescindíveis para a obtenção de produtos e ingredientes diversos no setor alimentício, as enzimas microbianas que possuem maior aplicação nesse setor são as proteases (40%), seguidas das amilases, celulasas e lipases (CARVALHO, 2020).

2.3.1 Protease

A protease possui a capacidade de catalisar a hidrólise de ligações peptídicas em proteínas e peptídeos (PARKIN, 2017). Do ponto de vista comercial, as proteases representam um dos grupos enzimáticos de maior importância, equivalente a 60% do total das enzimas industriais e 40% das vendas globais de enzimas (DENTI, 2021).

Segundo Aguilar e Sato (2018), as enzimas proteases pertencem ao grupo 3 das hidrolases e ao subgrupo 4, hidrólises de ligações peptídicas. Sua classificação é baseada em sua fonte de isolamento (vegetal, animal ou microbiana), sua ação catalítica (endo- ou exopeptidase), referente também ao seu tamanho molecular e a especificidade do substrato.

Elas executam importantes atividades, controlando uma variedade de processos extracelulares em plantas e animais, como é o caso da germinação, resposta a estímulos ambientais, senescência, entre outros (RAZZAQ *et al.*, 2019.)

As proteases possuem uma vasta área de aplicação na indústria alimentícia, com o intuito de buscar a melhoria do valor nutricional dos alimentos, como também de serem

amplamente aplicadas dentro do processo de produção de bebidas, também na panificação, no amaciamento de carnes e como coagulantes de proteínas na indústria de laticínios para a fabricação de queijos (AFSHARNEZHAD; SHAHANGIAN; SARIRI, 2018).

Como exemplo da utilização da protease na indústria alimentícia, Tomaz (2023) cita a aplicação da enzima papaína, enzima essa de origem vegetal, extraída do látex do mamão, que possui 35 °C como temperatura ótima de ação catalítica, apresentando uma faixa de pH ideal entre 5 e 7, sendo desnaturada em temperaturas entre 80-90 °C e tendo sua atividade pouco afetada em baixas temperaturas. Ela é utilizada na indústria de carnes com a finalidade do amaciamento de carnes, resultado da hidrólise de proteínas que compõem o tecido microfibrilar e conjuntivo, ocasionando em alterações na textura dos produtos.

2.3.2 Amilase

Segundo Vitolo (2021), as amilases são enzimas que degradam o amido e são encontradas com abundância na natureza. Elas têm atuação direta sobre polissacarídeos que têm ligações glicosídicas do tipo α -1,4. Elas são classificadas em função da forma de atuação nas ligações polissacarídicas: α -amilase, β -amilase e γ -amilase (GRIEBELER *et al.*, 2015).

As amilases são enzimas de extrema importância na indústria alimentícia, pois são comumente usadas na produção de cervejas e outras bebidas que têm sua preparação a partir de açúcares oriundos do milho. Comercialmente, são empregadas em processos fermentativos, utilizadas em variados processos como a hidrólise do milho, obtenção de xarope de milho com alto teor de frutose, maltodextrinas e outros (BACKES *et al.*, 2022).

Françoso (2013) exemplifica a aplicação da amilase com uso específico para a remoção do amido no caldo de cana-de-açúcar. Elas hidrolisam os polímeros em compostos de menor peso molecular e eliminam seus impactos negativos no processo e no produto final, resultando na diminuição da viscosidade, no aumento do rendimento e da qualidade do açúcar produzido. A remoção do amido no processamento de cana-de-açúcar aumenta a capacidade, o volume e a qualidade de produção.

2.3.3 Lipase

Segundo Salgado, Santos e Vanetti (2021), as lipases são enzimas hidrolíticas que estão inseridas no grupo das serinas hidrolases, que catalisam a hidrólise de ligação éster-carboxílicas. Preferencialmente, elas hidrolisam substratos com ácidos graxos de cadeia

longa com mais de 10 carbonos, porém, existe a possibilidade de hidrolisar ácidos graxos de cadeia curta e intermediária.

São classificadas de acordo com a sua especificidade, totalizando quatro tipos principais, sendo eles: enantiosseletiva, que é a distinção de enantiômeros em uma mistura racêmica; substrato específico, em que a lipase age de forma seletiva sobre um substrato específico em uma mistura de materiais, facilitando a síntese do produto de interesse; a regioseletiva, sendo a lipase dividida em 1,3 regiões específicas (hidrolisam os ácidos graxos das posições 1 e 3 dos triacilgliceróis, mas não hidrolisam ligações éster em posições secundárias) e 2 regiões específicas (liberam os ácidos graxos da posição secundária dos triacilgliceróis, produzindo 1,3-diacilglicerol) (BORRELLI; TRONO, 2015) e, por último, a não-específica, em que a lipase hidrolisa triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol, tendo como intermediário mono- e diacilglicerol, podendo hidrolisar o grupo éster em qualquer posição no substrato (SANTOS; SALGADO; VANETTI, 2021).

Conforme a variação da fonte de produção (animal, vegetal ou microbiana) as propriedades físicas e bioquímicas podem se diferenciar, como a massa molecular, variando de 19 kDa a 75 kDa, o pH de atuação de 4 a 9 e temperatura, que varia da temperatura ambiente a 70 °C (CORTEZ;CASTRO; ANDRADE, 2017; OLIVEIRA,2020).

Segundo Duan e outros (2019), algumas das aplicações da lipase na indústria alimentícia são na produção de sabor da gordura do leite lipolisado e na biodegradação de ésteres e na panificação, complementando as lipases endógenas de cereais como melhoradoras de massa (PARKIN,2017).

Gandra e outros (2008) testam aplicação industrial de lipase em seu estudo, verificando a possibilidade de substituição do emulsificante monoglicerídeo pela enzima em formulação de pão de forma, enriquecido com fibras, para a manutenção das características de umidade e maciez durante o shelf-life, concluindo, ao final do estudo, haver essa possibilidade.

2.4 Formas de obtenção enzimática

As fontes de obtenção de enzimas basicamente são três: obtenção por extração vegetal, por extração animal ou produção por microrganismos (RAY *et al.*, 2016).

Os principais métodos utilizados na obtenção do material vegetal são: extração, isolamento e purificação das enzimas (ANTUNES *et al.*, 2017). “As enzimas podem ser extraídas de diversas partes dos vegetais, incluindo frutas, sementes, caules e raízes”

(TRIBST; LEITE JR, 2019, p. 398). As variações sazonais, genéticas e o estágio de vida das plantas interferem diretamente na determinação do produto almejado e devem ser levados em consideração, independente do tecido escolhido como fonte enzimática (CAVEL; SCOPES, 1976; SATHYANARAYANA; VARGHESE, 2007). Em todas as circunstâncias, de preferência, a matéria vegetal deve ser reduzida a pó ou micronizada, com o intuito de aumentar a área de contato com o líquido extrator. Na remoção de compostos hidrofóbicos, como os lipídios e terpenos, recomenda-se o uso de solventes apolares como o éter ou acetona.

A purificação tem o intuito de deixar o produto desejado com elevado grau de pureza, sendo que os métodos mais clássicos utilizados nesse processo são a precipitação, a centrifugação, a clarificação e a diálise, seguidos dos métodos específicos de cromatografia, que geralmente são utilizados de maneira sequencial, de forma que o material resultante da fase anterior é o ponto de partida para o passo seguinte (ANTUNES *et al.*, 2017).

Segundo Tribst e Leite Jr. (2019), as enzimas obtidas por extração animal são originadas geralmente de animais de sangue quente, criados para a produção de carne, sendo eles: bois, porcos, galinhas, cavalos, cabras e ovelhas. Vale ressaltar que não há a existência de produção desses animais apenas com o objetivo de extração de enzimas, sendo estas um subproduto dos abatedouros. Geralmente são extraídas de órgãos principais ou acessórios do sistema digestório do animal, incluindo estômago, intestino, pâncreas e fígado. A etapa inicial de extração enzimática consiste no rompimento das células do animal, em que se realiza a moagem dos tecidos secos ou frescos (caso seja no tecido fresco, deve ser seco em seguida). A extração da enzima de interesse pode acontecer por maceração ou imersão dos tecidos em água, solução salina ou tampão, no pH ótimo da enzima. Para escolher o método de extração ideal, considera-se as características de cada enzima (afinidade e estabilidade nos diferentes possíveis solventes), as etapas disponíveis para purificação e do nível de pureza desejado. O extrato enzimático obtido, normalmente, é submetido a processos de concentração e purificação antes da comercialização.

