

**ANDRÉ RICARDO FERREIRA DA SILVA ROCHA**

**MICROBIOTA DE KOMBUCHAS BRASILEIRAS E RELAÇÃO COM SUA  
ATIVIDADE BIOLÓGICA *IN VITRO***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: José Guilherme Prado Martin

Coorientadores: Wendel Batista da Silveira  
Alexandre Fontes Pereira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

R672m  
2024

Rocha, André Ricardo Ferreira da Silva, 1995-  
Microbiota de kombuchas brasileiras e relação com sua  
atividade biológica *in vitro* / André Ricardo Ferreira da Silva  
Rocha. – Viçosa, MG, 2024.  
1 tese eletrônica (159 f.): il. (algumas color.).

Orientador: José Guilherme Prado Martin.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Microbiologia, 2024.

Referências bibliográficas: f. 139-159.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.320>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Bebidas fermentadas. 2. Indicadores de saúde.  
3. Compostos bioativos. I. Martin, José Guilherme Prado, 1983-.  
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 663.33


**ANDRÉ RICARDO FERREIRA DA SILVA ROCHA**

**MICROBIOTA DE KOMBUCHAS BRASILEIRAS E RELAÇÃO COM SUA  
ATIVIDADE BIOLÓGICA *IN VITRO***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.


APROVADA: 28 de fevereiro de 2024.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 **ANDRÉ RICARDO FERREIRA DA SILVA ROCHA**  
Data: 19/07/2024 14:49:22-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**André Ricardo Ferreira da Silva Rocha**  
Autor

Documento assinado digitalmente  
 **JOSE GUILHERME PRADO MARTIN**  
Data: 22/07/2024 08:19:29-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**José Guilherme Prado Martin**  
Orientador

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todas as pessoas que tornaram possível a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha família, que sempre esteve ao meu lado, oferecendo amor, incentivo e compreensão, eu expresso minha eterna gratidão. Seu apoio inabalável foi um pilar fundamental durante os desafios destes anos. Ao meu orientador Guilherme, pela orientação, paciência e apoio contínuo ao longo deste processo. Sua sabedoria, *insights* e *feedback* foram inestimáveis para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos amigos de laboratório e de Viçosa pelo apoio, colaboração e ombro ao longo destes anos. Nossas conversas e discussões foram fundamentais.

Thanks for the Agriculture and Food Development Authority (TEAGASC), Ireland, for contribution in metagenomic analysis, especially Dr. Paul D. Cotter and John Leech.

Agradeço também aos membros da banca examinadora por dedicarem seu tempo e expertise na avaliação deste trabalho e por seus comentários construtivos que contribuíram significativamente para a qualidade final desta tese. Por fim, gostaria de agradecer a Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Este trabalho não teria sido possível sem o apoio e contribuições de cada uma dessas pessoas. Obrigado a todos que fizeram parte desta jornada e ajudaram a tornar este sonho uma realidade.

Gratidão!

“[...] and in this moment, I swear, we are infinite”- The Perks of Being a Wallflower

## RESUMO

ROCHA, André Ricardo Ferreira da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2024. **Microbiota de kombuchas brasileiras e relação com sua atividade biológica *in vitro***. Orientador: José Guilherme Prado Martin. Coorientadores: Wendel Batista da Silveira e Alexandre Fontes Pereira.

Kombucha é uma bebida tradicionalmente fermentada por um consórcio microbiano denominado SCOBY. A atividade da comunidade microbiana da kombucha durante o processo fermentativo resulta na produção de grande diversidade de metabólitos, de reconhecida atividade biológica, incluindo compostos antioxidantes e antimicrobianos. O perfil e a dinâmica populacional dessas espécies impactam significativamente nas propriedades benéficas do chá fermentado. Neste trabalho, foram elucidadas a distribuição e estrutura da microbiota fermentadora de kombuchas produzidas a partir de matérias primas de diferentes regiões do Brasil, bem como sua contribuição para a diversidade de compostos com atividades biológicas produzidos durante o processo fermentativo. As principais correlações e interações entre as espécies microbianas que compõem a comunidade do chá fermentado foram demonstradas, bem como o papel de diversos microrganismos na biossíntese de compostos bioativos e atividade biológica. As kombuchas foram produzidas com 8 g (1 % p/v) de chá verde mantido em infusão durante 10 min, e 80 g (8 %) de sacarose; este chá adoçado foi acrescido com 10 % de *cultura starter* e SCOBY obtidos em diferentes regiões do país. As culturas foram fermentadas a 25 °C durante 21 dias. Foram realizados ensaios calorimétricos para quantificação de compostos fenólicos totais (TPC) e flavonoides totais (TFC) ao longo do processo de fermentação; análise do potencial antioxidante foram realizadas pelos métodos de redução dos radicais DPPH (1,1-difenil 2-picrilhidrazil) e ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico); a atividade antimicrobiana frente linhagens padrões de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), *Escherichia coli* (ATCC 11219) e *Salmonella enterica* (ATCC 14028) foi determinada nas amostras antes e após neutralização (pH: 7,0); os principais ácidos orgânicos, compostos fenólicos, açúcares residuais e etanol foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Análise metagenômica tipo *Shotgun* foi realizada para todas as amostras na fase líquida. Linhagens dos principais grupos microbianos foram isoladas após o processo de fermentação. O perfil bioativo e potencial antioxidante mostrou-se variável, com

melhores atividades identificadas em amostras principalmente após o 7<sup>o</sup> dia de fermentação. Uma comunidade bem estabelecida de bactérias do ácido acético foi observada, sobretudo de membros da família Acetobacteriaceae, composta principalmente por *Komagataeibacter* spp. Para leveduras, *Brettanomyces bruxellensis* foi predominante na maioria das amostras. A composição da comunidade microbiana dentre as regiões estudadas diferiu significativamente, bem como dentre as amostras de uma mesma região. Verificou-se a presença de diversos ácidos orgânicos resultantes da fermentação e/ou intermediários de reações metabólicas, com destaque para os ácidos acético, glicurônico e succínico, bem como compostos fenólicos, como ácido fólico. As redes de interações microbianas puderam ser agrupadas em cinco módulos, tendo *Komagataeibacter oboediens* como principal conectivo. As espécies mais abundantes, *Komagataeibacter saccharivorans* e *B. bruxellensis*, apresentaram correlações diretas com diversos microrganismos que favorecem o potencial bioativo da bebida, tais como *Komagataeibacter* spp., *Wickerhamiella sorbophila* e *Pediococcus pentosaceus*. A presença de *Acetobacter senegalensis* estimulou a produção de compostos fenólicos e flavonoides totais. Esta pesquisa tem potencial de orientar a seleção, modulação e padronização de consórcios microbianos como culturas *starter* para obtenção e validação de maiores benefícios relacionados ao consumo de kombucha.

Palavras-chave: Bebidas fermentadas. Benefícios à saúde. Compostos bioativos. SCOBY.

## ABSTRACT

ROCHA, André Ricardo Ferreira da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2024. **Microbiota of brazilian kombucha and their relationship with *in vitro* biological activity.** Adviser: José Guilherme Prado Martin. Co-adviser: Wendel Batista da Silveira and Alexandre Fontes Pereira.

Kombucha is beverage traditionally fermented by a microbial consortium called SCOBY. The activity of kombucha microbial community during the fermentative process results in production of wide range of metabolites, with recognized biological activity, including antioxidant and antimicrobial compounds. The profile and population dynamics of these species significantly impact the beneficial properties of fermented tea. In this work, the distribution and structure of microbiota fermenting kombuchas produced from raw materials from different regions of Brazil were elucidated, as well as its contribution to diversity of compounds with biological activities produced during the fermentation process. The main correlations and interactions between the microbial species that make up the fermented tea community were demonstrated, as well as role of different microorganisms in biosynthesis of bioactive compounds and biological activity. The kombuchas were produced with 8 g (1% w/v) of green tea kept infused for 10 min, and 80 g (8%) of sucrose; this sweetened tea was added with 10 % starter culture and SCOBY obtained in different regions of country. The cultures were fermented at 25 °C for 21 days. Calorimetric tests were carried out to quantify total phenolic compounds (TPC) and total flavonoids (TFC) throughout the fermentation process; analysis of antioxidant potential was carried out using the radical reduction methods DPPH (1,1-diphenyl 2-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)); antimicrobial activity against standard strains of *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), *Escherichia coli* (ATCC 11219) and *Salmonella enterica* (ATCC 14028) was determined in samples before and after neutralization (pH: 7.0); the main organic acids, phenolic compounds, residual sugars and ethanol were quantified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Shotgun metagenomic analysis was performed for all samples in liquid phase. Strains from main microbial groups were isolated after the fermentation process. The bioactive profile and antioxidant potential showed It was variable, with better activities identified in samples mainly after 7th day of fermentation. A well-established community of acetic acid bacteria was observed,

mainly members of the Acetobacteriaceae family, mainly composed of *Komagataeibacter* spp. For yeast, *Brettanomyces bruxellensis* was predominant in most samples. The composition of microbial community between the regions studied differed significantly, as well as between samples from same region. The presence of several organic acids resulting from fermentation and/or intermediates of metabolic reactions was verified, mainly acetic, glururonic and succinic acids, as well as phenolic compounds, such as folic acid. The microbial interaction networks could be grouped into five modules, with *Komagataeibacter oboediens* as main connective. The most abundant species, *Komagataeibacter saccharivorans* and *B. bruxellensis*, showed direct correlations with several microorganisms that favor bioactive potential of beverage, such as *Komagataeibacter* spp., *Wickerhamiella sorbophila* and *Pediococcus pentosaceus*. The presence of *Acetobacter senegalensis* stimulated the production of phenolic compounds and total flavonoids. This research has the potential to guide the selection, modulation and standardization of microbial consortia as starter cultures to obtain and validate greater benefits related to kombucha consumption.

Keywords: Fermented beverage; Health benefits; Bioactive compounds; SCOBY.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Aumento do teor de compostos bioativos (fenólicos totais e flavonoides totais) após fermentação a 25 °C ao longo de 21 dias em diferentes amostras de kombucha ..... 57
- Figura 2 – Diferenças entre os diferentes tempos de fermentação no teor de compostos bioativos (fenólicos totais e flavonoides totais) a 25 °C em amostras de kombuchas brasileiras ..... 58
- Figura 3 – Comparação entre a atividade antioxidante *in vitro* de amostras de kombucha brasileiras, após fermentação à 25 °C por 7 e 10 dias, pelos ensaios de redução do (a) radical 1-difenil 2-picrilhidrazil (DPPH) e (b) radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) ..... 60
- Figura 4 – Correlação entre o teor de compostos bioativos (fenólicos e flavonoides totais) com a atividade antioxidante em diferentes amostras de kombucha brasileiras após fermentação a 25 °C durante 7 dias ..... 63
- Figura 5 – Atividade antioxidante (ensaio DPPH e ABTS) *in vitro* de amostras de kombucha brasileiras, após fermentação a 25 °C durante 7 dias ..... 65
- Figura 6 – Correlação entre as diferentes amostras de kombuchas brasileiras em termos de composição bioativa e atividade antioxidante ..... 67
- Figura 7 – Perfil de atividade antimicrobiana e similaridade entre amostras de kombucha brasileiras após fermentação a 25 °C durante 7 dias, frente microrganismos de importância alimentar ..... 69
- Figura 8 – Composição metagenômica de comunidades presentes na fase líquida em diferentes kombucha brasileiras ..... 73
- Figura 9 – Distribuição dos principais gêneros de bactérias (a) e leveduras (b) em comunidades presentes na fase líquida em diferentes kombuchas brasileiras ..... 75
- Figura 10 – Espécies mais abundantes na comunidade metagenômica de kombucha brasileiras após fermentação de 25 °C durante 7 dias ..... 76
- Figura 11 – Índices e estimadores de diversidade (alfa) a nível de gênero a partir dos dados para os diferentes grupos nas amostras de kombuchas brasileiras ..... 82
- Figura 12 – Agrupamento e correlação entre as diferentes amostras baseada no perfil de distribuição metagenômica das comunidades ..... 85
- Figura 13 – Distribuição de bactérias e leveduras em kombuchas brasileiras após fermentação a 25 °C por 7 dias ..... 87
- Figura 14 – Abundância relativa (%) (a) e agrupamento (b) das amostras de kombucha baseado na distribuição de bactérias e leveduras na comunidade microbiana ..... 88

Figura 15 – Correlação entre o perfil bioativo e proporção de bactérias e leveduras na comunidade microbiana de kombucha .....	89
Figura 16 – Curva de rarefação do esforço amostral para cada região do Brasil .....	91
Figura 17 – Distribuição dos principais gêneros de bactérias na microbiota kombuchas brasileiras .....	92
Figura 18 – Distribuição dos principais gêneros de leveduras na microbiota kombuchas brasileiras .....	93
Figura 19 – Distribuição das principais espécies de bactérias e leveduras em comunidades presentes na fase líquida de kombucha com origem em diferentes regiões do Brasil .....	95
Figura 20 – Distribuição da abundância relativa de espécies para amostras de kombucha de cada região .....	97
Figura 21 – Agrupamento (a) e correlação (b) entre as diferentes regiões do Brasil baseada no perfil de distribuição metagenômica das comunidades .....	98
Figura 22 – Correlação entre as 50 espécies mais abundantes e o potencial bioativo de kombucha brasileiras .....	107
Figura 23 – Dinâmica de correlação ( $p < 0,05$ ) entre as 50 espécies mais abundantes que compõem o consórcio microbiano da kombucha .....	108
Figura 24 – Principais interações entre as espécies que compõem a rede na microbiota total de kombucha .....	113
Figura 25 – Relação entre os gêneros dominantes, <i>Komagataeibacter</i> sp. e <i>Brettanomyces</i> sp., e o perfil bioativos e antioxidantes da fermentação da kombucha .....	119
Figura 26 – Distribuição da concentração de açúcares residuais em amostras de kombucha após 7 dias de fermentação .....	126
Figura 27 – Relação entre os índices e estimadores de diversidade microbiana e o perfil bioativo da bebida fermentada .....	128
Figura 28 – Árvore filogenética baseada na sequência 26S rDNA dos isolados e sequências padrões de espécies de bactérias do ácido acético frequentemente isoladas em kombucha .....	135

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diversidade de parâmetros utilizados no processo de fermentação do chá para produção de kombucha.....	21
Tabela 2 – Variações no preparo de amostras de SCOBY de fermentação kombucha para análise metagenômica.....	37
Tabela 3 – Teor de compostos fenólicos (TPC) e flavonoides totais (TFC) in vitro de amostras de kombucha brasileiras após fermentação a 25 °C durante 21 dias .....	54
Tabela 4 – Perfil de atividade antioxidante (ensaio DPPH e ABTS) in vitro de amostras de kombucha após fermentação a 25 °C por 7 e 10 dias .....	59
Tabela 5 – Atividade antioxidante (ensaios de DPPH e ABTS) e teores de compostos fenólicos totais (TPC) e flavonoides totais (TFC) in vitro de amostras de kombucha brasileiras após fermentação a 25 °C durante 7 dias .....	61
Tabela 6 – Atividade antimicrobiana in vitro (teste de disco-difusão) de amostras de kombuchas brasileiras, após fermentação de 7 dias a 25 °C (halos de inibição em mm) .....	68
Tabela 7 – Índices e estimadores de diversidade (alfa) a nível de gênero a partir dos dados para os diferentes grupos nas amostras de kombuchas brasileiras .....	79
Tabela 8 – Índices e estimadores de diversidade (alfa) a nível de espécie a partir dos dados do metagenoma (bactérias e leveduras) das diferentes amostras de kombuchas brasileiras .....	84
Tabela 9 – Composição química de diferentes amostras de kombucha após o 7º dia de fermentação (25 °C) .....	104
Tabela 10 – Dinâmica da rede de interações entre as principais espécies que compõem a microbiota total de kombucha .....	115
Tabela 11 – Espécies exclusivas identificadas nas amostras avaliadas .....	121
Tabela 12 – Quantificação de açúcares residuais em amostras de kombucha após 7 dias de fermentação .....	124
Tabela 13 – Anotação das sequências de bactérias e leveduras dos isolados da fase líquida de kombucha brasileiras após fermentação a 25 °C durante 7 dias .....	130

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABTS	2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
Anti SA	Antimicrobiano frente <i>Staphylococcus aureus</i>
Anti SE	Antimicrobiano frente <i>Salmonella enterica</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAA	Bactérias do Ácido Acético
BAL	Bactérias do Ácido Lático
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm <sup>2</sup>	Centímetros quadrado
CNF	Chá Não Fermentado
CO	Centro-oeste
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	1,1-difenil 2-picrilhidrazil
EAA	Equivalente de Ácido Ascórbico
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
EQ	Equivalente de Quercetina
ET	Equivalente de Trolox
GYC	<i>Yeast Extract Glucose Carbonate</i>
h	Horas
MBC	Concentração Bactericida Mínima
MHA	<i>Mueller – Hinton Agar</i>
MIC	Concentração Inibitória Mínima
min	Minutos
mL	Miligrama
mM	Micromolar
mm	Milímetro
MRS	<i>De Man Rogosa Sharpe</i>
nm	Nanômetro
NO	Nordeste
OD	Densidade Óptica
p/v	Peso/Volume