As modalidades de obtenção enzimática previamente mencionadas têm servido como fontes primárias das enzimas utilizadas no âmbito da indústria alimentícia (MOLINA *et al.*, 2013). Porém, de acordo com Razzaq e outros (2021), a obtenção das enzimas de origem animal é insuficiente para atender a demanda industrial, por depender de grande quantidade de matéria-prima para produção e tempo elevado para a criação. Somado às limitações destacadas por Silva e outros (2016), relacionadas às fontes vegetais de protease, por exemplo, que incluem dificuldades na sua extração do tecido vegetal, alegando, do mesmo

modo, possuir baixo rendimento, sendo resultado da presença de uma parede celular de extrema resistência e ainda inclui a presença de compostos fenólicos e polissacarídeos considerados contaminantes, sendo estes prejudiciais a solubilização dessas proteínas. Além da necessidade de aplicação de uma série de técnicas de purificação, ocasionando no aumento do custo do processo e, conseqüentemente, do produto final, promove a dificuldade de uma produção em larga escala.

Diante das restrições referentes, principalmente, ao processo de obtenção de enzimas por meio de extração, tornou-se necessário o desenvolvimento de processos alternativos de produção enzimática. Resultado disso, a fermentação microbiana ganhou destaque no meio, até alcançar a posição de padrão industrial (MOLINA *et al.*, 2013).

A obtenção de enzimas através de microrganismo possui maiores vantagens em comparação às demais: maior rendimento em menor tempo, geração de um menor volume residual, produção totalmente independente de questões sazonais, possui a opção de se utilizar resíduos industriais na produção, onde os mesmos se destacam como substratos ideais para a fermentação microbiana, devido à sua riqueza orgânica, ao custo reduzido e à maior disponibilidade. Além disso, subprodutos agrícolas apresentam melhor balanço energético e menor impacto ambiental do que subprodutos puros (SALAZAR *et al.*, 2019).

Robinson (2015) enfatiza outro ponto importante na produção de enzimas por microrganismos: a facilidade na purificação. A maioria das enzimas já são secretadas pela bactéria ou fungo, facilitando a obtenção do produto. De outro modo, existem enzimas que são mantidas na porção intracelular, necessitando de mais processos para a extração e purificação. Entretanto, ainda em comparação com as outras formas de obtenção de enzimas, a por microrganismos é mais sustentável e menos onerosa.

A descoberta de microrganismos que produzem enzimas com utilização industrial pode ocorrer de diferentes maneiras, tais como o isolamento a partir de recursos naturais, obtenção de mutantes naturais e outros (MONTEIRO; SILVA, 2009).

A produção de enzimas industriais possui basicamente três etapas, subdivididas em processos, sendo elas: etapa de *upstream*, que consiste no pré-tratamento da matéria-prima, na escolha do microrganismo e na otimização do processo; a etapa de fermentação e, por fim, etapa de *downstream*, que é a obtenção do produto (ASHOK; KUMAR, 2017). É na etapa de *upstream* que acontece a preparação do processo de fermentação, nessa etapa são ajustadas todas as condições ideais para que os microrganismos sejam cultivados, que são: pH, temperatura, composição, agitação e aeração do meio de cultura (IRFAN *et al.*, 2016 ; KUMAR *et al.*, 2010).

Referente à etapa de fermentação, ela pode ocorrer por dois métodos: a fermentação em estado sólido (SSF, sigla em inglês para *Solid State Fermentation*), que ocorre na ausência parcial ou total de água livre, tendo como principais vantagens a possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais sólidos, que servem como fonte de carbono e energia para o crescimento dos microrganismos, contribuindo também para uma destinação adequada desses resíduos (RIGO *et al.*, 2021), e a fermentação submersa (SmF, sigla em inglês para *Submerged Fermentation*), que acontece em reatores equipados com controladores de condições ideais para os microrganismos (SUKMA; JOS; SUMADIORNO, 2018). Em relação à fermentação em estado sólido, a fermentação submersa é mais vantajosa, por exemplo, um escalonamento adequado quanto à purificação dos produtos finais e biomassa. Uma vez que o substrato é caracterizado por um nível de pH relativamente alto (7,5 e 8,1), podendo ser um fator de limitação em culturas de fungos, normalmente estabelecidos em ambiente ácido. A fermentação submersa através da sua diluição, somada aos efeitos de tampão, pode evitar a alteração do pH, mantendo um ambiente adequado às condições exigidas pelos microrganismos. Além disso, a turbulência aprimorada melhora a acessibilidade do substrato (RIGO *et al.*, 2021).

Na etapa final, *downstream processing*, é onde ocorre a recuperação do produto sendo empregadas as etapas de extração e purificação da proteína. Deve-se ter atenção aos quesitos fisiológicos e citológicos dos microrganismos. Nessa etapa também deve-se saber a aplicação do produto final, pois isso determina o nível de pureza do produto e, em consequência, o preço de produção, já que quanto mais purificada a enzima, mais gastos requerem (LOPES *et al.*, 2022.).

Os procedimentos de extração de enzimas são elaborados, considerando-se a localização da enzima na célula microbiana. Para extrair enzimas intracelulares, as células são rompidas através de diversos meios, como sonificação e métodos enzimáticos, seguidos de centrifugação em alta rotação. O sobrenadante resultante é utilizado como amostra para purificação. Por outro lado, a enzima extracelular secretada no meio de cultura não requer ruptura celular. Nesse caso, toda a cultura é centrifugada e o sobrenadante é diretamente utilizado como amostra para purificação: ele é então precipitado, utilizando o método de precipitação com sulfato de amônio, seguido por purificação, através do método cromatográfico mais apropriado, que é selecionado com base nas características e propriedades específicas da enzima a ser purificada. Por exemplo, o tamanho é levado em consideração para a cromatografia de filtração em gel; a carga, para a cromatografia de troca iônica; a afinidade de ligação, para a cromatografia de afinidade e a hidrofobicidade, para a

cromatografia de interação hidrofóbica. É possível purificar a enzima de interesse a partir de uma mistura complexa de proteínas ou extrato celular, selecionando o número mais eficiente e mínimo de técnicas de purificação necessárias para alcançar o mais alto nível de pureza possível (SRIVASTAVA, 2019).

2.4.1 Isolamento de microrganismos

O isolamento de microrganismos de fontes naturais é a etapa inicial para o *Screening* a fim de procurar produtos de metabolismo, enzimas ou até mesmo espécie de microrganismos a serem estudados. Porém, não possui uma metodologia simples e universal que revele a quantidade total e a diversidade de microrganismos presentes em uma amostra. Mas existe a possibilidade de serem isolados, aplicando técnicas de enriquecimento, meios de cultura diferentes e condições de cultivo variadas (SOARES *et al.*, 2013).

2.4.2 Kombucha

O chá de kombucha é uma bebida fermentada não alcoólica, originária da China (SOMAMNTH *et al.*, 2016). Sua produção envolve a fermentação de chá verde adoçado (*Camellia sinensis*) ou outros tipos de chá (preto e mate, por exemplo), por meio de uma associação simbiótica de bactérias e leveduras, conhecida como "fungo do chá" (DUFRESNE; FARNSWORTH, 2000; SOMAMNTH *et al.*, 2016). Durante o processo de fermentação, forma-se um biofilme espesso e celulósico, chamado SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast ou, em português, Cultura Simbiótica de Bactérias e Leveduras), que se posiciona na interface entre o líquido e o ar. A composição exata dos microrganismos presentes na kombucha é variável, estando dependente da sua origem (BRUINI *et al.*, 2019).

De acordo com a INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 41, 17 DE SETEMBRO DE 2019, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a Kombucha é a bebida fermentada, obtida através da respiração aeróbia e fermentação anaeróbia do mosto obtido pela infusão do extrato de *Camellia sinensis* e açúcares, por cultura simbiótica de bactérias e leveduras microbiologicamente ativas (SCOBY), resultando em uma bebida ácida e doce, com pH entre 2,5 e 4,2 e acidez volátil entre 30 a 130 mEq/L de ácido acético, sendo classificada como não alcoólica quando sua graduação alcoólica (%v/v) for de até 0,5% e alcoólica quando sua graduação alcoólica (%v/v) estiver entre 0,6 a 8,0 %, podendo ser

adicionada de ingredientes opcionais, como a infusão de espécies vegetais em água ou seus extratos, autorizadas em legislação específica da ANVISA, sendo elas: Resoluções RDC nº 267, de 22 de setembro de 2005 e nº 219, de 22 de dezembro de 2006. Incluindo também frutas, vegetais e especiarias, previstos em legislação específica da ANVISA, Resolução RDC nº 276, de 22 de setembro de 2005. Acrescentando mel, melado e outros açúcares de origem vegetal, gás carbônico (CO₂) industrialmente puro, fibras, vitaminas, sais minerais e outros nutrientes, previstos em legislação específica da ANVISA, Resolução RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012, na kombucha não alcoólica.

Aditivos aromatizantes naturais e corantes naturais também são autorizados em legislação específica da ANVISA, Resolução RDC Nº 02, de 15 de janeiro de 2007 e RDC nº 05, 4 de fevereiro de 2007, na kombucha não alcoólica. Além disso, é permitido o uso de coadjuvantes de tecnologia, autorizados em legislação específica da ANVISA, Resolução RDC Nº 286, de 28 de setembro de 2005.

As bactérias presentes na kombucha são as acéticas e, ocasionalmente, láticas. Sendo as bactérias acéticas pertencentes aos gêneros: *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Gluconacetobacter*. Já as bactérias láticas pertencem aos gêneros: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (BRUINI *et al.*, 2019).

A diversidade de leveduras encontradas no kombucha tem sido estudada atualmente, sendo registrada como levedura predominante a *Zygosaccharomyces* (84%), mas também sendo encontrada a *Dekkera* (6%) e *Pichia* (5%). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é uma das mais importantes, pois é utilizada como cultura inicial devido à sua alta eficiência (PERIOTO *et al.*, 2022).

Para se produzir kombucha, é necessário uma cultura iniciadora, o SCOBY, em torno de 0,4 - 0,6 % de chá, de 5 – 20 % de sacarose e 10% de uma kombucha previamente fermentada, que servirá para acidificar o meio e impedir o crescimento de microrganismos patogênicos em um recipiente fermentador (SHURE, 2020). O processo de fermentação é estático e normalmente dura entre 7 a 12 dias, em temperatura ambiente, permitindo que os microrganismos trabalhem na transformação dos componentes do chá para produzir a bebida final (SOMNATH *et al.*, 2016).

À medida que as leveduras osmofílicas presentes no chá fermentam o açúcar, produzindo etanol, as bactérias convertem o etanol em ácido acético. Além disso, outros ácidos orgânicos, incluindo ácido glucônico, láctico, málico, cítrico e tartárico, também são

produzidos. Esses ácidos conferem ao kombucha propriedades antibacterianas, ajudando a evitar a contaminação por bactérias patogênicas (COELHO *et al.*, 2020).

A fermentação do chá de kombucha sofre influência de vários fatores, podendo citar, como exemplos, a temperatura, o pH, a quantidade de oxigênio, o dióxido de carbono dissolvido, a natureza e a composição do meio e outros. Qualquer que seja a variação em algum dos fatores citados, a taxa de fermentação, o desempenho e as propriedades físico-químicas, por exemplo, podem sofrer alterações. Caso haja variedades de plantas, concentrações de açúcar, tempo de fermentação e composição do fungo do chá, essas diferenciações podem ser responsáveis por alterações na composição e, conseqüentemente, as atividades biológicas também seriam afetadas (MARSH *et al.*, 2014).

Outro aspecto importante a se considerar é o tipo de água utilizado na produção, tendo em consideração que este ingrediente corresponde a mais de 90% do produto, portanto o controle de sua qualidade é indispensável para que atenda a todos os padrões exigidos pela legislação (VENTURIM, 2022). Por isso, é recomendado o uso de água mineral, possuindo pH próximo da neutralidade e sendo de boa procedência (SCHROEDER, 2019).

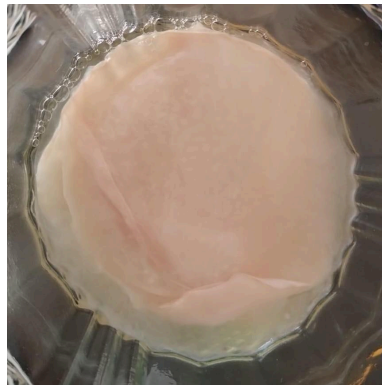
No cenário atual, o chá de Kombucha tem se destacado entre os consumidores e no meio científico por possuir características probióticas. Além disso, sua microbiota, a tecnologia de fabricação, seus subprodutos e suas características físico-químicas são fatos considerados com aptidão para a produção industrial. Dependendo da via metabólica, a fermentação e os produtos obtidos podem variar. Em contraponto, a fermentação do chá de kombucha é uma combinação de três tipos de fermentação, sendo elas: a acética, a alcoólica e a láctica. Essa combinação é resultado da presença de várias leveduras e bactérias que estão presentes no meio (VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

A amostra de kombucha com o SCOBY foi recebida por doação. O SCOBY é uma película com aspecto gelatinoso, que é formado na superfície do chá kombucha, produto esse resultante da fermentação (Figura 1). Assim, na mesma, ocorre o acúmulo desta película na parte superior do meio (DOMENEGHETTI; SOARES; SCHMIDT, 2019). Para sua replicagem, ferveu-se 1 L de água com 60 g de açúcar. Após a fervura, foi deixado em infusão na água quente 8 g de chá verde, durante, aproximadamente, 10 minutos. Depois que o chá alcançou a temperatura ambiente, foram adicionados o SCOBY original e 100 mL do chá de arranque, que se trata de uma kombucha já fermentada e serve como iniciador para uma nova fermentação. Posteriormente, ocorreu a fermentação a uma temperatura de 25 °C, durante 10 dias.

Figura 1: SCOBY de kombucha



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Além do fermentado de kombucha, no presente trabalho, os seguintes reagentes foram utilizados: dextrose, extrato de levedura, carbonato de cálcio, ágar nutriente, peptona, meio de cultura (PCA), caldo BHI, solução salina (0,85% NaCl), lugol, corante cristal violeta, álcool e safranina, todos disponibilizados pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais, *Campus Bambuí*. Os demais materiais utilizados, como leite em pó desnatado, óleo de soja e amido de milho, foram adquiridos no comércio da cidade de Belo Horizonte - MG.

O meio de cultura para cultivo e isolamento de bactérias acéticas foi preparado com 24 g de dextrose, 4,67 g de extrato de levedura, 2,4 g de carbonato de cálcio, 9,6 g de ágar e 480 mL de água destilada (OLIVEIRA *et al.*, 2010; CARVALHO, 2010).

Para o preparo do meio de cultura para avaliação da produção de amilase, adotou-se o seguinte meio de cultura: PCA + 1% de amido (m/v) (DOWNES; ITO, 2001).

Para o preparo do meio de cultura para avaliação da produção de protease, o seguinte meio de cultura foi utilizado: PCA + 10% (m/v) de leite em desnatado reconstituído (DOWNES; ITO, 2001).

Para o preparo do do meio de cultura para a avaliação de lipase, utilizou-se o seguinte meio de cultura: PCA + 1% de óleo de soja (m/v) e 0,1% (m/v) de Tween 80 (DOWNES; ITO, 2001).

3.2 Métodos

3.2.1 Isolamento dos microrganismos do *SCOBY* de kombucha

Por se tratar de uma amostra com características intermediárias entre sólido e líquido, esta foi homogeneizada antes da pesagem. Em seguida, aproximadamente, 25 g da amostra foram adicionados a 225 mL de água peptonada estéril. Após nova homogeneização, foram realizadas diluições seriadas e o plaqueamento para contagem em meio sólido.

Para a realização das diluições, 1 mL da amostra foi transferido para um tubo de ensaio, contendo 9 mL de solução peptonada (0,1% m/v) e homogeneizado com auxílio de um vórtex, obtendo-se a diluição 10^{-1} . A partir dessa primeira diluição, foram preparados mais quatro tubos de ensaio, cada um contendo 9 mL de solução peptonada (0,1% m/v), nos quais foram realizadas diluições sequenciais, resultando nas concentrações de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} (CARVALHO, 2010).

Com as diluições prontas, foram pipetados 100 μ L de amostra diluída nas placas de petri, anteriormente preparadas com meio de carbonato de cálcio. O plaqueamento foi realizado através do método *Spread plate* e em duplicata e, em seguida, incubadas em estufa por 96 horas, a 30 °C. Após o período de incubação, procedeu-se a verificação do crescimento de colônias características.

Como a inoculação dos microrganismos foi realizada em duplicata, o resultado da contagem de colônias em UFC/mL foi obtido através do cálculo da média aritmética dos resultados encontrados, multiplicada pelo inverso da diluição, dividido pelo volume da alíquota e expressos em Log UFC/mL.

Posteriormente, procedeu-se ao isolamento dos microrganismos em placas para análise. Esse processo foi conduzido utilizando-se a técnica de isolamento por estrias em

triplicata e, em seguida, as placas foram novamente inseridas na estufa de incubação por 96 horas, a 30 °C (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Foram isoladas colônias com halos transparentes no meio de carbonato de cálcio e colônias que não apresentavam halo.

Concluídas as etapas de incubação e isolamento, foi realizada a coloração de Gram dos microrganismos. Inicialmente, a amostra de microrganismos foi espalhada em uma lâmina de vidro. Em seguida, essa lâmina foi levemente aquecida para a fixação das células, evitando que fossem removidas durante as etapas seguintes. Depois, com o auxílio do conta gotas, o corante cristal violeta foi aplicado acima da amostra, ficando em contato por 1 minuto, depois foi realizado o enxágue da lâmina com água destilada para remover o excesso de corante. Na etapa seguinte, aplicou-se, também com o auxílio de um conta gotas, uma solução de lugol, que atuou como um mordente, ajudando a fixar o corante dentro das células, ficando em contato durante 1 minuto e, em seguida, sendo realizado o enxágue com água destilada. Logo depois, foi feita uma rápida descoloração com álcool (15 segundos). Depois foi realizado o enxágue com água destilada, seguida da aplicação do corante safranina, por cerca de 30 segundos e, sequencialmente, foi realizado o enxágue da mesma com água destilada. Por fim, a lâmina foi suavemente seca e examinada em microscópio óptico com ampliação de 1000x (ROSALEM; LOURENÇO, 2023).