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
rpm	Rotação por Minuto
RT	Tempo de Retenção
SCOBY	<i>Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast</i>
SD	Sudeste
SL	Sul
TFC	Conteúdo de Flavonoides Totais
TPC	Conteúdo de Fenólicos Totais
TSA	Ágar Triptona de Soja
U	Unidade Enzimática
UFC	Unidade Formadora de Colônia
v/v	Volume/Volume
YGC	<i>Yeast Extract Glucose</i>
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	19
2.1. Processo de fermentação da kombucha.....	19
2.2. Influência dos parâmetros fermentativos nas características da kombucha .....	20
2.3. Composição bioativa e atividade biológica .....	24
2.3.1. Compostos bioativos e benefícios à saúde .....	24
2.3.2. Atividade antioxidante .....	24
2.3.3. Atividade antimicrobiana .....	27
2.3.4. Outros benefícios associados .....	29
2.4. Composição e diversidade microbiana .....	30
2.5. Análise metagenômica .....	34
2.5.1. Fase líquida .....	34
2.5.2. Fase sólida .....	36
2.6. Papel da composição e perfil da comunidade na produção de compostos bioativos .....	39
3. OBJETIVOS .....	43
3.1. Objetivo Geral .....	43
3.2. Objetivos específicos .....	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	44
4.1. Obtenção das culturas iniciais e condições de fermentação .....	44
4.2. Análise de composição bioativa .....	44
4.2.1. Conteúdo de compostos fenólicos totais (TPC).....	44
4.2.2. Conteúdo de flavonoides totais (TFC).....	45
4.3. Atividade antioxidante.....	45
4.3.1. Redução do radical DPPH (1,1-difenil 2-picrilhidrazil) .....	45
4.3.2. Redução do radical ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sul-fônico) .....	46
4.4. Atividade antimicrobiana .....	46
4.4.1. Método de difusão em ágar .....	47
4.4.2. Concentrações inibitórias e bactericidas mínimas (MIC/MBC) ...	47
4.5. Análise do perfil metabólico .....	48
4.5.1. Ácidos orgânicos e etanol .....	48
4.5.2. Compostos fenólicos .....	48
4.5.3. Açúcares residuais .....	49
4.6. Análise metagenômica tipo <i>Shotgun</i> .....	49
4.6.1. Extração de DNA metagenômico .....	49
4.6.2. Preparo das bibliotecas genômicas e sequenciamento .....	50
4.6.3. Análise dos metadados .....	50
4.7. Seleção e isolamento de linhagens microbianas .....	51
4.8. Identificação taxonômica do isolados .....	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	53
5.1. Biossíntese de compostos bioativos em amostras de kombucha ao longo do processo de fermentação .....	53
5.2. Perfil de atividade antioxidante em amostras de kombucha em 7 e 10 dias de fermentação .....	59
5.3. Diferentes perfis de composição bioativa e atividade biológica em kombucha brasileiras .....	61

5.3.1 Atividade antimicrobiana .....	67
5.4. Estrutura taxonômica e diversidade microbiana de kombucha brasileiras .....	72
5.5 Efeito da proporção entre bactérias e leveduras no perfil bioativo.....	86
5.5 Influência da origem do SCOBY na diversidade microbiana de kombucha brasileiras .....	90
5.7 Efeito da interação e dinâmica da comunidade microbiana no perfil químico e bioativo da kombucha .....	101
5.8 Relação entre <i>Komagataeibacter</i> sp. e <i>Brettanomyces</i> sp. e atividade antioxidante na kombucha .....	119
5.9 Papel da composição de espécies exclusivas .....	120
5.10 Eficiência de leveduras na hidrólise da sacarose inicial e concentração de açúcar residual .....	124
5.11 Influência da diversidade microbiana no perfil bioativo da bebida fermentada .....	127
5.12 Microrganismos isolados de kombucha brasileiras .....	129
6. CONCLUSÕES .....	137
REFERÊNCIAS .....	139

## 1. INTRODUÇÃO

Kombucha é uma bebida obtida a partir da fermentação de chá adoçado (*Camellia sinensis*) por um consórcio microbiano popularmente conhecido como SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*) (BRASIL, 2019). Este é composto por bactérias do ácido acético, principalmente *Komagataeibacter* spp., *Acetobacter* spp., *Gluconobacter* spp. e *Gluconacetobacter* spp., enquanto a comunidade de leveduras inclui predominantemente *Brettanomyces* spp. e *Saccharomyces* spp.; além disso, bactérias lácticas podem ocorrer em menor abundância (Yuan et al., 2022; Yao et al., 2023). Esta heterogeneidade na microbiota representa um dos maiores desafios para o controle de produção da bebida, uma vez que a dinâmica populacional é complexa e depende de diferentes variáveis, especialmente das condições do meio fermentativo (Pradhan et al., 2023). Assim, variações no processo de fermentação influenciam na dinâmica e sucessão de crescimento microbiano (Landis et al., 2022).

As reações metabólicas que ocorrem durante a fermentação da kombucha resultam na produção de intermediários e metabólitos secundários com importantes aplicações medicinais e biotecnológicas (Villarreal-Soto et al. 2018). Potenciais efeitos benéficos associados ao consumo de kombucha podem ser modulados positivamente através do controle da microbiota (Villarreal-Soto et al. 2020). Atualmente, é de grande interesse pesquisas que visem elucidar o papel da comunidade microbiana do chá fermentado, e como estes influenciam na estabilização do microbioma e no perfil de atividade biológica; essa comunidade inclui, ainda, microrganismos em estado não cultivável (VNC), que demandam estudos independentes de cultivo (Reva et al. 2015).

Existe uma relação entre a dinâmica da microbiota do chá e a produção de compostos bioativos. Para Villarreal-Soto et al. (2020), bebidas que possuem maior abundância de *Komagataeibacter xylinus* tanto na fase sólida quanto na líquida, e *Schizosaccharomyces pombe* na fase líquida, demonstraram maior efeito anti-inflamatório. Dentre as diferentes interações que ocorrem na microbiota da kombucha, a ocorrência de *Komagataeibacter rhaeticus*, que apresenta vias completas para a biossíntese de vitaminas do grupo B, favorece o crescimento de *Zygosaccharomyces bailii*, que requer esse grupo de vitaminas para seus processos metabólicos (Arikan et al. 2020); *Z. bailii* por sua vez, apresenta vias e genes que influenciam positivamente na manutenção das respostas ao estresse oxidativo em diferentes microrganismos, incluindo *Saccharomyces cerevisiae* (Coleman et al. 2001), que favorece o aumento

da atividade antioxidante quando em predominância na comunidade microbiana (Malbaša et al. 2011).

Além do perfil bioativo, a heterogeneidade do consórcio microbiano da kombucha proporciona variações nas características sensoriais do produto. Dentre as propriedades dos ácidos orgânicos presentes, destaque para o ácido glicônico, que proporciona sabor refrescante e acidez suave (Ramachandran et al. 2006), um dos principais descritores de qualidade sensorial do sabor para o chá fermentado (Neffe-Skocińska et al. 2017).

Segundo Mônico (2019), as expectativas do consumidor em relação à kombucha levam em consideração sobretudo os efeitos benéficos decorrentes do seu consumo, bem como perfil sensorial agradável. Dessa forma, a interdependência e correlação de características no processo de produção merecem destaque. Nesse contexto, este trabalho tem por objetivo elucidar o papel da comunidade microbiana nas características funcionais da bebida.

Nesse estudo, elucidou-se o perfil e estrutura da microbiota fermentadora de kombuchas produzidas e comercializadas no Brasil, bem como sua contribuição para a diversidade de compostos secundários com atividades biológicas produzidos durante o processo fermentativo. Descreveu-se ainda, as principais interações simbióticas e não simbióticas entre as espécies microbianas que compõem a comunidade do chá fermentado, bem como buscou-se possíveis correlações entre as populações microbianas e a biossíntese de metabólitos relacionados ao potencial bioativo da kombucha. Através da correlação entre a abundância relativa desses compostos e a dominância das espécies presentes no consórcio, tal qual suas interações, foi possível prever meios de controle desses fatores. Dessa forma, esta pesquisa tem potencial de orientar a seleção, modulação e padronização de consórcios microbianos como culturas *starter* para obtenção e validação de maiores benefícios relacionados ao consumo de kombucha.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Processo de fermentação da kombucha

O processo de fermentação é um dos métodos mais antigos de conservação de alimentos descritos; promove a valorização nutricional de alimentos e bebidas; esse processo preserva e transforma matérias-primas alimentares por meio do crescimento e metabolismo microbiano (Lavefve et al., 2019). Atualmente, o aumento do consumo de alimentos fermentados é impulsionado por suas propriedades biológicas e benefícios nutricionais propostos (Dimidi et al., 2019; Voidarou et al., 2020).

A kombucha possui origem asiática, porém, com popularidade no Ocidente devido aos seus potenciais biológicos associados ao consumo regular; a fermentação tradicional é realizada a partir do chá adoçado de *Camellia sinensis*, apesar de outros chás serem comumente empregados (Chakravorty et al., 2016). O uso desta espécie para obtenção do chá é obrigatório na produção em território nacional, de acordo com o estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por meio da Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019 (Brasil, 2019); outros tipos de chás, no entanto, são popularmente empregados na sua elaboração (Chakravorty et al. 2016).

A concentração de chá e açúcar, assim como o tempo e temperatura de fermentação utilizados são variados, e dependem da preferência do consumidor (Jayabalan et al., 2016). A bebida é fermentada sobretudo por espécies ácido tolerantes (De Filippis et al., 2018). O mercado global está em crescimento acelerado, e estima-se que em 2025 atinja entre US\$ 3,5 a 5 bilhões (GMI, 2019; Kim & Adhikari, 2020).

A fermentação decorre da atividade de espécies ácido tolerantes que compõem SCOBY e a cultura *starter* adicionados no início do processo (De Filippis et al. 2018). A composição microbiana da kombucha pode variar significativamente dependendo do tipo de SCOBY utilizado, tanto em relação ao perfil de espécies, quanto à abundância relativa de cada uma delas e na estruturação de dominância no inóculo; a composição da comunidade pode, portanto, impactar nas propriedades benéficas atribuídas à bebida (Chakravorty et al. 2016). Diversos compostos bioativos são relatados no produto final, tanto oriundos do chá utilizado, como compostos

fenólicos, polissacarídeos, vitaminas, minerais, aminoácidos, quanto resultado da atividade metabólica dos microrganismos, como polifenóis, ácidos orgânicos, vitaminas, enzimas e bacteriocinas (Antolak, Piechota e Kucharska, 2021).

## **2.2. Influência dos parâmetros fermentativos nas características da kombucha**

Os diversos parâmetros e variações do processo de fermentação são determinantes para a composição química e microbiológica da kombucha (Tabela 1), o que, por sua vez, influencia nas propriedades benéficas atribuídas a bebida (Coelho et al. 2020). O estudo desse processo visa principalmente à determinação das condições ideais de fermentação, de forma a otimizar e controlar a abundância relativa das espécies envolvidas na produção e transformação de compostos potencialmente bioativos (Villarreal-Soto, et al. 2018).

Tabela 1. Diversidade de parâmetros utilizados no processo de fermentação do chá para produção de kombucha.

Água (mL)	Teor de açúcar (g)	Folhas de chá (g)	Infusão (min)	Cultura <i>starter</i> (mL)	SCOBY (g)	Temperatura de fermentação (°C)	Tempo de fermentação (dias)	Referência
1000	70	4	15	100	-	28	12	Ahmed et al. (2020)
1350	150	9	10	150	100*	28	15	Arikan, et al. (2020)
1500	120	22,5	15	150	75	28	15	Barbosa et al. (2020)
2000	100	7,2	15	200	-	25	15	Treviño-Garza et al. (2020)
1000	70	10	15	10	20	25	15	Villarreal-Soto et al. (2020)
1000	80	8	3	100	10	27	14	Gaggia et al. (2019)
100	10	1	15	10	NE	28	10	Tu et al. (2019)
1000	100	10	10	30	20	20; 30	21	De Filippis et al. (2018)
1000	100	8	10	20	-	28	14	Zhao et al. (2018)
2000	200	16	10	100	NE	25	10	Cardoso et al. (2017)
1000	50	5	10	NE	NE	21	NE	May et al. (2017)
1000	100	6	15	60	50	20; 25; 30	10	Neffe-Skocińska et al. (2017)
300	30	8	5	30	NE	TA	14	Chakravorty et al. (2016)

Continua

								Conclusão
1000	100	1	NE	100	5g	NE	8	Nguyen et al. (2015)
2000	200	9,8	15	200	NE	23	10	Marsh et al. (2014)
1000	70	1,5	5	NE	-	28	10	Malbaša, et al. (2011)
200	20	2,4	5	20	6 g	24	18	Jayabalan et al. (2007)

\* mm<sup>2</sup>. NE: Não especificado. (-) Não aplicado.

Dentre as principais variáveis a serem consideradas, destaca-se a composição microbiana do SCOBY; as variações no processo de fermentação estabelecerão o perfil e dinâmica do crescimento e produção de compostos (Villarreal-Soto et al. 2020); além disso, fatores como o substrato utilizado (Ayed et al. 2016; Rahmani et al. 2019), fontes de carbono (Watawana et al. 2015; Muhialdin et al. 2019; Vohra et al. 2019), temperatura (De Filippis et al. 2018; Cardoso, et al. 2020) e tempo de fermentação determinam a cinética do processo, bem como a produção de metabólitos secundários (Vohra et al. 2019; Cardoso, et al. 2020).

O perfil bioativo relatado para a kombucha fermentada a partir do chá de *C. sinensis* é geralmente mais diverso que o observado para fermentação utilizando outros substratos, como cevada e arroz; foram verificadas reduções do radical DPPH de 89,69 e 36,04 % no chá fermentado tradicional e à base de arroz, respectivamente (Ahmed, Hikal e Abou-Taleb, 2020). Ainda, o chá verde apresenta maior atividade biológica que o chá preto na maioria dos casos relatados na literatura (Battikh et al. 2013; Cardoso et al. 2020).

O tempo de fermentação é um importante parâmetro a ser considerado. Períodos de fermentação acima de 14 dias podem reduzir a atividade antioxidante (Muhialdin et al. 2019); períodos entre 7 (Ivanišová et al. 2020) e 8 dias (Ahmed, Hikal e Abou-Taleb, 2020) estão geralmente associados ao maior potencial de redução de radicais livres. Entretanto, tem-se evidenciado maior atividade antimicrobiana fermentações prolongadas (Mizuta et al. 2020), com tempos de até 21 dias (Battikh et al. 2013), considerado demasiadamente longo e com reflexos negativos nas características sensoriais do produto final.

Diferentes fontes de carbono também podem afetar o potencial biológico da kombucha. O chá fermentado com açúcar de coco fornece uma bebida com maior atividade antioxidante *in vitro*, em comparação ao açúcar refinado branco (Muhialdin et al. 2019). Esse perfil é semelhante ao verificado tanto no chá verde, quanto no preto, onde a fermentação com açúcar mascavo obteve atividade antioxidante mais elevada que a verificada com açúcar branco ou mel (Vohra, et al. 2018).

## 2.3. Composição bioativa e atividade biológica

### 2.3.1. Compostos bioativos e benefícios à saúde

Os metabólitos derivados do chá e produtos da fermentação incluem diversos ácidos orgânicos, como o glicônico (Sainz et al. 2016; Wang et al. 2020), glicurônico, acético, fólico (Baschali et al. 2017), ascórbico (Kaewkod, Bovonsombut, e Tragoolpua, 2019), succínico, málico (Gomes et al. 2018); estão presentes, ainda, aminoácidos, como teanina, alguns minerais como potássio, manganês, íons de flúor, vitaminas E, K (Ivanišová et al. 2020), além de vitaminas do complexo B, polifenóis e fenóis, como o ácido gálico e fólico, dentre outros compostos associados aos benefícios à saúde decorrentes do consumo do chá fermentado (Baschali et al. 2017; Kapp e Sumner, 2018).

Um amplo espectro de efeitos biológicos tem sido descrito para a kombucha, com diferentes benefícios potenciais para a saúde humana (Molares, 2020). Atividade antioxidante (Muhialdin et al. 2019; Gaggia et al. 2019; Villarreal-Soto et al. 2019; Ahmed et al. 2020; Cardoso et al. 2020; Ivanisova et al. 2020; Mizuta et al. 2020; Villarreal-Soto et al. 2020; Vitas et al. 2020), antimicrobiana/ antiviral (Vohra et al. 2018; Bhattacharya et al. 2020; Pei et al. 2020), anti-inflamatória/ imunomoduladora (Vazquez-Cabral et al. 2017; Villarreal-Soto et al. 2020), antiproliferativa/ antitumoral (Utoiu et al. 2018; Kaewkod et al. 2019), hipocolesterolêmica (Zubaidah et al. 2019), anti-hipertensiva (Hrnjez et al. 2014; Vitas et al. 2020), antidiabética/ hipoglicêmica (Watawana, Jayawardena e Waisundara, 2018), hepatoprotetora (Wang et al. 2014) neuroprotetora (Kabiri e Setorki, 2016), de desintoxicação (Taheur et al. 2020) e moduladora da microbiota intestinal (Jung et al. 2019) tem sido relatadas.

### 2.3.2. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante é um dos principais efeitos relacionados aos metabólitos presentes no chá após o processo de fermentação, e é o mais amplamente estudado, embora a ação de moléculas isoladas seja raramente discutida (Morales, 2020); a eliminação dos radicais DPPH e ABTS é comumente relatada para kombucha (Ahmed, Hikal, & Abou-Taleb, 2020; Villarreal-Soto et al., 2020). Diversos

estudos correlacionam a atividade antioxidante ao TPC (Xu et al., 2017). Alguns benefícios do consumo da kombucha relatados, tais como atividade anti-inflamatória, anticancerígena e aumento da imunidade, podem estar relacionados ao seu potencial antioxidante, sobretudo aos polifenóis e ácidos orgânicos produzidos (Vijayaraghavan et al., 2000).