3.2.2 Preparo dos inóculos para bioprospecção

Para padronizar a concentração de células, o inóculo foi ajustado, buscando-se atingir uma turbidez similar a do padrão 0,5 da Escala McFarland. Com a alça de repicagem, amostras de colônias foram retiradas das placas de petri e suspensas em solução salina (0,85% m/v).

A suspensão foi homogeneizada e comparada visualmente com a solução padrão, de forma a alcançar uma turbidez visualmente semelhante, correspondendo a uma população de células de aproximadamente $1,0 \times 10^7$ células por mL.

Após a padronização da concentração ser atingida, foi retirado 1 mL da suspensão bacteriana e adicionado ao tubo de ensaio, que continha 9 mL de solução salina (0,85% NaCl), tornando assim a concentração da suspensão bacteriana equivalente a $1,0 \times 10^6$ UFC por mL (6,00 Log UFC/mL).

3.2.3 Investigação da produção de amilase

Para realizar a investigação da possível produção da enzima amilase, foram preparadas seis placas de meio de cultura, com o nutriente de interesse, contendo aproximadamente 20 ml de solução, totalizando 120 ml de solução.

Para o preparo do meio de cultura adequado, os reagentes foram homogeneizados, esterilizados e posteriormente inseridos na placa de petri. Foi realizada a leitura de pH da solução e, caso necessário, seria realizado o ajuste de pH para 6.

A inoculação dos microrganismos nas placas de atividade enzimática foi realizada utilizando o método de perfuração do ágar. O ágar foi perfurado em três pontos equidistantes, formando poços, sendo adicionados 50 µL de inóculo da solução previamente padronizada em cada poço. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa por 96 horas, a 30°C. A revelação dos resultados da investigação de amilase foi realizada com lugol, baseado na reação amido-iodo, que forma cor azul escura, logo, a presença de halo claro indicaria atividade amilolítica.

3.2.4 Investigação da produção de protease

Para realizar a investigação da possível produção da enzima protease, também foram preparadas seis placas de meio de cultura com o nutriente de interesse, contendo aproximadamente 20 ml de solução, totalizando 120 ml de solução.

Para o preparo do meio de cultura adequado, os componentes também foram homogeneizados, esterilizados e, posteriormente, distribuídos em placas de Petri.

A inoculação dos microrganismos nas placas de atividade enzimática também foi realizada utilizando-se o método de perfuração do ágar. O ágar foi perfurado em três pontos equidistantes, sendo adicionados 50 µL de inóculo da solução previamente padronizada em cada perfuração. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa por 96 horas, a 30°C. O aparecimento de halo translúcido seria indicativo de atividade proteolítica.

3.2.5 Investigação da produção de lipase

Para realizar a investigação da possível produção da enzima protease, também foram preparadas seis placas de meio de cultura com o nutriente de interesse, contendo aproximadamente 20 ml de solução, totalizando 120 ml de solução.

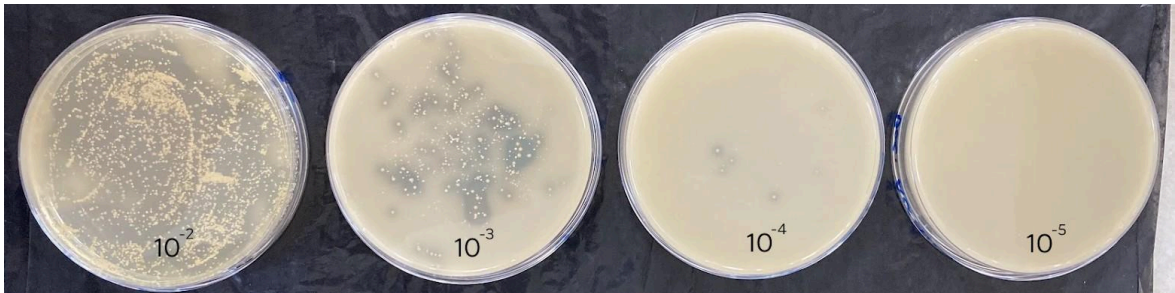
Para o preparo do meio de cultura adequado, os componentes também foram homogeneizados, esterilizados e, posteriormente, distribuídos em placas de Petri.

A inoculação dos microrganismos nas placas de atividade enzimática também foi realizada utilizando-se o método de perfuração do ágar. O ágar foi perfurado em três pontos equidistantes, sendo adicionados 50 µL de inóculo da solução previamente padronizada em cada perfuração. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa por 96 horas, a 30°C. A visualização de halo translúcido seria indicativo de atividade lipolítica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise das diluições revelou valores variáveis de crescimento bacteriano nas respectivas diluições seriadas (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}) (Figura 2).

Figura 2 - Crescimento dos Microrganismos do SCOBY da kombucha

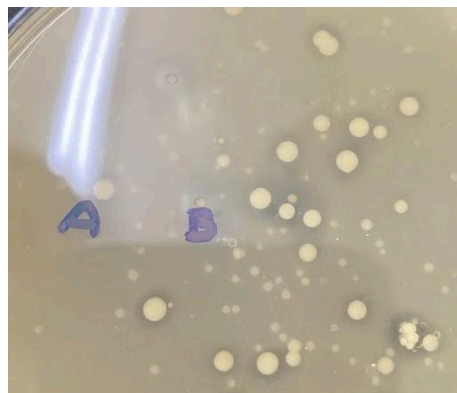


Fonte:Elaborado pela autora, 2025.

4.1. Características Morfológicas

Após 96 horas de incubação, as colônias crescidas no meio de isolamento foram observadas. A observação apontou características como presença ou não de halos, coloração, tamanho, textura e formato e cor da borda (SPINOSA, 2002). Foram identificadas duas colônias distintas de microrganismos, uma identificada como Colônia A, na qual pode-se observar as características macroscópicas: borda uniforme com coloração esbranquiçada, um interior amarelado e com presença de halos translúcidos. A outra colônia observada, identificada como Colônia B, não possuía halo, tendo suas características macroscópicas de cor e bordas semelhantes às da Colônia A. Ao serem comparadas por tamanho, notou-se que a colônia A possuía tamanho superior ao da colônia B (Figura 3).

Figura 3- Características Morfológicas das colônias A e B



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

4.2. Contagem das colônias

Para as amostras mais concentradas (diluição de 10^{-2}), as placas apresentaram crescimento abundante, o que impossibilitou a contagem precisa das colônias (IDN), e nas diluições mais altas (10^{-5}), nenhuma unidade formadora de colônia (UFC) foi detectada, caracterizando ausência de crescimento bacteriano nessas condições. Conseqüentemente, a contagem de colônias foi realizada apenas nas placas de diluições 10^{-3} e 10^{-4} , sendo separadas as colônias que possuíam halo (colônia A), das colônias que não possuíam (colônia B). Na tabela 1, encontra-se o resultado referente à respectiva contagem. Os resultados foram expressos em Log UFC/ mL.

Tabela 1- Contagem de colônias A e B nas, placas de diluições 10^{-3} e 10^{-4} em Log UFC/ mL

Diluição	Colônia A	Colônia B
10^{-3}	5,82	6,59
10^{-4}	6,04	6,66

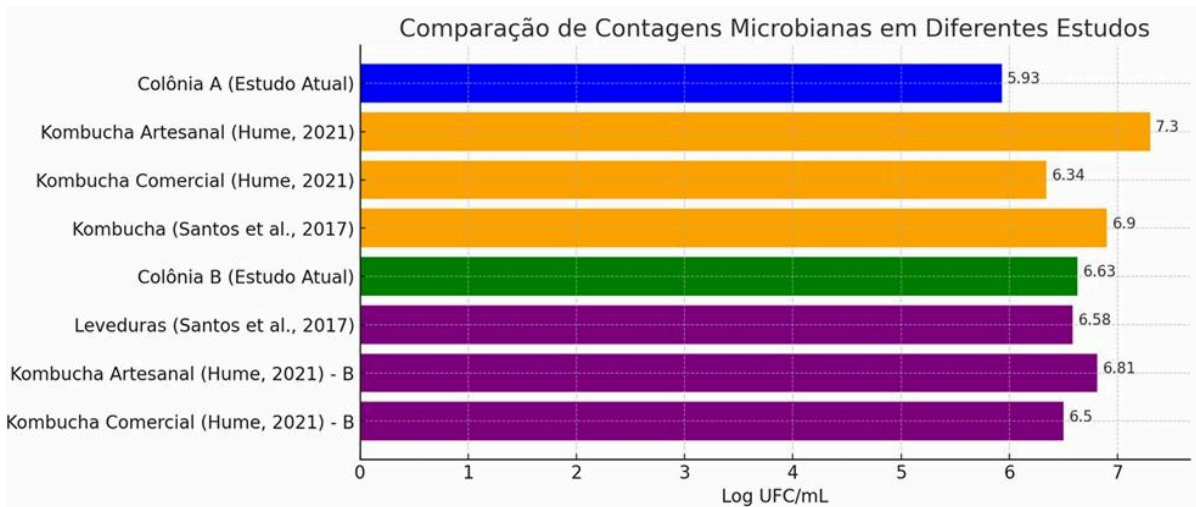
Fonte: Elaborado pela autora , 2025.

No presente estudo, a colônia A, composta por bactérias acéticas (apresentam halo em meio de carbonato de cálcio), apresentou um valor médio de 5,93 Log UFC/mL. Hume (2021) encontrou contagens médias de bactérias acéticas de 7,30 Log UFC/mL em kombucha artesanal e 6,34 Log UFC/mL, em kombucha comercial, ambas com sete dias de fermentação. Já Santos, Barbosa e Lacerda (2017) observaram valores de 6,90 Log UFC/mL.

A colônia B apresentou um valor médio de 6,63 Log UFC/mL. Santos, Barbosa e Lacerda (2017) identificaram valores de contagem de leveduras, variando entre 6,17 e 7,00 Log UFC/mL, em kombucha fermentada por 25 dias. Hume (2021) encontrou médias de 6,81 Log UFC/mL em kombucha artesanal e 6,50 Log UFC/mL, em kombucha comercial, ambas fermentadas por sete dias.

Os valores obtidos para a quantificação de bactérias acéticas e leveduras, neste estudo, foram semelhantes aos relatados na literatura. No gráfico 1, os valores são comparados para melhor visualização. As culturas de kombucha de diferentes regiões não apresentam composições químicas e microbiológicas padronizadas, sendo influenciadas por fatores como composição do chá, tempo e temperatura de fermentação e pH. Dessa forma, as variações observadas no presente estudo, em relação aos dados da literatura, eram esperadas.

Gráfico 1- Comparação do valor das contagens microbianas obtidas no presente estudo com a literatura.

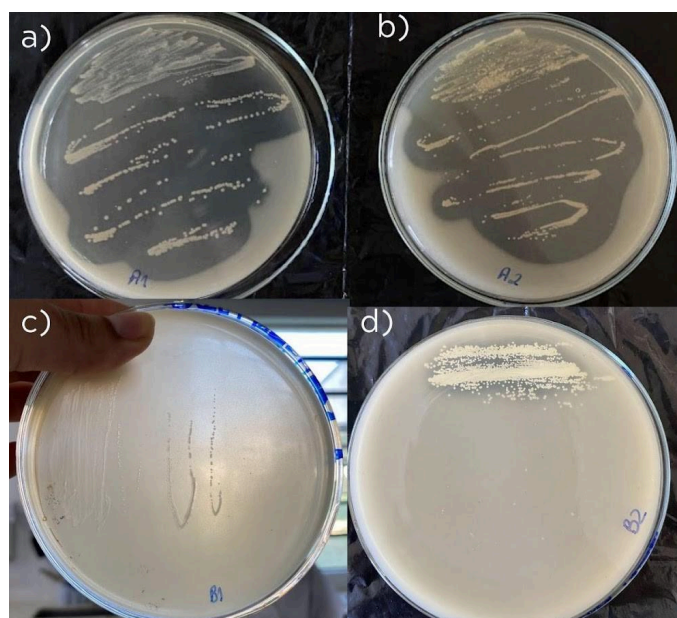


Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

4.3. Isolamento dos microrganismos

O isolamento dos microrganismos foi realizado da placa de diluição 10^{-4} . A partir das diferenças macroscópicas encontradas entre as colônias citadas anteriormente, elas foram separadas (Figura 4).

Figura 4: Isolamento dos microrganismos onde: a) Crescimento da colônia A1, b) Crescimento da colônia A2, c) Crescimento da colônia B1, d) Crescimento da colônia B2.

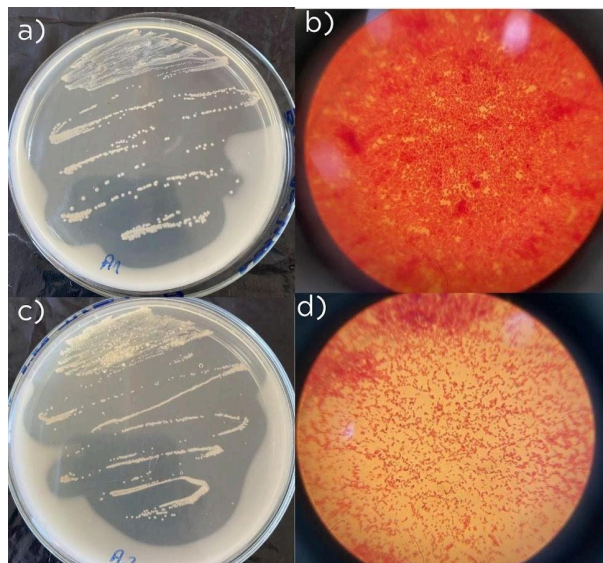


Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

4.4. Coloração de Gram

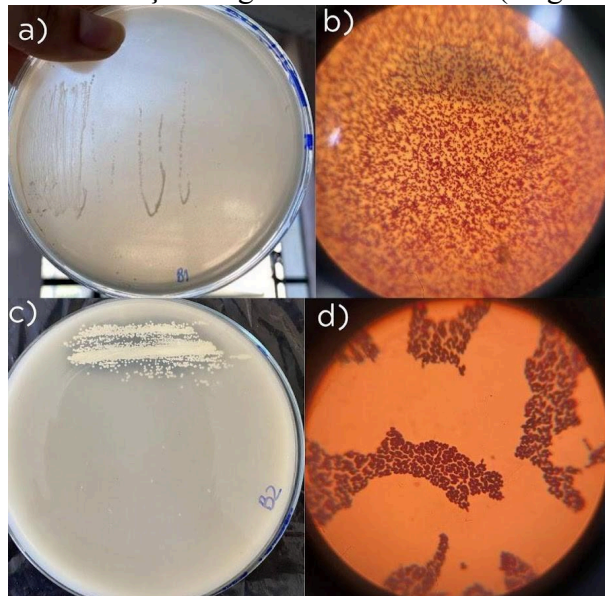
Os microrganismos encontrados em cada amostra foram submetidos ao teste de coloração de Gram, com o objetivo de confirmar as características morfológicas e estruturais específicas de cada tipo (HUME, 2021). Após a realização do mesmo, juntamente ao crescimento das bactérias acéticas (Figura 5) inicialmente previstas, pôde-se observar o crescimento de leveduras (Figura 6). Esse resultado sugere que as condições de crescimento (meio de cultura, tempo e temperatura de incubação) apresentaram, igualmente, favorecimento ao desenvolvimento das leveduras, contrariando as expectativas previamente estabelecidas de se restringir o desenvolvimento de bactérias acéticas.

Figura 5 - Microrganismos isolados para caracterização das bactérias acéticas, onde: a) refere-se ao crescimento isolado da colônia A1; b) refere-se ao resultado da coloração de gram da colônia A1; c) refere-se ao crescimento isolado da colônia A2; d) refere-se ao resultado da coloração de gram da colônia A2. Magnificação de 1000x.



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Figura 6 - Microrganismos isolados para caracterização das bactérias acéticas, onde: a) refere-se ao crescimento isolado da colônia B1; b) refere-se ao resultado da coloração de gram da colônia B1 (magnificação de 400x); c) refere-se ao crescimento isolado da colônia B2; d) refere-se ao resultado da coloração de gram da colônia B2 (magnificação de 1000x).



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

As bactérias acéticas definem-se em forma de bastonetes e são Gram-negativas (-), podendo ocorrer de forma única, em pares ou cadeias (GOMES *et al.*, 2018). Verificou-se que as colônias das bactérias acéticas isoladas neste estudo (Figura 5) estão em conformidade com as características descritas na literatura.

As leveduras são microrganismos unicelulares, eucariontes, de tamanho superior a de células bacterianas, que podem se corar de violeta ou rosa pela coloração de Gram (ANDRES; BARRAO, 2012). Assim, ao realizar o teste de coloração de Gram nas leveduras isoladas (Figuras 6), foi possível concluir que os resultados estão em conformidade com os descritos na literatura.

4.5. Investigação de produção enzimática

Para avaliar a possível produção das enzimas protease e lipase, os microrganismos foram inoculados em meios de cultura, contendo os nutrientes de interesse (proteína e lipídio).