A atividade antioxidante do chá, aumenta significativamente durante a fermentação, sobretudo próximo ao 8º dia (Amarasinghe et al., 2018; Ahmed, Hikal & Abou-Taleb, 2020); o mesmo perfil foi observado em relação ao TPC (Ahmed, Hikal & Abou-Taleb, 2020). O aumento de capacidade de redução de radicais pelo chá durante o processo fermentativo ocorre devido a conversão metabólica dos constituintes presentes por enzimas microbianas (Lobo, Dias & Shenoy, 2017; Ivanisova et al., 2020), esses aspectos sugerem que o chá fermentado é uma importante fonte para o desenvolvimento das bebidas funcionais.

Compostos como ácido glicônico, derivados de tearubiginas e moléculas como ácido ascórbico ou ácido D-sacarico-1,4-lactona (DSL) possuem a capacidade de inibir a atividade da  $\beta$ -glucuronidase, o que favorece a redução da produção de compostos com ação oxidativa e tóxicos (Chu e Chen, 2006). O teor de tearubiginas aumenta gradualmente durante a fermentação do chá e está correlacionado com a diminuição do conteúdo de catequinas, como epicatequina (EC) e galato de epigalocatequina (EGCG) (Kim et al. 2011); isso ocorre devido à fermentação oxidativa desses compostos (Haslam, 2003).

Em alguns casos, porém, as concentrações de catequinas, como a EC, EGCG e galato de galocatequina (GCG), aumentam significativamente durante a fermentação do chá; enquanto outras, como a galocatequina (GC), são formadas principalmente pelo metabolismo microbiano, não estando presentes inicialmente no chá (Lobo, Dias e Shenoy, 2017). A catequina EGCG é um dos compostos fenólicos mais abundante na kombucha (Vázquez-Cabral et al. 2017, Zhao et al. 2018; Cardoso et al. 2020), e está diretamente relacionada à capacidade antioxidante (Cardoso et al. 2020).

A atividade antioxidante das catequinas está diretamente associada à sua estrutura química; tem como mecanismo de ação a transferência rápida de elétrons para radicais induzidos por espécies reativas de oxigênio (Anderson et al., 2001), além

de evitar a desaminação de radicais (Sutherland et al., 2006) e possuírem alto número de grupos hidroxila, facilmente reativas (Zhao et al., 2001).

A composição fenólica da kombucha, tanto para chá verde quanto preto, inclui predominantemente os flavonoides (70,2 %), seguidos dos ácidos fenólicos (18,3 %), demais polifenóis (8,4 %), lignanos (2,3 %) e estilbenos (0,8 %) (Cardoso et al. 2020). Dessa forma, os flavonoides consistem em um grupo presente em altos teores na bebida (Ivanišová et al. 2020; Wang et al. 2020), e apresentam um amplo espectro de atividades químicas e biológicas já comprovadas, como potencial antioxidante, antimicrobiano, modulação da atividade enzimática e inibição da proliferação celular (Nyiew, Kwong e Yow, 2022).

O teor de flavonoides, expresso principalmente em equivalentes de quercetina (EQ/mL), mostra uma tendência de aumento durante a fermentação do chá (Lobo, Dias e Shenoy, 2017); esses flavonóis possuem alto poder antioxidante, e características estruturais necessárias para a atividade de eliminação de radicais livres, tendo como mecanismo de ação a doação de um próton, tornando-se um radical não reativo e de baixa energia (Mariani et al., 2008).

Após um período de fermentação de 7 dias a 22 °C em chá preto, a concentração de compostos fenólicos totais (TPC) é predominantemente composta dos ácidos gálico, clorogênico, protocatecuico, p-cumárico, elágico, além de rutina, vitexina, resveratrol e flavonoides. Compostos complexos são degradados em moléculas menores durante a fermentação, alterando sua atividade biológica (Ivanišová et al., 2020). A compreensão de como ocorre esse processo de biotransformação de compostos durante a fermentação é crucial para o estabelecimento de um perfil químico que maximize as propriedades bioativas da kombucha. Diversos outros compostos fenólicos bioativos foram relatados em alta abundância, como o ácido 5-O-galoilquínico, quercetina 3-O-rhamnosil-ramnosil-glicosídeo, quercetina 3-O-glucosil-ramnosil-galactosídeo, ácido 3-[2-(carboximetil) - 3,4-dihidroxifenil] prop-2-enóico, ácido 4-coumaroilquínico e 1-O-cafeoilquínico (Cardoso et al. 2020).

Importante destacar que, mesmo antes da fermentação, o chá de *C. sinensis* apresenta compostos fenólicos com atividade antioxidante consolidadas na literatura, tais como flavonóis, catequina, epicatequina, epigalocatequina, galato de epicatequina, galato de epigalocatequina, teaflavinas, thearubiginas, que podem

reduzir ou aumentar seus teores dependendo dos processos metabólicos que ocorram durante a fermentação (Lorenzo & Munekata, 2016).

O tratamento térmico reduz a atividade antioxidante e TPC na kombucha, não sendo um método de preservação eficaz (Jayabalan et al., 2008; Ahmed, Hikal & Abou-Taleb, 2020). Temperaturas próximas a 100 °C durante 10 min reduzem o potencial em até 35,95%, apesar disso, altas temperaturas não causa variações significativas em parâmetros como o pH, acidez total e teor de proteína totais (Ahmed, Hikal & Abou-Taleb, 2020).

### 2.3.3. Atividade antimicrobiana

A capacidade antimicrobiana na kombucha é relacionada principalmente ao teor de ácido acético (Kaewkod, Bovonsombut, e Tragoolpua, 2019); entretanto, estudos tem demonstrado que o efeito é também oriundo de diversas outras moléculas presentes no chá ou produzidas durante o processo de fermentação. Essas moléculas podem, ainda, ter seus efeitos potencializados por interações sinérgicas com os ácidos orgânicos produzidos (Morales, 2020). A presença de compostos fenólicos mesmo em baixas concentrações, como catequinas, tem demonstrado alta correlação com a atividade antimicrobiana (Cardoso et al. 2020), especialmente contra os patógenos alimentares *Escherichia coli* e *Salmonella*.

O chá verde fermentado a 25 °C por 10 dias apresentou capacidade de inibir o crescimento de *Salmonella* sp. (ATCC 14028), *E. coli* (ATCC 11219), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), em uma concentração inibitória mínima (CIM) de 250 µL/mL. A atividade antimicrobiana foi relacionada à presença de compostos do grupo das catequinas e ao glicosídeo verbascosídeo (Cardoso et al. 2020); este último, além de potencial antimicrobiano, possui propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antitumorais (Alipieva et al. 2014), sendo encontrado apenas no chá verde (Deribew, Endale e Melaku, 2018).

A atividade antimicrobiana aumenta com o tempo de fermentação (Mizuta et al., 2020). Inibição foi verificada para *Staphylococcus epidermidis* (CIP 106510), *S. aureus* (ATCC 25923), *Micrococcus luteus* (NCIMB 8166), *E. coli* (ATCC 35218), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella* Typhimurium (LT2), *L. monocytogenes* (ATCC 19115) e *Candida* sp., com kombucha de chá verde

fermentada por 21 dias; nas mesmas condições, o chá preto fermentado apresentou efeito apenas frente *P. aeruginosa* e *Salmonella* sp.; esse efeito é principalmente devido ao ambiente ácido gerado pelo acúmulo de ácido acético e/ou outros ácidos orgânicos, uma vez que, quando neutralizado o pH, a bebida possui atividade reduzida ou inibida (Battikh et al., 2013).

Chá verde fermentado durante 14 dias demonstrou significativa atividade inibitória contra espécies de *Alicyclobacillus*, como *A. acidoterrestris*, *A. herbarius*, *A. acidiphilus*, *A. cycloheptanicus* e *A. hesperidum* em baixas concentrações (0,195 %), além de atividade bactericida em concentrações mais elevadas (6,25 – 25 %); ambos efeitos foram reduzidos na kombucha fermentada por 7 dias, indicando que a fermentação e sua duração afeta diretamente a atividade antimicrobiana da bebida, possivelmente devido a menor produção de ácido acético e demais ácidos orgânicos (Mizuta et al. 2020).

Para além do ácido acético, outros ácidos orgânicos presentes têm demonstrado potenciais como inibidores de crescimento microbiano. O ácido ascórbico em combinação com o ácido láctico inibiu o crescimento de *E. coli* O157: H7 (Tajkarimi & Ibrahim, 2011); ácido glicônico apresentou atividade frente *L. monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *S. aureus* e *Enterococcus faecalis* (Nieto-Peñalver et al., 2014); ácido siríngico inibiu o crescimento de *Cronobacter sakazakii*, e possui ainda perfil antioxidante (Shi et al., 2016).

Além do conteúdo ácido, a presença de proteínas, antibióticos, enzimas ou diferentes metabólitos sintetizados durante a fermentação potencializam a atividade antimicrobiana (Battikh, Bakhrouf e Ammar, 2012; Bhattacharya et al. 2016). O teor de isoflavonas agliconas, como glicitina, genistina, gliciteína e genisteína estão associadas ao potencial de inibição microbiana em kombucha; chás fermentados com altas concentrações desses compostos inibiram o crescimento de *S. aureus*, *E. coli* e *Bacillus subtilis* mesmo após a neutralização do pH da amostra, excluindo o efeito de ácidos, e evidenciando que os ácidos, apesar de serem um dos principais compostos produzidos, não são exclusivamente responsáveis pela atividade antimicrobiana relatada (Tu et al., 2019).

Bacteriocinas produzidas por microrganismos isolados de kombucha, são descritas como potenciais antimicrobianos; em *Lactobacillus plantarum* foi identificada e isolada uma bacteriocina (SLG10) com efeitos bactericidas contra *B. subtilis*,

*Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *Micrococcus luteus*, *Brochothrix thermosphacta*, *Clostridium butyricum*, *S. aureus*, *Listeria innocua*, *L. monocytogenes* e *E. coli*, que provoca o efluxo de íons de potássio pelo aumento da permeabilidade da membrana celular, que conseqüentemente causa morte da célula; essa bacteriocina possui ainda efeito sob a formação de biofilme em *S. aureus* e atividade antifúngica contra *Aspergillus niger*, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, em determinadas condições (Pei et al., 2020).

De forma geral, a comunidade bacteriana acética é a principal responsável pela produção de ácidos orgânicos, por meio da conversão de açúcares e álcoois, sua concentração na amostra está relacionada a altos teores desses compostos (Gomes et al., 2018). Compreende-se que, a composição e dinâmica da comunidade microbiana interfere diretamente ou indiretamente no perfil funcional do chá, e seu perfil está relacionado a produção de diversos metabólitos com atividades biológicas (De Filippis et al., 2018).

#### 2.3.4. Outros benefícios associados

Diversos benefícios do consumo regular da kombucha foram relatados, além de antioxidante e antimicrobiano, tais como atividade anti-inflamatória, anticancerígena, aumento da imunidade, e estão relacionados principalmente à presença de polifenóis e ácidos orgânicos (Vijayaraghavan et al. 2000). Ainda são relatadas o seu potencial em inibir a peroxidação lipídica (Yang et al. 2009), redução dos efeitos tóxicos em hepatócitos causados por hidroperóxido de *tert*-butil (TBHP) (Bhattacharya, Gachhui e Sil, 2011), inibição da enzima araquidonato 5-lipoxigenase (5-LOX) produtora de leucotrienos, redução da proliferação de linhagens celulares de câncer de mama humano (MCF-7) e câncer de cólon humano (HCT-116) (Villarreal-Soto et al. 2019), redução do dano oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio aos macrófagos ativados (THP-1) (Vazquez- Cabral et al. 2017) e redução de danos oxidativos em linhas de células de fibroblastos (Gaggia et al. 2019), entre outras.

A maioria dos estudos sobre efeitos biológicos associados ao consumo da kombucha são realizados por meio de testes *in vitro* (Morales, 2020), contudo, alguns autores realizaram experimentos com modelos animais para verificar o efeito cardioprotetor e influência no infarto miocárdio (IM) induzido por isoproterenol (ISO)

em camundongos; observaram redução dos efeitos do IM; os autores associaram a eliminação de ROS, redução de lipídios, modulação de glicoproteína e estabilização de membrana miocárdica como possíveis mecanismos (Lobo, Sagar e Shenoy, 2017).

Outro teste em modelo animal buscou verificar o efeito da kombucha na atividade de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), além de analisarem a influência nos níveis de malondialdeído (MDA), um produto secundário da oxidação lipídica; os testes foram realizados em camundongos após o consumo do chá fermentado por *Gluconacetobacter* sp. produtor de DSL; os autores verificaram aumento de SOD e diminuição de MDA após o consumo (Yang et al. (2009). O aumento na atividade de SOD também foi observado por Bellassoued et al. (2015), que favoreceu um efeito hipocolesterolêmico em ratos.

#### **2.4. Composição e diversidade microbiana**

Análises microbiológicas por meio de técnicas moleculares têm sido empregadas para identificar as espécies de bactérias e leveduras presentes durante o processo de fermentação em diferentes estágios da fermentação de kombucha (Marsh et al., 2014; Reva et al., 2015; Coton et al., 2017; De Filippis et al., 2018; Gaggia et al., 2019; Leech et al., 2020; Arikan et al., 2020; Villarreal-Soto et al., 2020). Esses estudos, corroboram com uma composição microbiana altamente diversa e variável entre as amostras analisadas, tanto no perfil de espécies, quando na abundância relativa de cada uma delas, além da estruturação de dominância no inóculo; essa comunidade é responsável pela manutenção das propriedades benéficas do chá (Chakravorty et al., 2016).

Em geral, leveduras produzem etanol, utilizado como substrato para produção de ácido acético pelas bactérias acéticas (BAA); dessa forma, cria-se um ambiente desfavorável para outros grupos microbianos, favorecendo as espécies de interesse para a fermentação da bebida (Liu et al. 1996). Ainda, BAA convertem os açúcares e o etanol em outros ácidos orgânicos, além de produzirem os polímeros extracelulares que compõem a película celulósica (SCOBY); a oxidação do etanol, ocorre principalmente em ambientes ácidos (Gomes et al. 2018).

A microbiota de bebidas fermentadas como kombucha, é dominada por espécies da família Acetobacteraceae (Leech et al. 2020); que correspondem a até

99 % da microbiota (Arikan et al. 2020; Gaggìa et al. 2019). Nessa bebida, predominam os filos *Proteobacteria* (48,9%) e *Firmicutes* (28,2%), além de espécies associadas às fermentações produtoras de álcool, como *Saccharomyces eubayanus* (2,7%), *Brettanomyces bruxellensis* (5,2%), *Hanseniaspora valbyensis* (9,3%) e *Oenococcus oeni* (5%). A fermentação é dominada principalmente por *Gluconobacter oxydans* (5%), *Acetobacter cerevisiae* (2,5%) e *Komagataeibacter rhaeticus* (2%); é comum a interação entre os gêneros *Acetobacter* e *Komagataeibacter*, onde *K. xylinus* ocorre com *A. okinawensis*, enquanto *K. rhaeticus* está associada a presença de *A. senegalensis* (Leech et al. 2020).

A dinâmica populacional de leveduras no chá fermentado obedece a um mecanismo complexo, com a sucessão de espécies dominantes que variam durante o processo fermentativo. Incluem, entre outras, espécies dos gêneros *Zygosaccharomyces* sp., *Brettanomyces/Dekkara* sp., *Saccharomyces* sp., *Candida* sp., *Pichia* sp., *Saccharomycoides* sp., *Wallemia* sp. e *Schizosaccharomyces* sp. (Marsh et al. 2014; Reva et al. 2015; Chakravorty et al. 2016). Inicialmente predominam espécies fermentativas osmotolerantes, como *Zygosaccharomyces* spp. e *Schizosaccharomyces pombe*; após, são dominadas por linhagens acidotolerantes, como *Brettanomyces* spp. e *Candida stellata* (Teoh, Heard e Cox, 2004). Algumas bactérias do ácido lático (BAL) também são descritas na kombucha, como *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus nagelii* e *Lactobacillus mali* (Yang et al. 2022), apesar de normalmente não estarem presentes em grandes populações (Teoh, Heard e Cox 2004).

Como uma das principais espécie relacionadas a produção de celulose bacteriana (CB) e altos teores de ácido acético, *K. rhaeticus*, possui vantagens sobre outras espécies microbianas presentes no ambiente (Yamada et al., 2012), e é frequentemente relatada como pertencente da microbiota *core* em kombucha (Santos et al., 2014; Semjonovs et al., 2017). Por sua vez, *Z. baillii* possui alta tolerância a estresses ambientais e, portanto, cresce em ambiente com teores de ácido acético e que normalmente inibe o crescimento de outras espécies potenciais competidoras (Dang et al., 2009). Para o sucesso da interação entre essas duas espécies, *Z. baillii* metaboliza a sacarose para produzir glicose e frutose (Merico et al., 2003), que são utilizadas prontamente por *K. rhaeticus* para a produção de celulose (Chang et al., 2001).