A confirmação do resultado foi realizada pela observação de dois indicadores: o crescimento satisfatório dos microrganismos no meio de cultura em questão e a formação de halos ao redor das colônias. Esses halos indicariam a degradação dos nutrientes presentes no

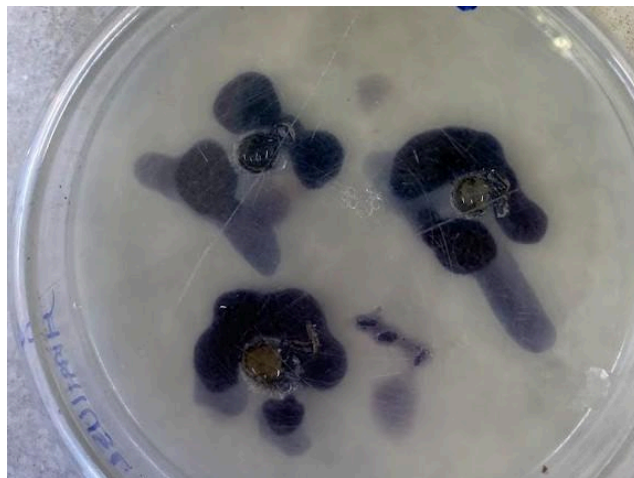
meio, evidenciando a produção da enzima de interesse. Ambos os indicadores foram visíveis a olho nu.

No presente estudo, os microrganismos submetidos ao experimento apresentaram crescimento significativo, porém não produziram enzimas capazes de degradar o lipídio e a proteína presentes nos meios de cultura.

A falta das atividades de lipase e protease podem estar relacionadas à ausência de genes codificadores de proteases extracelulares ou à inadequação das condições ambientais para sua expressão.

Durante a avaliação da possível produção de amilase, ao contrário das enzimas citadas anteriormente, o microrganismo, depois de satisfatoriamente desenvolvido no meio de cultura, contendo o nutriente em questão, foi submetido à aplicação de lugol: a região escura identifica a formação do complexo amido-iodo (Figura 7) e a região clara evidencia a ação das enzimas amilolíticas (SILVA *et al.*, 2018).

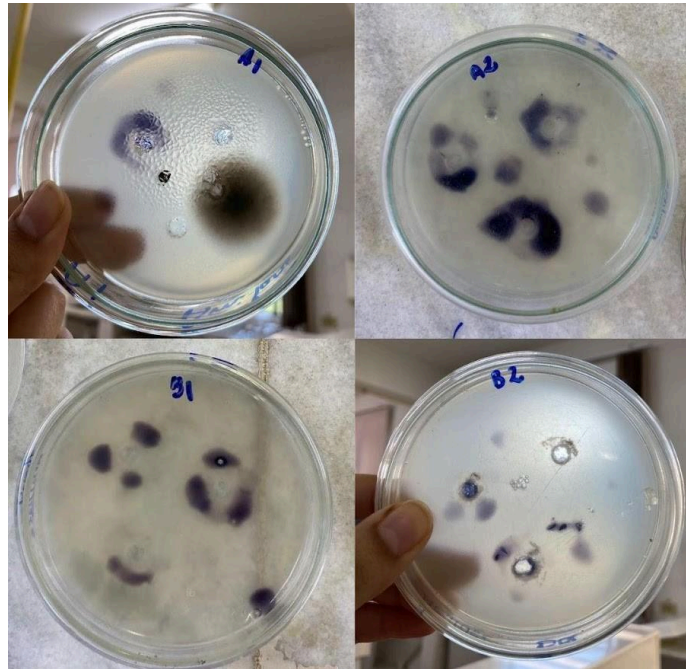
Figura 7 - Exemplo da investigação de atividade amilolítica com formação do complexo amido-lugol, resultando em cor azul escura.



Fonte: autora, 2025.

A Figura 8 mostra os resultados para a avaliação de produção da amilase. Todas as colônias foram expostas à mesma quantidade de lugol, sob o mesmo tempo e temperatura.

Figura 8 - Resultados da investigação de produção de enzimas amilolíticas nas colônias A1, A2, B1, B2.



Fonte: autora, 2025.

Constatou-se que ambas as colônias analisadas demonstraram capacidade de crescimento e produção da enzima amilase, embora em níveis distintos. Levando-se em consideração que o método de perfuração de ágar é uma técnica qualitativa, pode-se concluir que ambas as colônias possuem potencial para a produção da enzima amilase.

Para que possa ser considerado um bom produtor de enzimas extracelulares em meio sólido, Lealem e Gashe (1994) estabelecem que é necessário possuir um Índice Enzimático superior ou igual a 2,0 cm. O mesmo é calculado através da razão entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio de crescimento microbiano. Componente este calculado quando o crescimento microbiano não acontece através da perfuração do ágar.

5. CONCLUSÃO

Com base na análise dos resultados obtidos ao longo deste estudo, pode-se acrescentar, além das vantagens já documentadas do Scoby da Kombucha, que ele se constitui também em uma importante fonte de microrganismos com potencial biotecnológico. Isso se deve à diversidade de culturas presentes e ao potencial biotecnológico de alguns desses microrganismos para a produção de catalisadores biológicos.

Dentre os microrganismos isolados, a colônia B (B1 e B2), uma possível levedura, pode ser destacada qualitativamente como a de melhor comportamento degradante para meios amilolíticos. Para afirmações mais concretas da possibilidade de serem economicamente viáveis para o setor industrial, sugere-se a realização de estudos quantitativos, com isolamento e purificação das enzimas.

Em relação aos meios que contêm proteínas e lipídios, não foram detectadas atividades enzimáticas proteolíticas e/ou lipolíticas.

REFERÊNCIAS

- AFSHARNEZHAD, M.; SHAHANGIAN, S. S.; SARIRI, R. A novel milk-clotting cysteine protease from *Ficus johannis*: purification and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, n.1, p. 173-182, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.006>>. Acesso em: 15 maio 2024.
- AGUILAR, J. G. dos S.; SATO, H. H. Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, n. 1, p. 253-262, jan. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.044>> . Acesso em: 22 abril 2024.
- ANDRES BARRAO, C. **Characterization of acetic acid bacteria and study of the molecular strategies involved in the resistance to acetic acid during oxidative fermentation**. 2012. Tese de Doutorado. University of Geneva. 2012
- ANTUNES, R. S.; LOPES, F. M.; BRITO, A. O.; GARCIA, L. F.; SOUSA D. F.; GIL, E. S. Enzimas vegetais: extração e aplicações biotecnológicas. **Infarma Ciências Farmacêuticas**, Brasília, v. 29 , n. 3, p. 181-198, abr. 2017. Disponível: <<http://dx.doi.org/10.14450/2318-9312.v29.e3.a2017.pp181-198>>. Acesso em : 23 abril 2024.
- ASHOK, A.; KUMAR, D. S. Diferentes metodologias para sustentabilidade de técnicas de otimização utilizadas em fermentação submersa e em estado sólido. **3 Biotech**, v. 7, n. 5, p. 1-12, out. 2017.
- BACKES, G. T.; DENTI, A. F.; POLINA, C. C.; VANZ, J.; BERNARDI, J. L.; RAISEL, L. B.; PALAVICINI, S. M. S.; FEIDEN, T. Enzimas e suas aplicações com ênfase na indústria de alimentos. **Perspectiva**, Erechim, v. 46, n.175, p. 51-68, set. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.31512/persp.v.46.n.175.2022.251.p.51-68>> . Acesso em: 24 abril 2024.
- BAPTISTE, J. J. **Amilase e lipase produzidas por fungos de efluente têxtil: levantamento científico e tecnológico**. 2020. 48f. Trabalho de Monografia (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino Americana Instituto Latino Americano de Ciências da vida e da natureza. Foz do Iguaçu, 2020. Disponível em: <<https://dspace.unila.edu.br/handle/123456789/6040>> . Acesso em: 29 março 2024.
- BARRETT, A. J. Proteolytic Enzymes: Nomenclature And Classification. In: BEYNOM, R.J; BOND, J.S. **Enzim Proteolytic enzymes: A practical approach**. Oxford: Academic press, 2001. p. 1-22.
- BORRELLI, G. M.; TRONO, D. Lipases e fosfolipases recombinantes e seu uso como biocatalisadores para aplicações industriais. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p.20774-20840, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms160920774>> . Acesso em: 5 maio 2024.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019. Estabelece os padrões de identidade e qualidade para kombucha. **Diário Oficial da União**, Brasília-DF, 18 set. 2019. Seção I, p. 13. Disponível em: <<https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=18/09/2019&jornal=515&pagina=13&totalArquivos=76>>. Acesso em: 02 julho 2024.

BRUINI, B.; BERTOLANI, J. A. C.; BERDUSCO, J. P.; TREVIZAM, C. J. Aspectos físico-químicos e microbiológicos no processo de fabricação da kombucha. **Revista Engenho**. v. 11, n. 1, p. 48-67, dez. 2019. Disponível em: <<https://revistas.anchieta.br/index.php/RevistaEngenho/article/view/1509/1386>>. Acesso em: 01 julho 2024.

CARVALHO, J. K. **Isolamento e seleção de leveduras de ambiente continental lótico com capacidade de produção enzimática**. 2020. 42f. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Ciências Ambientais) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2020. Disponível em: <<https://tede.unioeste.br/handle/tede/5077>>. Acesso em: 30 maio.

CARVALHO, I. T. Microbiologia Básica. Escola técnica aberta do Brasil, 2010. Disponível em: <https://redeotec.mec.gov.br/images/stories/pdf/eixo_prod_alim/tec_alim/181012_micro_bas.pdf>. Acesso em: 29 jul 2024.