Em alguns casos, com a modulação de condições de fermentação, como a temperatura, é possível selecionar espécies dominantes no inóculo, apesar disso, geralmente espécies de *Komagataeibacter* (90 %) dominam após 7 dias independente da temperatura de fermentação; *K. xylinus* domina a 20 ° C, enquanto *K. saccharivorans* prevalece a 30 °C (De Filippis et al., 2018). *Komagataeibacter* ocorre em abundância durante todo o processo, enquanto espécies de *Acetobacter* tendem a diminuir até cerca de 3–5% em 21 dias, assim como espécies de *Firmicutes* e *Actinobacteria*, favorecidas em fermentações de acima de 30 °C (De Filippis et al., 2018). A dominância de *Komagataeibacter* também foi verificada por Reva et al. (2015), onde *K. xylinus* prevaleceu (96,8 %), seguido por *K. intermedius* (4,9 %).

Sabe-se que, a população bacteriana no SCOBY (fase sólida) é maior do que no chá (fase líquida) (Chakravorty et al. 2016; Villarreal-Soto et al., 2020) enquanto as leveduras estão presentes sobretudo na fase líquida (Villarreal-Soto et al., 2020). Análises metagenômicas revelaram que a microbiota de três comunidades kombucha, artesanais e industrializadas da França possuem os filos *Actinobacteria* e *Proteobacteria* presentes, tendo *Acetobacteraceae* como família dominante de bactérias e *Saccharomycetaceae* e *Schizosaccharomycetaceae* dominante para leveduras; os gêneros bacterianos mais identificados são *Komagataeibacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* e *Acetobacter*; em nível de espécie *K. rhaeticus* (16–49 %) é a bactéria predominante no SCOBY e *K. xylinus* (16 %) no chá (Villarreal-Soto et al., 2020).

Apesar disso, a estrutura da comunidade microbiana do SCOBY, nem sempre difere significativamente da comunidade presente no chá, sobretudo nos dias iniciais de fermentação; Gaggia et al. (2019) verificaram altas semelhanças (99–100 %) entre os isolados da fase sólida e líquida em seus estudos. Grandes concentrações de BAA foram relatados, e atribuídos principalmente a *Komagataeibacter* spp. e *Gluconobacter* spp., tendo *K. intermedius* abundante tanto no chá preto, quanto no verde como substrato e *K. rhaeticus* sobretudo após 14 dias de fermentação em chá verde; o perfil de leveduras, foi dominado por *Zygosaccharomyces parabailli* e *Brettanomyces bruxellensis*, esta última com destaque após 14 dias de fermentação (Gaggia et al., 2019), sendo frequentemente isolada em ambientes com alto teor de etanol (Souza Liberal et al., 2007).

As três amostras analisadas por Villarreal-Soto, et al. (2020) possuem um perfil de leveduras semelhante, exceto pela ausência de *Schizosaccharomyces pombe* no chá de kombucha industrializada; em geral, os gêneros de leveduras são compartilhados por todas as amostras, *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces* e *Schizosaccharomyces*, sendo os dois últimos predominantes com *B. bruxellensis* (29 %) e *S. pombe* (16 %). Esses dados diferem do perfil relatado por Chakravorty et al. (2016), onde *Candida* sp. foi dominante, e não foram relatadas espécies de *Brettanomyces* ou *Schizosaccharomyces*. Embora sejam descritas espécies dominantes no microbioma kombucha, diversos estudos destacaram a diversidade deste perfil, que é influenciado pela origem geográfica e as diferentes condições de fermentação impostas (Teoh et al., 2004; Marsh et al., 2014; Reva et al., 2015; Coton et al., 2017).

Durante o cultivo escala industrial, a fermentação da kombucha é submetida a diferentes parâmetros de estresse, como oxigenação, distribuição de açúcar e área de superfície do biofilme, essas condições podem resultar em um perfil microbiano distinto (Coton et al., 2017). O perfil BAL, em um processo industrial, é dominado por *Liquorilactobacillus nagelii* (*Lactobacillus nagelii*), *L. satsumensis* e *Oenococcus oeni*, sobretudo para o último; mesmo nessas condições, as BAA correspondem principalmente pertencentes aos gêneros *Acetobacter*, *Gluconoacetobacter*, *Gluconobacter* e *Tanticharoenia*, com as espécies *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter okinawensis*, *A. tropicalis*, *A. syzygii* e *Gluconoacetobacter europaeus*; enquanto as leveduras são abundantes as espécies *Dekkera anomala*, *B. bruxellensis*, *Hanseniaspora valbyensis*, *Zygorulasporea florentina* e *Zygosaccharomyces bailii*; todas essas espécies ocorrem simultaneamente independente das condições ambientais, indicando que existe uma forte relação simbiótica entre elas (Coton et al., 2017).

Estudos metagenômicos realizados por sequenciamento do tipo *Shotgun* têm fornecido dados importantes sobre a dinâmica populacional da kombucha e a caracterização funcional dos genes microbianos (De Filippis, Parente e Ercolini, 2017). Em duas amostras de kombucha artesanal provenientes da Turquia, oito diferentes filos bacterianos foram identificados: *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Armatimonadetes*, *Bacteroidetes*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia*, sendo o microbioma dominado por espécies de *Proteobacteria* (> 99 %);

Acetobacteraceae (99 %) foi a família mais abundante, com 99,3 % referentes ao gênero *Komagataeibacter*; em relação às leveduras, o filo *Ascomycota* (>80 %) mostrou-se dominante, com > 99 % das sequências atribuídas ao gênero *Zygosaccharomyces*; as espécies *K. rhaeticus* e *Z. bailli* foram as mais abundantes (Arikan et al., 2020). O perfil de gênero descrito é semelhante ao verificado por Marsh et al. (2014), com mais de 90 % correspondendo a *Gluconacetobacter* (*Komagataeibacter*) e mais de 95 % a *Zygosaccharomyces*. Dessa forma, essas análises fornecem informações detalhadas para essas comunidades em diversos ambientes.

## 2.5. Análise metagenômica

Após avanços tecnológicos em sequenciamento molecular de alto rendimento, tem sido possível identificar de forma precisa as populações microbianas, incluindo presentes nos alimentos e bebidas fermentadas (Leech et al, 2020). A análise metagenômica pode ser aplicada tanto na fase líquida, quanto na fase sólida, dessa forma, a diversidade e dinâmica das populações microbianas presentes no chá fermentado podem ser determinadas em sua totalidade. Alguns estudos, determinam perfil microbiológico apenas no chá fermentado (Bellut et al., 2018; Nguyen et al., 2015; Zhao et al., 2018), enquanto outros, também caracterizam a microbiota do SCOBY, entretanto, de forma geral, não descrevem a abordagem específica para sua homogeneização da película (May, et al., 2017; Tran et al., 2020).

### 2.5.1. Fase líquida

A fase líquida (FL) corresponde a porção do chá fermentado. O isolamento do DNA metagenômico da FL é realizado por meio de diferentes técnicas, kit e/ou protocolos de extração, que normalmente seguem de acordo com o recomendado pelo fabricante, com algumas adaptações. Arikan, et al., (2020) utilizaram o *DNeasy PowerFood Microbial Kit*, com 500 mL de chá centrifugado a 6.000 rpm/15 min; o *pellet* lavado duas vezes com 2 mL de tampão TE (solução de Tris-HCl (1M, pH: 8,0) / 20mL de EDTA (0,5 M, pH: 8,0), centrifugado a 13.000 rpm/5 min e incubado em 1mL de tampão TES, com as enzimas liticase (250 U), mutanolisina (25 U) e lisozima (1000

U) a 37°C/1h para digestão enzimática; foi novamente centrifugada a 6.000rpm/15 min; o novo *pellet* foi dissolvido em 450 µL de tampão de lise (disponível no kit) e transferido para tubo com microesferas; em seguida, foi adicionado polivinilpirrolidona (PVP, 2%), e incubado a 70°C/1h, com agitação a cada 10 minutos.

O mesmo kit de isolamento (*DNeasy PowerFood Microbial Kit*), foi utilizado por Marsh et al., (2014), que realizaram a caracterização de SCOPY oriundos de diversos países; após centrifugação a amostra foi ressuspensa em 450 µl de tampão de lise, e submetido à digestão com mutanolisina (100 U/ml) e lisozima (50 µg/ml) a 37°C/1 h, e proteinase K (250 µg/ml) a 55°C/1 h, em seguida incubada por 10 min a 70°C, e lise mecânica com o batedor de esferas *Qiagen Tissue Lyser II*. Esse kit resulta em DNA de maior pureza de extração (Singh, et al., 2020), e possui desempenho superior se comparados a outros kits de isolamento de DNA para estudos metagnômicos (Jana, et al., 2020).

No isolamento realizado por Coton et al. (2020), uma amostra de 10mL foi centrifugada a 8800 rpm a 4 °C; usando o *DNeasy Blood and Tissue Kit*, isolaram DNA metagenômico ressuspensa em 400 µL de solução de lise Tris-HCl (20 mM, pH: 8,0), EDTA (2 mM), Triton X-100 (1,2%), lisozima (20 mg/mL), liticase (200 U) e incubado a 37°C/3h; foram tratadas com proteinase K (20 mg/mL) ou RNase A (10 µL de 1 mg/mL) em 200 µL de tampão disponível no kit; e em seguida incubadas a 56°C/1 h com agitação. Alguns autores não realizam modificações no procedimento proposto pelo fabricante, como o isolamento realizado por De Filippis et al., (2018), que consiste na extração do DNA utilizando o *Biostic Bacteremia Kit*, a partir do *pellet* obtido da centrifugação de 2 mL do líquido por 2 min; e Chakravorty et al. (2016), que seguiram as recomendações sem adaptações com o *QIAamp DNA stool mini Kit* para isolar DNA bacteriano em 200mL de chá centrifugado; para leveduras foi combinado ao protocolo usando *Zymolyase*.

O isolamento metagenômico realizado por Villarrel-Soto et al., (2020) utilizou o kit de extração *Geneall Exgene Soil SV*, com 50 mL de chá, que foi centrifugado (5000 rpm/10 min) em temperatura ambiente, e teve o *pellet* ressuspensa em 550 µL de tampão SL, 90 µL de lisozima (50 mg/mL) e 50 µL de mutanolisina (100 µL/mL), após incubado a 60°C/15 min com agitação, em seguida, foi adicionado 28 µL de proteinase K e incubado por 15 min com agitação; o material foi transferido para o

*Qiagen Tissue Lyser II* por 10 min a 20 oscilações/s, segundo as recomendações do fabricante.

Leech et al., (2020) caracterizam a microbiota de diferentes alimentos, incluindo kombucha, com o isolamento pelo *GeneAll Exgene Kit*; onde 50 ml da solução foram centrifugados a 10.000 rpm/10 min, em temperatura ambiente; o *pellet* foi suspenso em 550 µl de tampão SL e 33 µl de proteinase K, e incubados a 55 °C/30 min, e incubadas em *Qiagen TissueLyser II* por 10 min a 20/s, para otimização da extração, de acordo com as instruções do protocolo do fabricante. A abordagem de Chakravorty et al. (2015), utilizaram o *QIAamp DNA stool mini Kit*, como recomendado pelo fabricante; exceto que, após centrifugação (4588 rpm/6 min), o *pellet* foi incubado a 65°C com 4 mL de tampão ASL e 1,5 comprimidos de *InhibitEX* por 4,5 h.

Em Gaggia et al., (2019), o *Wizard Genomic DNA Purification Kit* foi utilizado para a extração metagenômica, onde 100 mL do chá foram centrifugados (10.000rpm/10 min) e os *pellets* suspensos em 500 µL de água e 500 µL de Y-PER, logo após, foram submetido à lise mecânica e física, com 0,2 g de esferas de vidro em vórtex por 10 min e incubado a 95°C por 10 min, respectivamente; a amostra foi reidratado com 50 µL de solução de reidratação e incubada a 65°C por 1 h, e seguiu-se com a purificação.

### 2.5.2. Fase sólida

Para isolar o DNA metagenômico da comunidade microbiana que compõe o SCOBY, geralmente são necessárias abordagens específicas para a homogeneização da amostra; os estudos diferem quanto as metodologias desenvolvidas (Tabela 1). De acordo com métodos aplicados por Arikan et al., (2020), logo após a formação, o SCOBY deve ser rompido e homogeneizado em 200 mL de tampão de acetato (1M, pH: 5) em misturador durante 30 s; em seguida, adicionadas 500 U de celulase para nova homogeneização; a amostra é incubada a 40 °C por 1 hora e centrifugada a 6.000 rpm/15 min, tendo o sobrenadante descartado, e o *pellet* tratado como o desenvolvido na fase líquida.

Tabela 2. Variações no preparo de amostras de SCOBY de fermentação kombucha para análise metagenômica.

Amostra (g)	Homogeneização	Incubação (°C/h)	Centrifugação (rpm/min)	Referência
NE	200mL de tampão de acetato/30s; 500mL de celulase; em misturador durante/ 30s	40/1	6.000/15	Arikan, et al. (2020)
5	50 ml de diluente de recuperação máxima (MRD)/20 min	-	10.000/10	Leech et al. (2020)
0,8	500 µL de água estéril; fragmentação	-	5.000/10	Villarreal-Soto et al. (2020)
1,5	3 mL de água desionizada; 200 mg/mL de celulase	27/12	10.000/5	Gaggia et al., (2019)
NE	Solução salina tamponada com fosfato; <i>Stomacher</i> /1 min	-	12.000/2	De Filippis et al. (2018)
20	Ultra-turrax/60s; <i>Stomacher</i> /15 min	-	8800/NE	Coton et al. (2017)
Todo	750 µL de celulase; 25 mL de água destilada/30 min; 5 mL de tampão de sorbitol; DTT; zimoliase	30/10; 30/45	4588/6 (2x)	Chakravorty et al. (2016)
Todo	25 mL de água destilada em vórtex/45 min	-	4.588/6	Chakravorty et al., (2015)
NE	750 µl de tampão de lise/5 min; 40 µl de lisozima; 10 µl de proteinase K; 200 µl de SDS (20%)	37/0,5; 65/2	NE	Reva et al. (2015)
0,25	0,3 g de esferas de vidro; 750 µl de celulase; Qiagen TissueLyser II/10 min	40/1	-	Marsh et al. (2014)

NE: Não especificado; (-) Etapa não aplicada.

Homogeneização em circulador *Stomacher* são frequentemente descritas. Coton et al., (2017), utilizou 20 g do SCOBY tratadas em *Ultra-turrax* durante 1 min a 14.000 rpm e então transferidas para circulador por 15 min, para recuperação de uma amostra líquida de 10mL, que foi tratada como na fase líquida. De Filippis et al., (2018) lavou fragmentos de SCOBY com água deionizada estéril, e após, diluíram (1:10) em solução salina tamponada com fosfato (pH 7,4) com homogeneização em *Stomacher* por 1 min em 230 rpm à temperatura ambiente, o *pellet* obtido após centrifugação (12.000 rpm/2 min) foi tratado como fase líquida. A aplicação de *Stomacher* também foi adotada por Leech et al., (2020), em 5 g de SCOBY e 50 ml de diluente de recuperação máxima (MRD) estéril, para homogeneização por 20 min.

Marsh et al., (2014), utiliza para a extração do DNA a partir do SCOBY, um total de 0,25 g de amostra recém-formada, lavadas em água estéril; em seguida, 0,3 g de esferas de vidro estéreis e 750 µl de celulase são adicionados, em seguida centrifugadas e mecanicamente lisada em *Qiagen TissueLyser II* por 10 min; após incubada a 40 ° C/1h; o *pellet* é ressuspensão em 450 µL de tampão pré-aquecido e segue-se a extração como na fase líquida. Semelhante ao que foi realizado por Gaggia et al., (2019), onde 1,5 g de SCOBY foi fragmentado e suspenso em 3 mL de água deionizada e 200 mg/mL de celulase, posteriormente incubadas *overnight* a 27°C e centrifugadas (10.000rpm/5 min).

Para a homogeneização, Chakravorty et al. (2016), incubou todo o SCOBY em 750 µL de celulase e 25 mL de água destilada estéril em temperatura ambiente por 30 minutos, após a amostra foi centrifugada (4588 rpm/6 min) e ao *pellet* foram adicionados 5 mL de tampão de sorbitol (Sorbitol 1M, Tris 50 mM pH: 7,5), DTT (30 mM) e incubados a 30°C/10 min e centrifugado; após foram ressuspensão em 5 mL de tampão sorbitol / DTT (2mM) e incubados com zimoliasa (400 U) a 30°C/45 min, e então seguido o protocolo do fabricante.

Em alguns casos, não são utilizados solventes para homogeneização do SCOBY. Em Villarreal-Soto et al., (2020), as extrações para 0,8 g de SCOBY, foram apenas lavados em 500 µL de água estéril e fragmentados antes da extração de fase líquida. Semelhante ao aplicado por Chakravorty et al. (2015), que adicionaram 25 mL de água destilada que foi agitada em vórtice por 45 minutos, a amostra foi então centrifugada e aplicada a extração.

A maioria dos estudos, utiliza a mesma técnica de isolamento de DNA para a fase líquida e sólida. Entretanto, nos ensaios de Reva et al., (2015), foram utilizadas abordagens distintas para as duas fases, sendo o *innuSPEED Kit* e método de lise suave, para o chá e SCOBY, respectivamente. Na lise suave a amostra é homogeneizada com 750  $\mu\text{L}$  de tampão de lise (100 mM de Tris-HCl, 100 mM de EDTA de sódio, 1,5 M de NaCl, brometo de hexadecilmetilamônio (CTAB, 1%), pH 8) em vórtex por 5 min; em seguida adicionada 40  $\mu\text{L}$  de lisozima (50 mg/ml<sup>-1</sup>) e 10  $\mu\text{L}$  de proteinase K (10 mg/mL<sup>-1</sup>) e incubadas a 37°C/30 min; em seguida, é adicionado 200  $\mu\text{L}$  de SDS (20%) e incubado a 65°C/2 h com agitação a cada 30 min; após centrifugação, os *pellets* foram reextraídos,; e lavados com etanol (70%) e suspensos em 50  $\mu\text{L}$  de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA sódico 1 mM, pH: 8,0) (Gabor et al., 2003).