CAVELL, S.; SCOPES, K. Isolamento e caracterização da fosfoglicerato quinase 'fotossintética' de *Beta vulgaris*. **Revista Europeia de Bioquímica**. Victoria, v. 63, n. 2, p. 483-490, abr. 1976.

COELHO, R. M. D. *et al.* Kombucha: Resenha. **Revista Internacional de Gastronomia e Ciência dos Alimentos**, v. 22, n.1, p. 100272, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100272>>. Acesso em: 12 abril 2024.

COLEN Gecernir. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. 2006. Tese. (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais; Belo Horizonte 2006.

CORTEZ, D. V.; CASTRO, H. F. DE; ANDRADE, G. S. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química Nova**, São Paulo, v. 40, n. 1, p.85-96, ago. 2017. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/qn/a/jQQ6QGRbjZgL3gXSR5Fd5ZJ/>> . Acesso em: 20 abril 2024.

DAMASCENO, A. A. **Purificação e caracterização da lacase do fungo *Trametes cubensis* (Mont.) Sacc. 1891**. 2016. 68f. Tese de doutorado (Pós-Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 2016. Disponível em: <<https://tede.ufam.edu.br/bitstream/tede/5747/5/Tese%20-%20Andrey%20A.%20Damasceno.pdf>>. Acesso em: 10 junho 2024.

DENTI, A. F. Tecnologia Enzimática: Classificação, Imobilização, Suporte e Aplicações. **Perspectiva**, v. 45, n.171, p. 97-110, out. 2021. Disponível em: <<http://ojs.uricer.edu.br/ojs/index.php/perspectiva/article/download/168/97>> . Acesso em: 20 abril 2024.

DIXON, M.; WEBB, E.C. Enzyme Structure. In: _____. **Enzymes**. New York: Academic Press, 1964. p. 452-476.

DOMENEGHETTI, P. A., SOARES, M., SCHMIDT, V. C. Caracterização de SCOBY do kombucha para a produção de biofilmes. p.840-846, ago. 2019. Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. Ago 2019. Disponível em: <<http://bit.ly/2IJRCRY>> Acesso em: 01 dez 2024.

DOWNES F. P., ITO K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4 ed. APHA, Washington, DC, 676 pp. 2001.

DUAN, X. *et al.*, .Biochemical characterization of a novel lipase from *Malbranchea cinnamomea* suitable for production of lipolyzed milk fat flavor and biodegradation of phthalate esters. **Food Chemistry**, v. 297, 124925. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.199>> Acesso em: 21 fev, 2025.

DUFRESNE, C.; FARNWORTH, E.; Chá, Kombucha e saúde: Uma revisão. **Pesquisa Internacional de Alimentos**. v. 33, n. 6, p. 409-421, jul. 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00067-3](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00067-3)>. Acesso em: 01 julho de 2024.

FORGIARINI, E. **Degradação de Corantes e Efluentes Têxteis Pela Enzima Horseradish Peroxidase (HRP)**. 110f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006. Disponível em: <Universidade Federal de Santa Catarina (ufsc.br)>. Acesso em: 20 abril 2024.

FRANÇOSO, I. L. T. **Efeito da enzima α -amilase no processo de fabricação para redução do teor de amido no açúcar**. 2013. 108f. Dissertação de Mestrado. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.11606/D.11.2013.tde-16122013-153412>> . Acesso em: 14 maio 2024.

GANDRA, K. M.; BIANCHI, M. D.; GODOY, V. P.; QUEIROZ, F. P. C.; STEEL, C. J. Aplicação de lipase e monoglicerídeo em pão de forma enriquecido com fibras. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 182-192, jan/mar. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1981-6723.12017>> . Acesso em: 20 abril 2024.

GOMES, R. J. *et al.* Acetic acid bacteria in the food industry: systematics, characteristics and applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 56, n. 2, p. 139-151, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5593>>. Acesso em: 02 jan 2025.

GRIEBELER, N. E.; de BORTOLI, V.; ASTOLFI, A. L.; DARONCH, N. A.; SCHUMANN, A. C.; SALAZAR, L. N.; CANSIAN, R. L.; BACKES, G. T.; ZENI, J. Seleção de fungos filamentosos produtores de amilases, proteases, celulasas e pectinases. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v.13, n.1, p. 13-22, fev. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.7213/academica.13.FC.AO01>> . Acesso em: 01 maio 2024.

GUERRAND, D. Aplicações industriais das Lipases: foco em alimentos e agroindústrias. **OCL Oleaginosas e gorduras e lipídios**, Ramonville-Sainte-Agne, v. 24, n. 4, p. 1-7, jul-ago. 2017. Disponível em: < <https://hal.science/hal-01608036>>. Acesso em: 01 maio 2024.

HAN, G.; SEO, J.; MANNAA, M.; INMYOUNG, P.. Evolução dos Processos de Fermentação de Alimentos e o Uso da Multi-ômica na Decifração dos Papéis da Microbiota. **Foods**, v. 10, n. 11, p. 2861-2880, nov. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/foods10112861>> . Acesso em: 20 abril.

- HUME, Camila Pereira Barbosa Pedra. **Kombucha artesanal e comercial: Aspectos microbiológicos e parâmetros físico-químicos**. 2021. Monografia (Bacharel em Nutrição) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2021.
- IRFAN, M.; ASGHAR, U.; NADEEM, M.; NELOFER, R.; SYED, Q. Otimização de parâmetros de processo para produção de xilanase por *Bacillus sp* em fermentação submersa. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 9, n. 2, p. 139-147, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.10.008>> . Acesso em: 10 junho 2024.
- KRUGER, K.; GRABOWSKI, P. J.; ZAUG, A. J.; SANDS, J.; GOTTSCHING, D. E.; CECH, T. R. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. **Célula**, v. 31, n. 1, p. 147-157, nov. 1982.
- KUMAR, R.; BALAJI, S.; UMA. T. S.; MANDAL, A. B.; SEHGAL. P. K. Otimização de parâmetros influentes para a produção de queratinase extracelular por *Bacillus subtilis* (MTCC9102) em fermentação em estado sólido utilizando farinha de chifre - Um gerenciamento de biorresíduos. **Appl Biochem Biotechnol** , v. 160, n. 1, p.30-39, jan. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2011.03.005>> . Acesso em: 14 maio 2024.
- LEALEM F., GASHE BA. **Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eragrostis tef*.)** J Appl Bacteriol. v. 77, n. 3, p.354-352. 1994. Disponível em: < <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb03084.x> >. Acesso em: 20 dez 2024.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Estrutura Tridimensional de Proteínas. In: _____. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Artmed, 2014. p. 115-178.
- LEWIN, B. Proteins. In: _____. **Genes VII**. Oxford: University Press. 2000. p. 117-191.
- LOPES, F. C.; SOUZA, A. H.; PERIN, A. P. Enzimas: Produção e aplicação industrial. In: SANTOS, F.; KERN, A. N.; BOEIRA, J. M.; DELLAGOSTIN, O. **Bioprocessos e biotecnologia**. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 2022. p.145-172.
- MARSH, A. J.; HILL, C.; ROSS, R. P.; COTTER, P. D. Bebidas fermentadas com potencial promotor de saúde: perspectivas passadas e futuras. **Tendências em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 38, n. 2, p. 113-124. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.05.002>> . Acesso em: 20 abril 2024.
- MARTIN, J. G. P.; LINDNER, J. D. D. Alimentos Fermentados: passado, presente e futuro. In: . **Microbiologia de alimentos fermentados**, São Paulo: Blucher, 2022. p.13-40.
- MOLINA, G.; PELISSARI, F. M.; DIONISIO, A. P.; PASTORE, G. M. Obtenção enzimática para a indústria de alimentos. In: PASTORE, G. M.; BICAS, J. L.; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R. **Biotecnologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2013. p. 367-388.
- MOLINA, G.; PRAZERES, J. N.; BALLUS, C. A. Aplicação das enzimas na indústria de alimentos. In: PASTORE, G. M.; BICAS, J. L.; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R. **Biotecnologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2013. p. 343-366.
- MONTEIRO, N. V.; SILVA, R. do N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, Goiânia, v. 9, n. 5, p. 9-23, jan/ jun. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.19142/rpq.v3i5.83>>. Acesso em: 14 maio 2024.

MOTTA, V. T. Enzimas. In: _____. **Bioquímica básica**. Rio de Janeiro, 2011. p. 64-101.

OLIVEIRA, H. S. De. **Efluente oleoso como alternativa para a produção de lipase por fungos**. 2020. 61f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2020. Disponível em:

<<https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/40059/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O%20Helton%20Santana%20de%20Oliveira.pdf>> . Acesso em: 01 maio 2024.