## **2.6. Papel da composição e perfil da comunidade na produção de compostos bioativos**

A comunidade microbiana presente na kombucha resulta na produção da grande diversidade de metabólitos secundários durante o processo de fermentação; esses compostos possuem importantes potenciais biológicos, e o perfil e dinâmica populacional dessas espécies de bactérias e leveduras revela influência significativa nas propriedades benéficas do chá fermentado (Villarreal-Soto et al., 2020).

Espécies de bactérias do ácido acético (AAB) promovem a conversão de açúcares e álcoois em ácidos orgânicos, como ácido glicônico e ascórbico (Gomes, et al. 2018). Entre as principais espécies de AAB presentes na kombucha, *Gluconobacter oxydans* é associada a altos teores de ácido glicônico, e sua produção ocorre pela oxidação direta de D-glicose por duas glicose desidrogenases (GDHs), uma GDH citoplasmática dependente de NAP<sup>+</sup> e uma GDH dependente de pirroloquinolina quinona (PQQ) ligado a membrana; sabe-se ainda que esta última GDH possui rendimento 30 vezes maior que a GHD citosólica e a conversão ocorre principalmente no espaço periplasmático (Sainz et al., 2016).

O ácido ascórbico (vitamina C) é produzido a partir de um intermediário oxidado por cepas de *Gluconobacter* sp., como *G. oxydans*; o composto é obtido a partir da conversão oxidativa de D-sorbitol em L-sorbose através de duas enzimas

ligadas à membrana, a glicerol desidrogenase dependente de PQQ e a sorbitol desidrogenase dependente de FAD<sup>+</sup> (Saichana et al., 2015). Esse metabólito normalmente está presente em níveis elevados no kombucha preparado a partir do chá preto (Kaewkod, Bovonsombut, & Tragoolpua, 2019).

Comunidades microbianas distintas apresentam cinética de fermentação e sucessões metabióticas relativamente diferentes (Villarreal-Soto et al. 2020). Um maior consumo de açúcar e produção de etanol é relatado em consórcios contendo *Brettanomyces bruxellensis*, sendo observado o consumo completo do açúcar em 12 dias de fermentação; além disso, a ocorrência de *Schizosaccharomyces pombe* garante uma melhor utilização da fonte de carbono, sem haver, no entanto, diferenças significativas nas concentrações de ácido acético entre amostras produzidas a partir de diferentes inóculos. A produção de ácidos orgânicos totais é significativamente maior na presença de *Brettanomyces bruxellensis* (Villarreal-Soto et al. 2020), a levedura ainda é associada à síntese de compostos fenólicos (Villarreal-Soto et al. 2020).

O perfil biológico de chás obtidos com consórcios que possuem maior abundância relativa de *Komagataeibacter xylinus* nas fases sólida e líquida e *Schizosaccharomyces pombe* na fase líquida, demonstraram maior atividade anti-inflamatória (de até 44,5%), em testes utilizando a enzima 15-lipoxigenase (15-LOX), bem como atividade antiproliferativa em linhas de células tumorais humanas (Villarreal-Soto et al. 2020). Segundo Malbaša et al. (2011), quanto mais filogeneticamente próximas são as espécies presentes na comunidade da kombucha, menor a variação no perfil bioativo do chá, mesmo considerando-se inóculos de diferentes regiões geográficas.

Dentre as importantes interações entre bactérias e leveduras do consórcio microbiano da kombucha, destaca-se o favorecimento do crescimento de *Zygosaccharomyces baillii* pela bactéria *Komagataeibacter rhaeticus*. Este processo acontece uma vez que *K. rhaeticus* carrega em seu genoma vias completas para a biossíntese de vitaminas do grupo B, como B1, B7 e B12 (Jayabalan et al. 2014; Arikan et al. 2020); essas vitaminas são requeridas e utilizadas no crescimento de *Z. baillii* (Stratford e Capell, 2003); além disso, a acidificação do ambiente decorrente da produção de ácido acético e glicônico inibe potenciais competidores desta levedura (Dang et al. 2009). Sabe-se, ainda, que *Z. baillii* possui vias e genes importantes para

suplementação nutricional de outros microrganismos, como gama-aminobutirato (GABA), que contribui para a tolerância ao estresse oxidativo em *Saccharomyces cerevisiae* (Coleman et al. 2001). Além disso, a dominância de *S. cerevisiae* no inóculo favorece o aumento da atividade antioxidante do chá após a fermentação (Malbaša et al. 2011).

Chás pretos fermentados por *Saccharomyces cerevisiae* apresentam maior atividade de redução dos radicais livres e aumento no conteúdo de vitamina e ácidos totais. Por outro lado, chás fermentados por *Zygosaccharomyces* sp. apresentam capacidade antioxidante e teor de vitamina C reduzidos em comparação a chás fermentados por culturas mistas (Malbaša et al. 2011). Sugere-se que *Z. bailii*, quando em cultura simples, esteja envolvido em processos importantes para o sabor da bebida, por meio da liberação de compostos aromáticos (Murugesan, Angayarkanni, e Swaminathan, 2002).

Para chá fermentado a partir de uma comunidade microbiana sintética de *Acetobacter pasteurianus*, *Komagataeibacter xylinus* e *Zygosaccharomyces bailii*, observa-se na fase inicial da fermentação rápida diminuição no teor de açúcar após os dois primeiros dias; com altos teores dos ácidos glicônico, glicurônico e acético para o chá dessa comunidade. A presença de *A. pasteurianus* foi associada à produção de altas concentrações de ácido glicônico e uma pequena concentração de ácido acético no produto final, o que poderia contribuir com maiores benefícios à saúde e sabor mais aceitável pelos consumidores.

Uma variação na abundância de espécies, mesmo que do mesmo gênero, pode desempenhar variações significativas nos conteúdos de ácidos e polifenóis durante o processo fermentativo (De Filippis et al. 2018). A dominância de *Komagataeibacter saccharivorans* (*Gluconacetobacter saccharivorans*) está associada a concentrações de ácido glicônico e ácido glicurônico mais elevadas em comparação à dominância de *K. xylinus* (*G. xylinus*) no consórcio microbiano; por outro lado, altos teores de polifenóis são relatados quando *K. xylinus* é dominante. A manutenção da relação entre essas espécies pode ser obtida controlando-se a temperatura de fermentação, uma vez que *K. xylinus* prevalece a 20 °C, enquanto *K. saccharivorans*, a 30 °C (De Filippis et al. 2018). Em 30 °C também é relatada uma maior diversidade microbiana no biofilme, que pode favorecer a metabolização e,

conseqüentemente, a biotransformação de polifenóis pela atividade enzimática microbiana (Jayabalan et al. 2007).

Nguyen et al. (2015) verificaram que a simbiose entre *Komagataeibacter intermedius* e a levedura *Dekkera bruxellensis* resulta em altos teores de ácido glicurônico após 7 dias de fermentação. Estudos destacam que a eficiência energética na produção de etanol por *B. bruxellensis* é maior quando comparado com *Saccharomyces cerevisiae*, utilizado frequentemente na indústria (Blomqvist et al. 2012), que favorece a fermentação de *K. intermedius* na produção do ácido glicurônico. Além disso, a levedura estimula a via do glucuronato pela inibição do metabolismo da glicólise na bactéria (Freer, Dien e Matsuda, 2003).

Apesar de presentes em baixas concentrações e não serem essenciais para o processo de fermentação da kombucha, BAL podem desempenhar papéis importantes no rendimento e produção de compostos de interesse (Yang et al. 2010; Nguyen et al. 2015b). A presença de *Lactobacillus* sp. pode influenciar positivamente o crescimento de *Gluconacetobacter* sp. Essa maior concentração promove o aumento da produção de ácido-D-sacárico-1,4-lactona (DSL) (Yang et al. 2010), o que indica a presença de ácido glicurônico, uma vez que ambos têm origem na via do glucuronato (Hoffmann, 2000).

Tais resultados ajudam a elucidar o papel da dinâmica microbiana nas características funcionais da kombucha; entretanto, esse tipo de abordagem poderia ser explorado de forma mais abrangente, combinando ferramentas de metagenômica e metabolômica (Arikan et al. 2020). Assim, os resultados obtidos permitiram uma melhor compreensão acerca da função das espécies da microbiota da kombucha, possibilitando um melhor controle da fermentação e da qualidade do produto final.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Descrever o papel da estrutura e interações da comunidade microbiana no perfil químico e de atividade biológica (antioxidante e antimicrobiana *in vitro*) no processo de fermentação de kombuchas produzidas utilizando diferentes SCOBY brasileiros.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Coletar inóculos de kombucha de diferentes regiões do Brasil, para compor um Banco de SCOBY brasileiros;
- Caracterizar a comunidade microbiana de kombuchas produzidas utilizando os SCOBY selecionados por metagenômica tipo *Shotgun*;
- Analisar a estrutura e o perfil químico após o processo fermentativo;
- Selecionar os melhores SCOBY com base no perfil biológico e espécies de interesse;
- Correlacionar dados sobre a estruturação da comunidade microbiana e o perfil bioativo após o processo fermentativo (atividades antimicrobiana e antioxidante *in vitro*).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Obtenção das culturas iniciais e condições de fermentação

Trinta (30) SCOBY de kombucha com aproximadamente 200 mL de chá de arranque foram obtidos de produtores artesanais e industriais de kombucha de diferentes regiões do Brasil, segundo Venturim (2022). Para todas as análises, as bebidas produzidas foram padronizadas conforme recomendações do fornecedor do chá. Um litro de água filtrada esterilizada (121 °C por 15 min) foi aquecido a 80 °C e adicionado de 8 g (0,8 % m/v) de chá verde (The Kombucha Hub®); a mistura foi mantida em infusão durante 10 min. Após a remoção das folhas de chá, 80 g (8 %) de sacarose foram adicionados, misturando-se até completa dissolução. Uma vez resfriado à temperatura ambiente ( $26 \pm 2$  °C), o chá adoçado foi acrescido de 10 % (1:10) de chá de arranque (cultura *starter*) e SCOBY (aproximadamente 3 cm<sup>2</sup>) de cada amostra analisada. O recipiente foi recoberto com toalha de algodão de modo a se manter uma condição de aerobiose no decorrer do processo fermentativo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As culturas foram fermentadas a 25 °C durante 21 dias (Villarreal-Soto et al., 2020). Como controle, foram analisados o chá não fermentado (CNF).

### 4.2. Análise de composição bioativa

#### 4.2.1 Conteúdo de compostos fenólicos totais (TPC)

As amostras foram previamente preparadas centrifugando-se 2 mL da bebida a 8.000 rpm por 5 min; em seguida, 500 µL do sobrenadante foi diluído em água ultrapura (1:3, v/v), conforme Zhang et al. (2020). O teor de compostos fenólicos totais do chá fermentado e não fermentado foi determinado no sobrenadante resultante da centrifugação, de acordo com Tanticharakunsiri et al. (2020), com modificações. Para os ensaios em microplacas, 30 µL da amostra e 150 µL de reagente de fenol de Folin-Ciocalteu a 10% (1:10, v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foram adicionados em cada poço, e a mistura foi mantida em repouso durante cinco minutos em ambiente escuro, seguido da adição de 120 µL de solução de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 7,5 %) e repouso durante 30 min em ambiente escuro. A absorbância da solução resultante foi medida a 765 nm em leitor de microplacas (Thermo Fisher Scientific®),

Waltham, MA, USA). Como controles, foram utilizados água ultrapura e chá verde não fermentado. Uma curva padrão (0, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL) foi preparada usando ácido gálico para cálculo do conteúdo fenólico, expressos como µg de equivalentes de ácido gálico por mL de amostra (µg EAG/mL).

#### 4.2.2. Conteúdo de flavonoides totais (TFC)

O conteúdo de flavonoides foi determinado de acordo com Anantachoke et al. (2016), pelo ensaio colorimétrico de cloreto de alumínio. Em um microtubo de 1 mL, foram adicionados 160 µL de água destilada, 40 µL de amostra do chá e 15 µL de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>, 5%); após, a mistura foi mantida em repouso durante 5 min; então, 24 µL de cloreto de alumínio 6-hidrato (AlCl<sub>3</sub>.6 H<sub>2</sub>O, 10%) foram acrescentados e a mistura incubada por 6 min. Em seguida, foram adicionados 80 µL de hidróxido de sódio (NaOH, 1 M) e 80 µL de água destilada, seguido de homogeneização. Desta mistura, 250 µL foram transferidos para poços de microplacas de titulação. A absorbância do sobrenadante foi medida a 415 nm em leitor de microplacas (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, USA). Como controles, foram utilizados água ultrapura e chá verde não fermentado. O conteúdo de flavonoides foi calculado a partir da curva padrão (0, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 600 µg/mL) preparada com quercetina, e os resultados foram expressos em µg de equivalentes de quercetina por mL de chá fermentado (µg EQ/mL).

### 4.3. Atividade antioxidante

#### 4.3.1. Redução do radical DPPH (1,1-difenil 2-picrilhidrazil)

A capacidade de redução do radical DPPH foi avaliada de acordo com Jafari et al. (2020), com modificações; a partir dos resultados obtidos nos experimentos de TPC e TFC. As amostras foram diluídas em água ultrapura (1:20). Alíquotas de 25 µL de cada amostra de chá e 175 µL de solução DPPH (0,01 mM) foram transferidas para microplacas de 96 poços. As amostras foram mantidas em ambiente escuro por 60 min; então, a absorbância foi medida a 517 nm em leitor de microplacas (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, USA). Os testes foram realizados em triplicada para cada amostra. Água com solução de DPPH foi usada como branco. A capacidade

antioxidante foi calculada a partir de curva padrão de Trolox (0, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 µg/mL) expressa em µg de equivalentes de Trolox por mL de chá fermentado (µg ET/mL), e porcentagem (%) da inibição de DPPH segundo a equação:

$$\% \text{ inibição } [(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}}] \times 100$$

#### 4.3.2 Redução do radical ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico)

A capacidade de redução do radical ABTS foi avaliada segundo Rufino et al. (2007), com modificações; a partir dos resultados obtidos nos experimentos de TPC e TFC. As amostras foram diluídas em água ultrapura (1:20). Cinco mililitros (5 mL) de solução aquosa de ABTS (7 mM) foi misturada com 88 µL de solução aquosa de persulfato de potássio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, 2,45 mM) e mantida em ambiente escuro por 12-16 h (26 °C). Logo após, a solução foi diluída com etanol (96 %, 1:10 (v / v)) até absorvância entre 0,700 e 734 nm. Então, foram adicionados 77,25 µL de cada uma das amostras e 150 µL da solução contendo o radical ABTS, seguido de incubação na ausência de luz à temperatura ambiente durante 6 min. A redução de ABTS foi medida a 734 nm em leitor de microplacas (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, USA). A capacidade antioxidante foi calculada a partir de curva padrão de ácido ascórbico (0; 6,25; 12,5; 50; 100; 150; 300; 600 µg/mL) expressa em µg de equivalentes de ácido ascórbico por mL de chá fermentado (µg EAA/mL), e porcentagem (%) da inibição de ABTS segundo a equação:

$$\% \text{ inibição } [(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}}] \times 100$$

#### 4.4. Atividade antimicrobiana

A partir dos resultados obtidos nos experimentos de TPC, TFC e potencial antioxidante, os ensaios foram realizados para cada amostra logo após o processo de fermentação e após neutralização a pH 7,0 com solução de NaOH (1 M), separadamente. Todas as amostras foram centrifugadas a 15.000 rpm por 15 min para remoção de detritos celulares. Os sobrenadantes foram esterilizados por filtração em microfiltro estéril (0,22 µm), de acordo com Al-Mohammadi et al. (2021).

#### 2.4.1 Método de difusão em ágar

A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo ensaio de difusão em poços segundo Ivanisova et al. (2019), com modificações. Foram utilizadas linhagens padrões de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), *Escherichia coli* (ATCC 11219) e *Salmonella enterica* (ATCC 14028). Inicialmente, as bactérias foram reativadas em 5 mL de caldo nutriente seguido de incubação a 37 °C durante 24 h. Uma suspensão de 100 µL de cada microrganismo (aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL, escala 0,5 *MacFarland*) foi espalhada uniformemente por toda superfície de placas de Petri de 150 mm contendo *Mueller – Hinton Agar* (MHA). Posteriormente, o ágar inoculado foi perfurado de modo a se obterem orifícios de 6 mm de diâmetro, dentro dos quais foram acrescidos 20 µL das amostras. As placas foram mantidas em repouso à temperatura ambiente ( $26 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$ ) durante duas h para difusão das amostras no meio de cultura; após, as placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h. Água ultrapura e cloranfenicol (1:100 v/v) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. Os diâmetros das zonas de inibição indicadas pelos halos foram medidos em milímetros (mm) com auxílio de um paquímetro digital.

#### 2.4.2 Concentrações inibitórias e bactericidas mínimas (MIC/MBC)

As concentrações inibitórias e bactericidas mínimas foram determinadas pela técnica de microdiluição em caldo, utilizando-se microplacas de 96 poços, com fundo em U, de acordo com Mizuta et al. (2020), com modificações. Foram utilizadas as mesmas linhagens de microrganismos do teste de sensibilidade que apresentarem halos significativos ( $> 8$  mm), reativadas nas mesmas condições. Diluições em série em salina estéril das amostras de kombucha (50 - 0,1%) e 5 µL da suspensão de microrganismo padrão ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) foram inoculados em cada poço. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 h, e o crescimento foi mensurado em leitor de placas ( $\text{OD}_{600}$ ). A MIC foi definida como a menor concentração do chá fermentado capaz de inibir o crescimento bacteriano. Após este período, 20 µL de cada poço foram semeados em Ágar Triptona de Soja (TSA) e incubados a 37 °C por 24 h para leitura, onde foi determinada a menor concentração capaz de inibir a

formação de colônias em meio de cultura sólido (MBC). Os experimentos foram realizados em triplicata.

## 4.5 Análise do perfil metabólico

### 4.5.1 Ácidos orgânicos e etanol

O perfil dos ácidos orgânicos e etanol do chá fermentado das amostras selecionadas foi determinado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As concentrações dos principais ácidos orgânicos (ácidos acético, láctico, glicônico, glicurônico, succínico, málico, propiônico e butírico) e etanol das bebidas foram determinadas em cromatógrafo LC-20A *Prominence Shimadzu* (Shimadzu Co. Nakagyo-ku, Kyoto, Japão) equipado com detector de índice refrativo RID-20A e coluna *Aminex HPX-87H* (300 x 7,8 mm, 9 µm, Munich, Germany) de acordo com Neffe-Skocinska et al. (2017), em triplicata. Vinte microlitros (20 µL) de cada amostra de kombucha fermentada foi filtrada em membranas de acetato de celulose com poros de 0,22 µm de diâmetro. A fase móvel utilizada foi uma solução de 5 mM de ácido sulfúrico (Millipore, Germany) em água ultrapura. A corrida foi realizada em modo isocrático com fluxo de 0,7 mL/min e temperatura do forno a 40 °C. Os picos e as áreas para determinação das concentrações foram identificados com base no tempo de retenção (RT), utilizando-se curvas-padrão para cada metabólito analisado.

### 4.5.2 Compostos fenólicos

O perfil dos compostos fenólicos do chá fermentado das amostras selecionadas foi determinado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As concentrações dos compostos fenólicos (ácidos gálico, fólico, caféico, rutina e quercetina) das bebidas foram determinadas em cromatógrafo LC-20A *Prominence Shimadzu* (Shimadzu Co. Nakagyo-ku, Kyoto, Japão) equipado com SPD-20A, com comprimento de onda a 325 nm e coluna *Kinetex C18 100 A* (250 x 4,6 mm, Torrance, Califórnia, USA). Dez microlitros (10 µL) de cada amostra de kombucha fermentada foi filtrada em membranas de acetato de celulose com poros de 0,22 µm de diâmetro. A eluição foi realizada em gradiente, com fases móveis de ácido acético 0,1 % em água ultrapura (fase A) e acetonitrila (fase B). Com fluxo de 1 mL/min. Os picos e as

áreas para determinação das concentrações foram identificados com base no tempo de retenção (RT), utilizando-se curvas-padrão para cada metabólito analisado.

#### 4.5.3 Açúcares residuais

O perfil de açúcares residuais do chá fermentado das amostras selecionadas foi determinado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As concentrações dos açúcares (sacarose, glicose, frutose, xilose e arabinose) das bebidas foram determinadas em cromatógrafo LC-20A *Prominence Shimadzu* (Shimadzu Co. Nakagyo-ku, Kyoto, Japão) equipado com detector de índice refrativo RID-20A e uma coluna Hamilton RCM-Monosaccharide PB2+ (8%) (300 x 7,8 mm, Munich, Germany). Vinte microlitros (20  $\mu$ L) de cada amostra de kombucha fermentada foi filtrada em membranas de acetato de celulose com poros de 0,22  $\mu$ m de diâmetro. Como fase móvel foi utilizada água ultrapura. A corrida ocorreu de modo isocrático com fluxo de 0,6 mL/min e temperatura de 85 °C. Os picos e as áreas para determinação das concentrações foram identificados com base no tempo de retenção (RT), utilizando-se curvas-padrão para cada metabólito analisado.

#### 4.6. Análise metagenômica tipo *Shotgun*

Análise metagenômica tipo *Shotgun* foi realizada para as amostras de kombucha (fase líquida) obtidas conforme descrito no tópico anterior, após o 7<sup>o</sup> dia de fermentação.

##### 4.6.1. Extração de DNA metagenômico

Para a extração do DNA metagenômico, 15 mL de cada amostra foram submetidos à centrifugação a 4.500 rpm durante 30 min. O *pellet* obtido foi lavado 2 x com tampão PBS (137 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl; 10 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 2 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [pH 7,2]) e, então novamente centrifugado a 6.000 rpm por 15 minutos. O *pellet* foi lavado 2 x com 2 mL de tampão TE (50 mM de Tris; 1 mM de EDTA [pH 8]), centrifugado a 13.000 rpm por cinco min e o *pellet* incubado em 1000  $\mu$ L de tampão TES (50 mM de Tris; 1 mM de EDTA [pH 8]; 8,7% de sacarose), incluindo 250 U de liticase (Sigma-Aldrich) e 1.000 U de lisozima (Sigma-Aldrich) por uma hora a 37 °C. A amostra foi centrifugada a 6.000 rpm por 15 min e o sobrenadante descartado. O

DNA total foi extraído utilizando-se kit de extração *DNeasy PowerFood Microbial* (QIAGEN®), com modificações no protocolo do fabricante, segundo Arikan et al. 2020.

#### 4.6.2. Preparo das bibliotecas genômicas e sequenciamento

O preparo das bibliotecas genômicas foi realizado de acordo com o protocolo *Illumina Nextera XT* (Illumina®). O DNA foi quantificado em *Qubit High Sensitivity dsDNA*. A qualidade final da biblioteca foi avaliada pela análise em *chip* de DNA de Alta Sensibilidade (Agilent®) e a quantificação por qPCR por meio de kit de quantificação de biblioteca KAPA para *Illumina* (Roche®). O sequenciamento foi realizado em *NextSeq500* usando um kit *High Output v2* de 300 ciclos (Doyle et al., 2017).

#### 4.6.3 Análise dos metadados

As *reads* foram obtidas a partir da execução de sequenciamento *Nextera XT* na forma arquivos Bcl. Esses arquivos foram convertidos para o formato *fastq* por meio do *software* *bcl2fastq* v. 2.19 (Illumina®). A ferramenta *Picard* v. 2.7.1 (<http://picard.sourceforge.net>), foi usada para converter o *fastq* para o formato *Sam* e para remover duplicatas. As sequências foram verificadas quanto à qualidade e cortadas utilizando-se *bwa* v. 0.7.15 (Li e Durbin, 2009). As sequências *forward* e *reverse* foram combinadas em um único arquivo *fasta* para cada amostra. O programa *Kaiju* (Menzel et al., 2016) foi utilizado para atribuir taxonomia às *reads*, descartando táxons com abundância relativa inferior a 0,1%. As análises e gráficos foram gerados em *software* *R Studio* versão 3.6.0 (Team, 2014) ou *Past* versão 3.21 (Hammer e Harper, 2001).

A intensidade e a direção das relações lineares foram calculadas para todos os ensaios de composição bioativa e atividade biológica *in vitro*, e o perfil de composição da comunidade microbiana, por meio do coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) com valores no intervalo entre -1 e +1, ou próximos ao grau de relacionamento entre as variáveis.

#### 4.7 Seleção e isolamento de linhagens microbianas

Para o isolamento, foram utilizadas condições e meios específicos para cada grupo microbiano que compõe a comunidade no chá fermentado. Para as bactérias ácido acético (BAA) e leveduras foi realizado o plaqueamento das diluições  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  em *spread plate* em ágar GYC (ágar: 20 g/L, glicose: 50 g/L, extrato de levedura: 10 g/L e carbonato de cálcio: 30 g/L) e YGC (ágar: 15 g/L, glicose: 20 g/L, extrato de levedura: 5 g/L e cloranfenicol: 0,1 g/L), respectivamente, as placas foram incubadas em BOD em aerobiose a  $30$  ou  $28 \pm 1$  °C por 3 a 5 dias; para bactérias ácido láctico (BAL) foi realizado o plaqueamento das diluições  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  em *pour plate* em ágar MRS (ágar: 12 g/L, hidrogenofosfato dipotássico: 2 g/L, glicose: 20 g/L, sulfato de magnésio: 0,1 g/L, sulfato manganoso monhidratado: 0,05 g/L, extrato de carne: 5 g/L, acetato de sódio: 5 g/L, citrato de triamônio: 2 g/L, peptona: 10 g/L e extrato de levedura: 5 g/L), as placas foram incubadas em BOD em jarras de anaerobiose a  $30 \pm 1$  °C por 3 a 4 dias. Todos os meios foram previamente esterilizados a 121 °C por 15 min. Um número representativo de cada morfotipo foi selecionado, baseado na quantidade total de colônias em cada placa com crescimento microbiano; cada colônia selecionada foi transferida para novas placas, por esgotamento de estrias, até obtenção de uma cultura pura.

#### 4.8 Identificação taxonômica do isolados

Para identificação genotípica dos isolados, foi realizada à amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) do DNA de colônias recentemente crescidas. Para as bactérias, o gene rRNA 16S foi amplificado com os *primers* 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1100R (5'-AGGGTTGCGCTCGTT-3'). A amplificação foi realizada em termociclador (Applied Biosystems, Veriti), cada reação consistiu em 15 µL de Master mix; 9 µL de H<sub>2</sub>O milli-Q e 0,5 µL (20 mM) de cada *primer* e o DNA molde obtido de células bacterianas de uma colônia isolada cultivada em ágar BHI. Como controle positivo foi utilizado *Lacticaseibacillus casei* e como controle negativo, a reação acrescida de 1 µL de água mili-Q. Fragmentos de DNA bacteriano foram amplificados da seguinte forma: desnaturação inicial a 95 °C por 10 min, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento a 55 °C

por 1 min s, extensão a 72 °C por 1 min, e uma etapa de extensão final de 5 min a 72 °C.

Para as leveduras, o gene rRNA 26S foi amplificado com os *primers* NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACG-3'). Cada reação consistiu em 19 µL de Master mix; 5,0 µL de H<sub>2</sub>O milli-Q e 0,5 µL (10 mM) de cada *primer* e o DNA molde. Como controle positivo foi utilizado *Candida parapsilosis* e como controle negativo, a reação acrescida de 1 µL de água mili-Q. O programa de PCR teve uma desnaturação inicial a 94 °C por 10 min, seguida por 35 ciclos consistindo de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 50 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 1:30 min, e uma etapa de extensão final de 5 min a 72 °C. Os produtos foram armazenados a -20 °C até o momento da corrida eletroforética. Alíquotas (10 µL) foram utilizadas para analisar a produção e o tamanho dos amplicon gerados em eletroforese em gel de agarose a 0,8 % (grau de eletroforese, Invitrogen) (100 V, uma hora) em tampão TBE 1X (90 mM Tris base, 90 mM ácido bórico e 0,1 mM EDTA, pH 8,3). Os géis foram corados com gel *red* (5 µgml<sup>-1</sup>) e visualizados sob luz ultravioleta. Os amplicons foram purificados com ExoSAP-ITTM e encaminhadas para reações de sequenciamento (AB 3500 Genetic Analyzer, com geração de aproximadamente 700 nucleotídeos). Os primers foram utilizados em reações de sequenciamento separadas, gerando dados de ambas as cadeias de DNA. Os *contigs* das sequencias *forward* e *reverse* foram montadas usando o software *MEGA-X*. As atribuições taxonômicas dos isolados foram baseadas em comparações da sequência de consenso com sequências no GenBank aplicando o BLASTn ([//blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)) no Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Biossíntese de compostos bioativos em amostras de kombucha ao longo do processo de fermentação

A evolução da biossíntese de compostos fenólicos totais (TPC) e flavonoides totais (TFC) no decorrer do processo fermentativo para as diferentes amostras de kombucha está demonstrada na Tabela 3. O tempo de fermentação é um dos principais critérios a serem destacados durante o processo de fermentação; a produção de compostos de interesse e/ou benéficos a saúde depende, dentre outros fatores, do tempo em que o produto permanece nas condições fermentativas (Miranda et al., 2022). Para todas as amostras analisadas, ocorreu um aumento no teor de compostos bioativos ao longo dos 21 dias de fermentação (Figura 1).

Variações podem ser observadas nas diferentes amostras analisadas; contudo, um perfil de biossíntese pode ser verificado ao longo do processo de fermentação. Os teores de TPC aumentaram durante a fermentação até o 21º dia para todas as amostras. O tempo 0 (após adição da cultura *starter*) diferiu estatisticamente ( $p < 0,01$ ) de todos os demais pontos de análise, exceto do 4º dia, que não revelou concentrações de TPC maiores. Os 4º e 7º dias não apresentaram diferenças significativas entre si no conteúdo fenólico total, assim como entre os 7º e 10º dias. Semelhante ao verificado por Zhou et al. (2022), onde os teores de TPC aumentaram com o processo de fermentação e atingiram o pico no 6º dia, estes se mantiveram constantes até o 14º. Ainda, para Jakubczyk et al. (2020) não existem diferenças significativas após o 7º dia de fermentação. Portanto, a partir de uma semana em fermentação a 25 °C, a fermentação de kombucha apresenta estabilidade na produção de TPC, com tempo suficiente para biossíntese desses compostos.

Tabela 3. Teor de compostos fenólicos (TPC) e flavonoides totais (TFC) *in vitro* de amostras de kombucha brasileiras após fermentação a 25 °C durante 21 dias.

Amostra	TPC (mg EAG/mL)					
	Tempo de Fermentação					
	0 <sup>a</sup>	4 <sup>ab</sup>	7 <sup>bc</sup>	10 <sup>c</sup>	14 <sup>d</sup>	21 <sup>d</sup>
K01	31,74 ± 1,95	32,46 ± 0,14	32,52 ± 0,58	37,94 ± 0,78	44,9 ± 2,23	44,99 ± 1,8
K02	35,19 ± 1,32	66,66 ± 4,52	76,65 ± 7,08	96,29 ± 3,31	121,38 ± 6,5	127,09 ± 0,84
K03	38,15 ± 0,88	45,36 ± 3,13	54 ± 4,64	55,02 ± 0,66	67,13 ± 12,38	73,32 ± 6,34
K04	35,17 ± 2,26	45,07 ± 1,22	50,41 ± 1,23	58,92 ± 1,98	69,46 ± 2,17	66,18 ± 4,52
K05	42,76 ± 0,57	57,86 ± 7,48	73,06 ± 1,67	84,86 ± 2,49	104,71 ± 4,9	101,49 ± 5,26
K06	26,49 ± 0,79	32,96 ± 5,76	41,18 ± 9,03	41,18 ± 1,93	47,32 ± 0,2	43,64 ± 0,59
K07	40,38 ± 3,83	53,31 ± 2,04	60,07 ± 1,43	74,11 ± 1,37	84,79 ± 6,58	90,38 ± 1,56
K08	31,47 ± 1,48	33,54 ± 1,5	35,6 ± 3	40,64 ± 2,14	46,05 ± 2,36	46,2 ± 4,38
K09	27,22 ± 0,73	29,07 ± 0,1	29,73 ± 1,89	37,86 ± 0,89	41,51 ± 5,62	43,58 ± 1,31
K10	27,33 ± 1,18	30,17 ± 1,14	34,66 ± 0,5	36,99 ± 1,52	40,23 ± 7,14	42,9 ± 1,09
K11	32,29 ± 1,57	32,52 ± 1,76	37,05 ± 1,26	41,45 ± 1,01	45,57 ± 0,94	47,96 ± 1,14
K12	30,73 ± 3,08	35,67 ± 1,51	42,86 ± 2,82	53,41 ± 0,87	68,51 ± 1,69	68,56 ± 2,68
K13	30,61 ± 0,57	34,58 ± 0,48	39,77 ± 5,39	39,7 ± 0,87	58,93 ± 8,02	57,76 ± 8,25
K14	35,64 ± 2,14	38,77 ± 1,2	46,45 ± 2,12	54,49 ± 2,99	71,57 ± 7,11	81,06 ± 1,56
K15	36,69 ± 0,87	45,5 ± 0,4	44,84 ± 0,7	50,05 ± 1,98	66,21 ± 2,85	64,59 ± 2,57
K16	38,06 ± 0,95	40,39 ± 1	58,33 ± 2,99	73,44 ± 0,83	87,85 ± 1,18	81,65 ± 0,74
K17	36,66 ± 0,78	38,71 ± 0,12	42,99 ± 1,37	54,49 ± 1,25	70,8 ± 2,48	75,11 ± 1,56
K18	36,1 ± 0,54	41,08 ± 2,19	52,52 ± 3,27	59,59 ± 2,31	81,72 ± 1,63	79,87 ± 6,47
K19	30,49 ± 0,1	39,34 ± 0,77	50,78 ± 1,75	61,48 ± 3,14	84,21 ± 5,44	91,97 ± 5,6