OLIVEIRA, A. L. D. DE *et al.*. Study of bacteria *Gluconobacter* sp.: isolation, purification, phenotypic and molecular identification. **Food Science and Technology**, v. 30, n. 1, p. 106–112, jan. 2010. Disponível em:

<scielo.br/j/cta/a/z3CVHFCXr4ZXB3F9PKmr33t/?format=pdf>. Acesso em: 06 mai 2024.

PARKIN, K. L. Enzimas. In: DEMORARAN, S.; PARKIN, L. K.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. Brasil: Artmed Editora, 2017. p. 357-466.

PERIOTO, C. Z. *et al.* Potencial antioxidante e caracterização físico-química e microbiológica da kombucha. **Brazilian Journal of Development**. Curitiba, v. 8, n. 1, p. 739-751, jan. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.34117/bjdv8n1-049>>. Acesso em: 12 abril 2024.

RAVEENDRAN, S.; PARAMESWARAN, B.; UMMALYMA, S. B.; ABRAHAM, A.; MATHEW, A. K.; MADHAVAN, A.; PANDEY, A. Applications of microbial enzymes in food industry. **Food Technology & Biotechnology**. United States of America, v. 56, n. 1, p. 16-30, jan/mar. 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5491>>. Acesso em: 14 maio 2024.

RAY, L.; PRAMANIK, S.; BERA, D. Enzimas - uma ferramenta existente e promissora da indústria de processamento de alimentos. **Patentes em biotecnologia**, v. 10, n. 1, p. 58-71, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.2174/1872208310666160727150153>>. Acesso em: 14 maio 2024.

RAZZAQ, A.; SHAMSI, S.; ALI, A.; ALI, Q.; SAJJAD, M.; MALIK, A.; ASHRAF, M. Microbial proteases applications. **Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n.1, p. 1-20, jun. 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2019.00110>> . Acesso em: 14 maio 2024.

RIGO, D; GAYESKI, L.; TRES, G. A.; CAMERA F. D.; ZENI, J.; VALDUGA, E.; CANSIAN, R. L.; BACKES, G. T. Produção Microbiológica de enzimas: Uma revisão. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 1, p. 9232-9254, jan. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.34117/BJDV7N1-624>>. Acesso em: 20 abril 2024.

ROBINSON, P. K. Enzimas: princípios e aplicações biotecnológicas. **Ensaio Biochem**, v. 59, n. 1, p. 1- 49. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1042/bse0590001>>. Acesso em: 14 maio 2024.

ROSALEM, M. T.; LOURENÇO, A. B. A. Técnicas de coloração. In: _____. **Manual de Microbiologia**. São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2023. p. 12-13.

SALAZAR, L. N.; DAL MASO, S. S.; OGIMBOSVSKI, T. A.; DARONCH, N. A.; ZENI, J.; VALDUGA, E.; BACKES, G. T.; CANSIAN, R. L. Production, Partial Characterization and Application of Cellulases by Newly Isolated *Penicillium* sp. Using

Agro-Industrial-Substrate Solid-State Fermentation. **Industrial Biotechnology**, v.15, n. 2, p. 79- 8810, 2019.

SALGADO, C. A.; SANTOS, C. I. A.; VANETTI, M. C. D. Lipases bacterianas: impactos na qualidade de produtos lácteos e potencial biotecnológico. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 13, out. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101509>>. Acesso em: 01 maio 2024.

SANTOS, A. F. *et al.* Peptidases em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. In: RESENDE, R. R. **Biotecnologia Aplicada à Agro & Indústria**. São Paulo: Blucher, 2017. p. 381 -438.

SANTOS, R. C.; BARBOSA, C. D.; LACERDA, IAC. Obtenção e caracterização de kombucha de chá preto. Anais da 69ª Reunião anual da SBPC, 2017.

SATHYANARAYANA, B. N.; VARGHESE, D. B. Plant Tissue Culture Media. In: _____ . **Plant tissue culture media: practices and new experimental protocols**. Índia: IK International Pvt Ltd, 2007. p. 29-54.

SCHROEDER, J. **Kombucha fermentada a partir de resíduo de acerola**. 2019. 47f. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2019. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/199730>>. Acesso em: 12 abril 2024.

SHURE, T.; **Kombuchas produzidas e comercializadas no Brasil: características físico-químicas e composição microbiana**. 2020. 64f. Dissertação de Mestrado. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul , Porto Alegre, 2020. Disponível em: <001115269.pdf (ufrgs.br)>. Acesso em: 12 abril 2024.

SILVA, C. *et al.* Isolamento e seleção de micro-organismos produtores de enzimas de interesse comercial. **Scientia Plena**. Sergipe v. 14, n. 2, jan 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.14808/sci.plena.2018.024201>> Acesso em: 02 jan 2025.

SILVA, O. S.; GOMES, M. H. G.; de OLIVEIRA, R. L.; PORTO, A. L. F.; CONVERTI, A.; PORTO, T. S. Novel Protease from *Aspergillus tamari* URM4634: Production and characterization using inexpensive agroindustrial substrates by solid state fermentation. **Advances in Enzyme Research**, Wuhan, v.4, n.4, p. 125-143, dez. 2016. Disponível em: <http://research.send4journal.com/id/eprint/1112/1/AER_2016120215431562.pdf>. Acesso em: 22 abril 2024.

SINGH, R.; SINGH, A.; SACHAN, S. Enzymes used in the food industry: Friends or foes? In: KUDDUS, M. **Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects**. Oxford: Academic Press, 2019. p. 827-843. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00048-7>>. Acesso em: 14 maio 2024.

SOARES, C. F.; ISHIMOTO, C. K.; BASTTESTIN, V. Vista do isolamento e seleção de microrganismos de fontes naturais da região de São Roque, SP para produção da enzima tanase. **Scientia Vitae**. São Roque, v. 1, n. 1, p. 43-49, jun. 2013. Disponível em: <<https://1library.org/document/y602w0gy-isolamento-selecao-microrganismos-fontes-naturais-regiao-roque-producao.html>>. Acesso em: 25 jun 2024.

SOMNATH, C.; BHATTACHARYA, S.; CHATZINOTAS, A.; CHAKRABORTY, W.;

BHATTACHARYA, D.; GACHHUI, R. Fermentação do chá de kombucha: dinâmica microbiana e bioquímica. **Revista Internacional de Microbiologia de Alimentos**. v. 220, n.1, p. 63-72, mar. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015>>. Acesso em: 12 abril 2024.

SPINOSA, Wilma Aparecida. **Isolamento, seleção, identificação e parâmetros cinéticos de bactérias acéticas provenientes de indústria de vinagre**. 2002. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2002.

SRIVASTAVA, N. Production of food-processing enzymes from recombinant microorganisms. In: KUDDUS, M. **Enzymes in food biotechnology: Production, Applications and Future Prospects**. Cambridge: Academic Press, 2019. p. 739-767.

STREDA, K.; SEVERO, J. Fermentação de alimentos de origem vegetal e seus benefícios à saúde. **Revista de Ciência e Inovação**, Santa Rosa, v.10, n.1, p. 1-22, jan. 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.26669/2448-4091.2024.395>>. Acesso em: 14 maio 2024.

SUKMA, A.; JOS, B.; SUMARDIONO, S. Cinética de crescimento de biomassa e formação de proteína na fermentação de farelo de arroz utilizando *Rhizopus oryzae*. **MATEC Web of Conferences**. v. 156, n.1, p. 01023, mar. 2018.

TAIPA, M. A.; GAMA, M. Estrutura e função das enzimas. In: CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R.; Gama, M. **Engenharia enzimática**. Lisboa: Lidel, 2003. v.1, p. 13-65.

TOMAZ, L. S. S. **Proteases na Indústria de Alimentos: uma revisão acerca dos tipos, características e aplicações**. 2023. 41f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2023. Disponível em: <<http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/75959>> . Acesso em: 22 abril 2024.

TRIBST, A. A. L.; LEITE JR, B. R. DE C. Produção de enzimas de origem animal e vegetal. In: LIMA, U. DE A. **Biotecnologia: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Blucher, 2019. p. 395-426.

VENTURIM, B. C. **Produção de kombucha a partir de diferentes inóculos brasileiros**. 2022. 66f. Dissertação de Mestrado. (Mestrado em Microbiologia Agrícola)- Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 2022. Disponível em: <<https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/31470/1/texto%20completo.pdf>>. Acesso em: 12 abril 2024.

VILLARREAL-SOTO, S. A.; BEAUFORT, S. BOUAJILA, J.; SOUCHARD, J. P.; TAILLANDIER, P. Entendendo a fermentação do chá de kombucha: uma revisão. **Journal of Food Science**. Chicago, v.83, n.3, p. 580-588, mar. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>>. Acesso em: 12 abril 2024.

VITOLO, M. Aplicações de enzimas na tecnologia de alimentos. In: MORAES, I. O. **Biотecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Blucher, 2021. p. 442-483.

ZHANG, Y. Y.; RUI, X.; SIMPSON, B. K. Trends in nanozymes development versus traditional enzymes in food science. **Food Science**, Guelph. v. 37, n.1, p. 10-16, fev. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.08.001>>. Acesso em: 14 maio 2024.