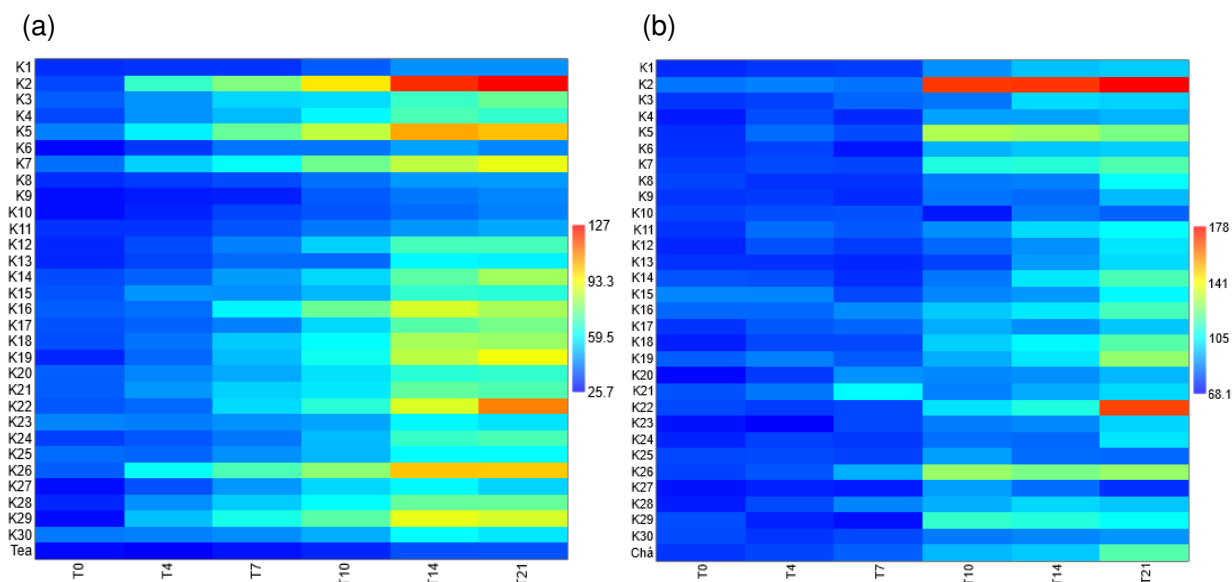
Continua

						Conclusão
K20	38,33 ± 0,87	43,65 ± 1,94	48,31 ± 1,05	55,56 ± 3,06	64,87 ± 1,18	65,98 ± 3,16
K21	38,21 ± 2,13	45,78 ± 3,32	53,51 ± 1,09	56,5 ± 4,28	72,15 ± 2,75	69,95 ± 2,71
K22	37,12 ± 0,63	39,66 ± 0,74	54,87 ± 3,18	64,7 ± 2	88,62 ± 2,85	110,03 ± 3,71
K23	43,3 ± 1,37	42,38 ± 0,35	45,21 ± 1,67	47,63 ± 1,01	58,54 ± 2,22	55,86 ± 0,74
K24	34,16 ± 2,19	37,18 ± 1,58	41,5 ± 1,15	50,45 ± 0,76	66,78 ± 1,41	69,15 ± 1,56
K25	39,94 ± 1,19	39,11 ± 0,83	44,84 ± 4,09	50,05 ± 3,52	59,69 ± 3,94	59,87 ± 4,27
K26	38,06 ± 0,19	60,41 ± 2,79	69,47 ± 3,8	78,14 ± 2,19	101,07 ± 4,21	100,3 ± 3,5
K27	27,24 ± 0,62	36,31 ± 2,25	45,83 ± 5,18	54,22 ± 4,78	58,93 ± 1,9	53,7 ± 3,18
K28	30,81 ± 0,7	44,73 ± 4,2	52,89 ± 7,28	59,59 ± 8,07	72,72 ± 13,18	72,72 ± 12,54
K29	26,9 ± 1,26	51,18 ± 3,49	62,42 ± 2,37	71,15 ± 2,49	90,34 ± 3,28	87,8 ± 2,96
K30	41,74 ± 4,35	42,66 ± 2,1	44,6 ± 0,3	48,71 ± 0,5	59,69 ± 1,08	56,26 ± 0,49
Chá	26,89 ± 0,49	25,71 ± 1,33	28,11 ± 0,51	30,47 ± 0,57	36,17 ± 1,11	36,49 ± 0,64
TFC (mg EQ/mL)						
Tempo de fermentação						
	0 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	10 <sup>b</sup>	14 <sup>bc</sup>	21 <sup>c</sup>
K01	74,12 ± 0,67	75,75 ± 0,58	76,8 ± 3,16	88,82 ± 3,06	95,81 ± 5,42	97,58 ± 1,18
K02	84,95 ± 0,84	86,82 ± 1,52	84,66 ± 1,66	170,07 ± 14,23	170,57 ± 25,36	178,14 ± 1,57
K03	75,79 ± 1,05	77,54 ± 3,04	82,52 ± 0,67	85,07 ± 1,58	99,62 ± 6,24	98,42 ± 6,56
K04	71,62 ± 3,81	79,08 ± 1,18	73,95 ± 1,77	91,5 ± 0,44	91,76 ± 2,63	93,97 ± 1,04
K05	74,71 ± 10,38	83,61 ± 0,29	78,95 ± 2,07	129,89 ± 4,4	127,95 ± 6,42	122,31 ± 7,89
K06	74,95 ± 3,12	77,54 ± 1,91	71,09 ± 1,58	93,82 ± 14,27	96,52 ± 12,13	97,86 ± 13,13
K07	76,62 ± 4,83	78,73 ± 2,92	77,88 ± 2,49	109,18 ± 1,58	110,1 ± 2,36	116,19 ± 5,79
K08	77,81 ± 0,17	75,39 ± 1,77	75,2 ± 1,97	85,79 ± 1,77	86,52 ± 3,32	105,36 ± 3,75
K09	75,67 ± 3,81	76,46 ± 3,15	74,13 ± 1,1	84,71 ± 1,1	83,43 ± 3,82	94,81 ± 2,39
K10	77,57 ± 0,77	79,32 ± 1,91	80,02 ± 5,25	71,38 ± 1,09	85,57 ± 8,59	82,31 ± 3,99
K11	75,43 ± 3,36	83,85 ± 3,76	80,91 ± 2,56	88,64 ± 4,06	99,62 ± 1,47	104,81 ± 5,5
Continua						

						Conclusão
K12	73,4 ± 5,84	79,8 ± 2,45	76,63 ± 1,54	82,93 ± 1,58	88,9 ± 2,76	101,19 ± 8,45
K13	75,43 ± 3,36	74,92 ± 2,95	73,59 ± 2,16	77,39 ± 12,69	90,57 ± 3,09	99,53 ± 4,63
K14	80,19 ± 2,43	79,56 ± 0,45	74,66 ± 1,41	85,25 ± 2,78	101,52 ± 2,88	115,36 ± 4,53
K15	87,45 ± 2,48	87,3 ± 0,45	78,59 ± 3,74	87,39 ± 2,91	90,1 ± 2,88	103,97 ± 2,58
K16	82,93 ± 0,51	82,89 ± 1,05	88,23 ± 4,73	97,04 ± 2,64	101,52 ± 2,94	114,81 ± 7,46
K17	75,55 ± 2,07	80,99 ± 2,05	82,7 ± 1,54	92,93 ± 2,24	88,67 ± 6,63	96,75 ± 1,8
K18	72,33 ± 5,1	78,13 ± 1,98	78,59 ± 3,81	97,93 ± 7,04	104,14 ± 3,82	117,03 ± 2,75
K19	81,5 ± 2,28	86,35 ± 2,11	81,27 ± 1,58	92,93 ± 5,22	101,29 ± 5,18	125,92 ± 8,9
K20	69,12 ± 5,7	76,58 ± 3,12	89,13 ± 3,56	87,75 ± 2	88,9 ± 2,36	94,53 ± 2,58
K21	79,95 ± 7	85,27 ± 1,21	104,3 ± 0,76	86,68 ± 5,3	92,71 ± 4,4	99,25 ± 5,14
K22	78,52 ± 5,25	76,35 ± 1,02	78,05 ± 0,87	100,96 ± 1,77	109,14 ± 7,65	168,42 ± 4,46
K23	70,67 ± 0,45	68,13 ± 2,83	78,41 ± 1,77	86,14 ± 3,58	87,71 ± 2,1	98,69 ± 1,71
K24	73,05 ± 6,87	77,18 ± 1,34	76,09 ± 1,34	84 ± 1,16	82,95 ± 1,47	101,19 ± 5,2
K25	78,4 ± 3,69	78,85 ± 1,85	77,52 ± 0,44	90,96 ± 1,75	83,67 ± 4,1	83,14 ± 2,83
K26	77,45 ± 2,8	80,39 ± 6,8	93,41 ± 6,45	126,68 ± 1,82	122 ± 4,4	126,47 ± 7,15
K27	70,67 ± 1,31	73,01 ± 5,15	71,8 ± 2,64	90,79 ± 5,13	83,67 ± 5,84	75,08 ± 2,72
K28	72,1 ± 4,21	78,61 ± 1,54	87,16 ± 4,61	93,46 ± 3,82	99,14 ± 8,02	96,75 ± 8,25
K29	79,24 ± 3,45	73,01 ± 8,46	70,38 ± 4,06	112,04 ± 1,77	109,62 ± 4,38	105,36 ± 1,71
K30	78,64 ± 0,58	75,63 ± 2,99	78,59 ± 2,87	85,79 ± 2,16	87,48 ± 2,36	89,53 ± 3,22
Chá	75,82 ± 5,07	77,89 ± 3,44	81,98 ± 0,91	94,54 ± 1,77	97 ± 5,08	116,75 ± 2,72

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de ensaios em triplicado e replicatas biológicas. Os sobrescritos representam dados com similaridade significativa ( $p < 0,05$ ) entre si pelo teste de Tukey, em ANOVA um critério para cada coluna em cada teste. TPC: Compostos fenólicos totais. TFC: Flavonoides totais. EAG: Equivalentes de Ácido gálico. EQ: Equivalentes de Quercetina.

Figura 1. Aumento do teor de compostos bioativos (fenólicos totais e flavonoides totais) após fermentação a 25 °C ao longo de 21 dias em diferentes amostras de kombucha.



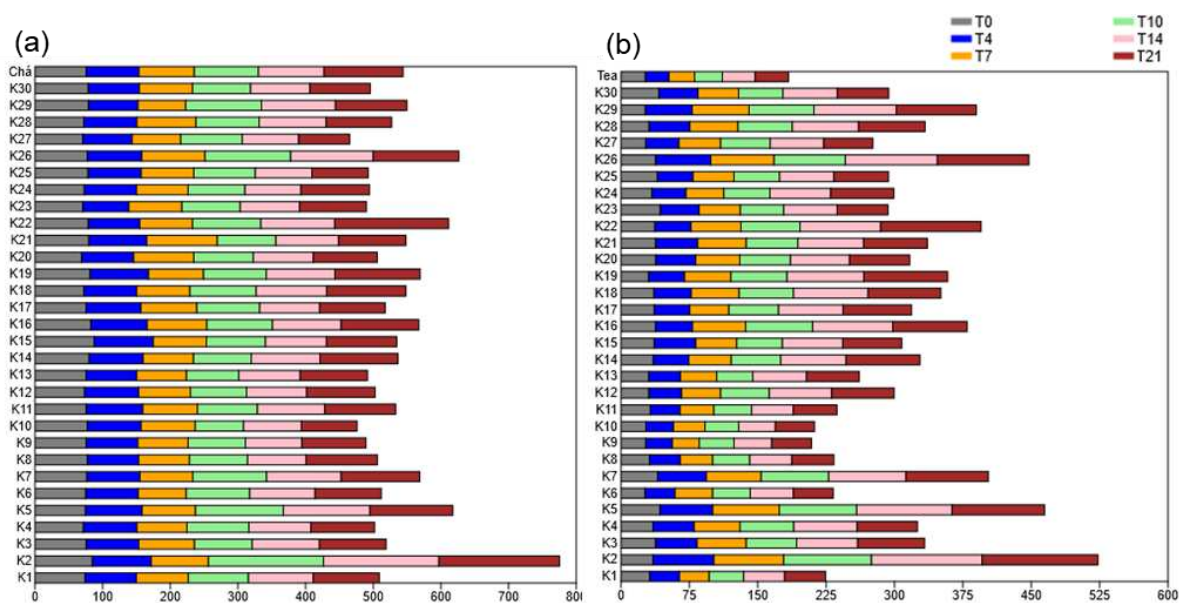
(a) Teor de compostos fenólicos totais (TPC, mg EAG/mL). (b) Teor de flavonoides totais (TFC, mg EQ/mL).

É importante destacar que, ainda que a maioria dos autores sugira o tempo de fermentação ideal como próximo ao 7<sup>o</sup> dia, variações nas condições de fermentação, assim como na composição microbiana do SCOBY podem impactar na qualidade da bebida. Segundo Kaewkod, Bovonsombut e Tragoolpua (2019), o conteúdo de TPC atinge maiores níveis após o 3<sup>o</sup> dia de fermentação, reduzindo-se gradativamente até o 9<sup>o</sup> dia, quando permanece estável. Teixeira et al. (2023) não verificaram diferenças significativas entre o primeiro e o 7<sup>o</sup> dia de fermentação para conteúdo fenólico.

Apesar do 21<sup>o</sup> dia diferir estatisticamente dos demais, exceto do 14<sup>o</sup>, apresentando elevados teores de TPC, esses tempos demasiadamente longos podem impactar negativamente na qualidade sensorial do produto, principalmente devido ao baixo pH e altos teores de ácido acético (Chakravorty et al., 2016; Cardoso et al., 2020). A partir do 14<sup>o</sup> dia, os compostos produzidos alteram o *flavor* característico da kombucha e, portanto, a fermentação deve ser interrompida antes desse período (Jayabalan et al., 2014; Miranda et al., 2022). Além disso, outros estudos demonstraram que o teor dos principais compostos tende a se reduzir a partir do 21<sup>o</sup> dia (Tanticharakunsiri et al., 2020; Ziemlewska et al., 2021).

Dentre os compostos fenólicos totais, a presença de flavonoides se destaca. O TFC aumentou relativamente pouco durante o início da fermentação, cujo pico ocorreu sobretudo após o 10º dia, quando atingiu estabilidade, não diferindo-se estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do dia 14 (Tabela 1). Ao contrário do TPC, o TFC é significativamente diferente entre o 10º e 7º dia de fermentação; esse último é semelhante aos dias 0 e 4, com baixa concentração (Figura 2). Para Jakubczyk et al., (2020), o TFC não diferiu estatisticamente do chá não fermentado até o 14º dia, mantendo valores baixos durante todo o processo; segundo os autores, esse comportamento parece estar relacionado à degradação do composto no início do processo fermentativo. Por fim, Li et al. (2022) observaram que, apesar do TPC aumentar, o TFC se manteve constante até o 15º dia de fermentação do chá. Segundo De Noronha et al., (2022), no início da fermentação pode ocorrer a degradação de alguns flavonoides pelas beta-glicosidases microbianas, resultando na produção de moléculas com menor peso molecular, como os ácidos fenólicos; isso explica o fato dos TPC não reduzirem seu teor, apesar na diminuição dos TFC.

Figura 2. Diferenças entre os diferentes tempos de fermentação no teor de compostos bioativos (fenólicos totais e flavonoides totais) a 25 °C em amostras de kombuchas brasileiras.



(a) Teor de compostos fenólicos totais (TPC, mg EAG/mL). (b) Teor de flavonoides totais (TFC, mg EQ/mL).

Esses resultados sugerem que, apesar do aumento de compostos bioativos ao longo do processo de fermentação, sobretudo de compostos fenólicos, um período

entre 7 e 10 dias parece ser o suficiente para atingir níveis de concentração e estabilidade que podem contribuir e/ou estarem relacionados ao perfil de atividade biológica em bebidas fermentadas. No entanto, análises do potencial bioativo são imprescindíveis para se validar o efeito biológico nesses tempos de fermentação.

## 5.2 Perfil de atividade antioxidante em amostras de kombucha em 7 e 10 dias de fermentação

De modo geral, a atividade antioxidante de um produto está positivamente correlacionada com a presença e abundância de compostos fenólicos (Zhang et al., 2023). A partir dos dados obtidos acerca da presença de compostos bioativos (TPC e TFC) ao longo do processo de fermentação, foram selecionadas 19 amostras para verificar o perfil de atividade antioxidante (DPPH e ABTS) no 7º e 10º dia de fermentação, descrito na Tabela 4 e mostrado da Figura 3. Em ambos os ensaios, não foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nas atividades antioxidantes das kombucha entre os dois tempos analisados.

Tabela 4. Perfil de atividade antioxidante (ensaio DPPH e ABTS) *in vitro* de amostras de kombucha após fermentação a 25 °C por 7 e 10 dias.

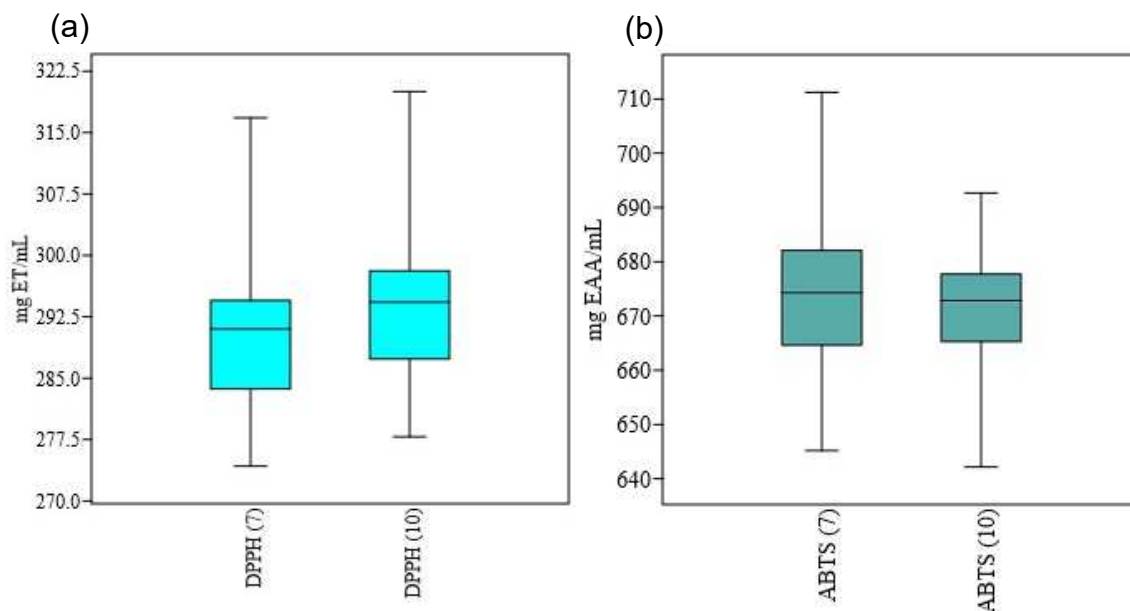
Amostras	DPPH mg ET/mL		ABTS mg EAA/mL	
	7 dias <sup>a</sup>	10 dias <sup>a</sup>	7 dias <sup>b</sup>	10 dias <sup>b</sup>
K02	316,80 ± 2,4	320,01 ± 2,4	711,24 ± 8,0	692,66 ± 11,6
K05	300,18 ± 6,2	303,49 ± 6,3	658,78 ± 6,6	652,79 ± 13,8
K06	312,35 ± 9,5	313,29 ± 13,3	664,68 ± 4,6	666,62 ± 3,0
K08	293,78 ± 0,7	297,45 ± 0,6	678,85 ± 16,1	675,87 ± 10,5
K10	284,09 ± 4,1	287,61 ± 4,1	677,69 ± 15,9	675,08 ± 10,4
K11	291,55 ± 2,0	295,95 ± 0,8	664,64 ± 1,8	666,45 ± 1,1
K13	280,56 ± 3,6	284,20 ± 3,6	669,04 ± 10,4	673,58 ± 12,7
K15	291,05 ± 2,7	294,47 ± 2,6	671,20 ± 4,6	666,58 ± 8,6
K16	295,16 ± 6,3	298,56 ± 6,3	677,48 ± 8,9	674,83 ± 5,9
K18	281,49 ± 2,6	285,03 ± 2,7	683,25 ± 7,3	678,33 ± 4,9
K20	283,55 ± 4,0	287,26 ± 4,0	683,14 ± 6,3	678,33 ± 4,2
K21	291,26 ± 6,2	294,52 ± 5,6	674,94 ± 5,9	664,91 ± 15,3
K23	283,42 ± 4,2	287,00 ± 4,1	663,63 ± 8,1	663,25 ± 7,5
K24	287,48 ± 3,0	291,25 ± 2,9	675,98 ± 11,5	673,41 ± 8,6

Continua

				Conclusão
K25	286,78 ± 2,0	289,88 ± 1,7	673,48 ± 9,4	672,25 ± 6,0
K26	294,74 ± 1,0	298,33 ± 0,9	684,83 ± 3,8	679,66 ± 2,5
K28	292,84 ± 4,7	296,23 ± 4,1	689,94 ± 13,4	680,41 ± 11,6
K29	290,97 ± 1,7	294,09 ± 1,5	673,65 ± 14,4	672,16 ± 9,4
K30	288,94 ± 2,5	292,76 ± 2,3	656,97 ± 8,7	661,29 ± 5,6
Chá	274,25 ± 2,1	277,83 ± 1,8	645,21 ± 3,5	642,16 ± 13,3

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de ensaios em triplicata. Letras sobrescritas representam dados com similaridade significativa ( $p < 0,05$ ) entre si pelo teste de Tukey, em ANOVA um critério para cada coluna. ET: Equivalentes de Trolox. EAA: Equivalentes de Ácido ascórbico.

Figura 3. Comparação entre a atividade antioxidante *in vitro* de amostras de kombucha brasileiras, após fermentação à 25 °C por 7 e 10 dias, pelos ensaios de redução do (a) radical 1-difenil 2-picrilhidrazil (DPPH) e (b) radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS).



Mizuta et al. (2020) não observaram diferenças significativas na atividade antioxidante (ABTS e FRAP) entre o 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias de fermentação de kombucha, apesar de verificarem estatisticamente uma variação para os ensaios com o radical DPPH; Amarasinghe, Weerakkody e Waisundara (2018) e Tanticharakunsiri et al. (2020) também não observaram diferenças na atividade antioxidante no mesmo período de fermentação. Elevadas concentrações de compostos bioativos podem atingir o limite de saturação da atividade antioxidante; neste ponto, o aumento na concentração desses compostos não melhora o perfil biológico da bebida (Tu et al., 2019). Esse processo parece ocorrer após o 7<sup>o</sup> dia de fermentação de kombucha, visto que, a partir desse período a atividade em geral se mantém constante na bebida.

A concentração dos compostos antioxidantes está relacionada principalmente à biotransformação de compostos complexos presentes no chá em substâncias mais simples. Este processo ocorre por meios da ação de enzimas e processos metabólicos da comunidade microbiana (Chakravorty et al., 2016; Zubaidah et al., 2018; Bortolomedi, Paglarini e Brod, 2022). Caso a degradação não resulte em produtos com atividade biológica, esse perfil pode não só se manter constante ao longo da fermentação, mas reduzir consideravelmente (Ozyurt, 2020; Lee et al., 2021).

Em linhas gerais, os resultados aqui apontados e a literatura específica indicam que prolongar o tempo de fermentação pode interferir na manutenção de altos teores de compostos com atividade antioxidante, e conseqüentemente, ter efeitos negativos nos benefícios associados ao consumo da bebida. Desse modo, um período de 7 dias de fermentação parece ideal para a estabilidade do perfil bioativo para amostras fermentadas a 25 °C. Análises posteriores poderão analisar o efeito desse tempo em outros potenciais biológicos da bebida, assim como considerar os demais fatores e condições que podem atuar na manutenção dessa atividade.

### **5.3 Diferentes perfis de composição bioativa e atividade antioxidante em kombucha brasileiras**

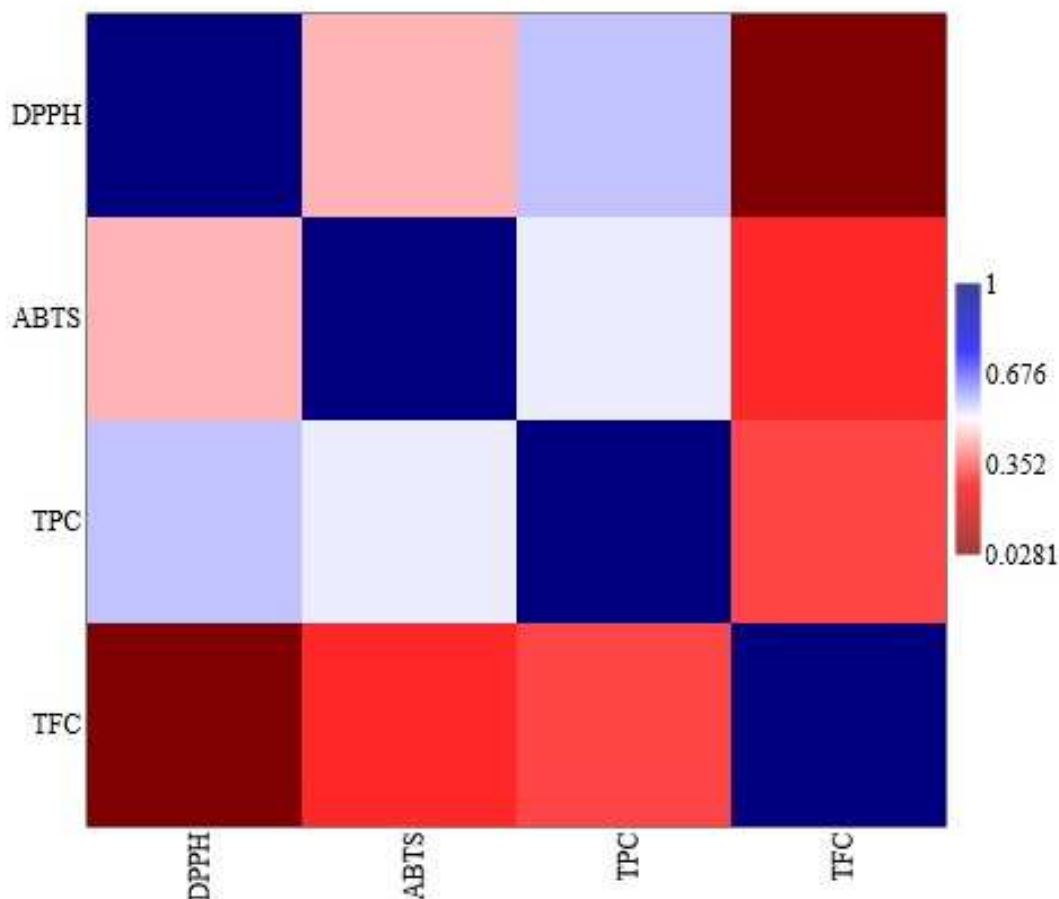
O perfil de atividade antioxidante e composição fenólica mostrou-se variável nas kombuchas produzidas e comercializadas no Brasil (Tabela 5). Tanto a atividade antioxidante quanto o TPC aumentaram em todas as amostras após o processo de fermentação; entretanto, o TFC reduziu significativamente para as amostras K06 e K29. Todos os dados apresentaram correlação (R) positiva, sobretudo entre os valores de DPPH e TPC (R=0,57) (Figura 4). De modo geral, em diversos estudos, é observada uma correlação entre potencial antioxidante e a composição fenólica (Zhang et al., 2023; Erskine et al., 2023); isso pode ser explicado pois, esses compostos, principalmente a classe dos ácidos fenólicos e flavonoides, naturalmente apresentam potencial redutor (Tessema et al., 2023; Ma e Khachemoune, 2023; Malarz, Yudina e Stojakowska, 2023; Xiong et al., 2023).

Tabela 5. Atividade antioxidante (ensaios de DPPH e ABTS) e teores de compostos fenólicos totais (TPC) e flavonoides totais (TFC) *in vitro* de amostras de kombucha brasileiras após fermentação a 25 °C durante 7 dias.

Amos- tras	DPPH		ABTS		TPC	TFC
	mg ET/mL	%	mg EAA/mL	%	mg EAG/mL	mg EQ/mL
<b>K2</b>	316,80 ± 2,4 <sup>a</sup>	144,78	711,24 ± 8,0 <sup>a</sup>	202,69	76,81 <sub>a</sub> ± 6,4	84,30 ± 1,1 <sub>b</sub>
<b>K5</b>	300,18 ± 6,2	137,23	658,78 ± 6,6 <sup>b</sup>	191,07	72,94 <sub>a</sub> ± 1,3	79,30 ± 1,7 <sub>b</sub>
<b>K6</b>	312,35 ± 9,5 <sup>a</sup>	142,76	664,68 ± 4,6 <sup>b</sup>	192,38	40,83 <sub>b</sub> ± 9,5	71,27 ± 1,7
<b>K8</b>	293,78 ± 0,7	134,33	678,85 ± 16,1 <sup>a, b</sup>	195,52	35,78 <sub>b</sub> ± 2,8	75,61 ± 1,9 <sub>b</sub>
<b>K10</b>	284,09 ± 4,1 <sup>b</sup>	129,92	677,69 ± 15,9 <sup>a, b</sup>	195,26	34,55 <sub>b</sub> ± 0,3	80,55 ± 4,6 <sub>b</sub>
<b>K11</b>	291,55 ± 2,0	133,31	664,64 ± 1,8 <sup>b</sup>	192,37	37,05 <sub>b</sub> ± 1,2	81,03 ± 2,0 <sub>b</sub>
<b>K13</b>	280,56 ± 3,6 <sup>b</sup>	128,32	669,04 ± 10,4 <sup>b</sup>	193,34	39,36 <sub>b</sub> ± 4,7	73,65 ± 2,0 <sub>b</sub>
<b>K15</b>	291,05 ± 2,7	133,09	671,20 ± 4,6 <sup>b</sup>	193,82	44,80 ± 0,6	77,34 <sub>b</sub> ± 2,7
<b>K16</b>	295,16 ± 6,3	134,95	677,48 ± 8,9 <sup>a, b</sup>	195,21	58,50 ± 2,4	86,86 <sub>b</sub> ± 3,1
<b>K18</b>	281,49 ± 2,6 <sup>b</sup>	128,74	683,25 ± 7,3 <sup>a</sup>	196,49	52,19 ± 3,2	78,59 <sub>b</sub> ± 3,2
<b>K20</b>	283,55 ± 4,0 <sup>b</sup>	129,68	683,14 ± 6,3 <sup>a</sup>	196,47	48,51 ± 0,8	88,29 <sub>b</sub> ± 2,4
<b>K21</b>	291,26 ± 6,2	133,18	674,94 ± 5,9 <sup>b</sup>	194,65	53,51 ± 1,0	104,48 ± 0,6 <sup>a</sup>
<b>K23</b>	283,42 ± 4,2 <sup>b</sup>	129,62	663,63 ± 8,1 <sup>b</sup>	192,15	45,38 ± 1,5	78,53 <sub>b</sub> ± 1,3
<b>K24</b>	287,48 ± 3,0 <sup>b</sup>	131,47	675,98 ± 11,5 <sup>a, b</sup>	194,88	41,46 ± 1,1 <sup>b</sup>	76,15 ± 0,9 <sub>b</sub>
<b>K25</b>	286,78 ± 2,0 <sup>b</sup>	131,15	673,48 ± 9,4 <sup>b</sup>	194,33	44,84 ± 3,5	77,58 <sub>b</sub> ± 0,4
<b>K26</b>	294,74 ± 1,0	134,76	684,83 ± 3,8 <sup>a</sup>	196,84	69,84 <sub>a</sub> ± 3,4	94,01 ± 5,5
<b>K28</b>	292,84 ± 4,7	133,90	689,94 ± 13,4 <sup>a</sup>	197,97	53,18 ± 7,0	86,98 <sub>b</sub> ± 3,7
<b>K29</b>	290,97 ± 1,7	133,05	673,65 ± 14,4 <sup>b</sup>	194,37	62,46 ± 2,4	70,91 ± 3,0
<b>K30</b>	288,94 ± 2,5 <sup>b</sup>	132,13	656,97 ± 8,7 <sup>b</sup>	190,67	44,68 ± 0,2	78,71 <sub>b</sub> ± 2,4
<b>Chá</b>	274,25 ± 2,1 <sup>b</sup>	125,46	645,21 ± 3,5 <sup>b</sup>	188,07	28,07 <sub>b</sub> ± 0,5	80,85 ± 1,1 <sub>b</sub>

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de ensaios em triplicado. Os sobrescritos representam dados com similaridade significativa ( $p < 0,05$ ) entre K2 (TPC) ou K21 (TFC) (a) e Chá não fermentado (b) pelo teste de Tukey, em ANOVA um critério. ET: Equivalentes de Trolox; EAA: Equivalentes de Ácido ascórbico; %: porcentagem de inibição, EAG: Equivalentes de Ácido gálico; EQ: Equivalentes de Quercetina.

Figura 4. Correlação entre o teor de compostos bioativos (fenólicos e flavonoides totais) e a atividade antioxidante em amostras de kombucha brasileiras após fermentação a 25 °C durante 7 dias.



DPPH: Redução do radical 1-difenil 2-picrilhidrazil (mg ET/mL). ABTS: Redução do radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (mg EAA/mL). TPC: Teor de compostos fenólicos totais (mg EAG/mL). TFC: Teor de flavonoides totais (mg EQ/mL).

As quantificações obtidas para os ensaios com DPPH e ABTS divergem, apesar de seguirem o mesmo perfil de redução, possuem uma correlação ( $R=0,44$ ) entre si. Segundo Moazzen et al. (2022), existe correspondência entre os valores obtidos com os dois métodos (DPPH e ABTS) analisados, entretanto, a correlação é baixa em muitos compostos fenólicos, e isso acontece devido as possíveis diferentes interações entre a estrutura da molécula e o mecanismo abordado em cada ensaio. No caso dos ensaios em DPPH, a presença de grupos 3-OH aumenta a atividade de flavonoides, ao passo que, porções glicosídicas suprimem seu potencial antioxidante; para o ABTS, a dos grupos doadores de elétrons (ambos  $-OH$  e  $-OCH_3$ ) em geral, contribuem para as capacidades antioxidantes (Moazzen et al., 2022). Além disso,

enquanto DPPH reage principalmente com radicais livres solúveis em água, ABTS interage com os hidrossolúveis e lipossolúveis, e apenas alguns grupos de flavonoides (Shi et al., 2022). Apesar de ambos os ensaios quantificarem o potencial redutor dos componentes da bebida, diferenças quanto à especificidade para os compostos presentes na amostra, bem como a interação entre eles, podem ser observadas.

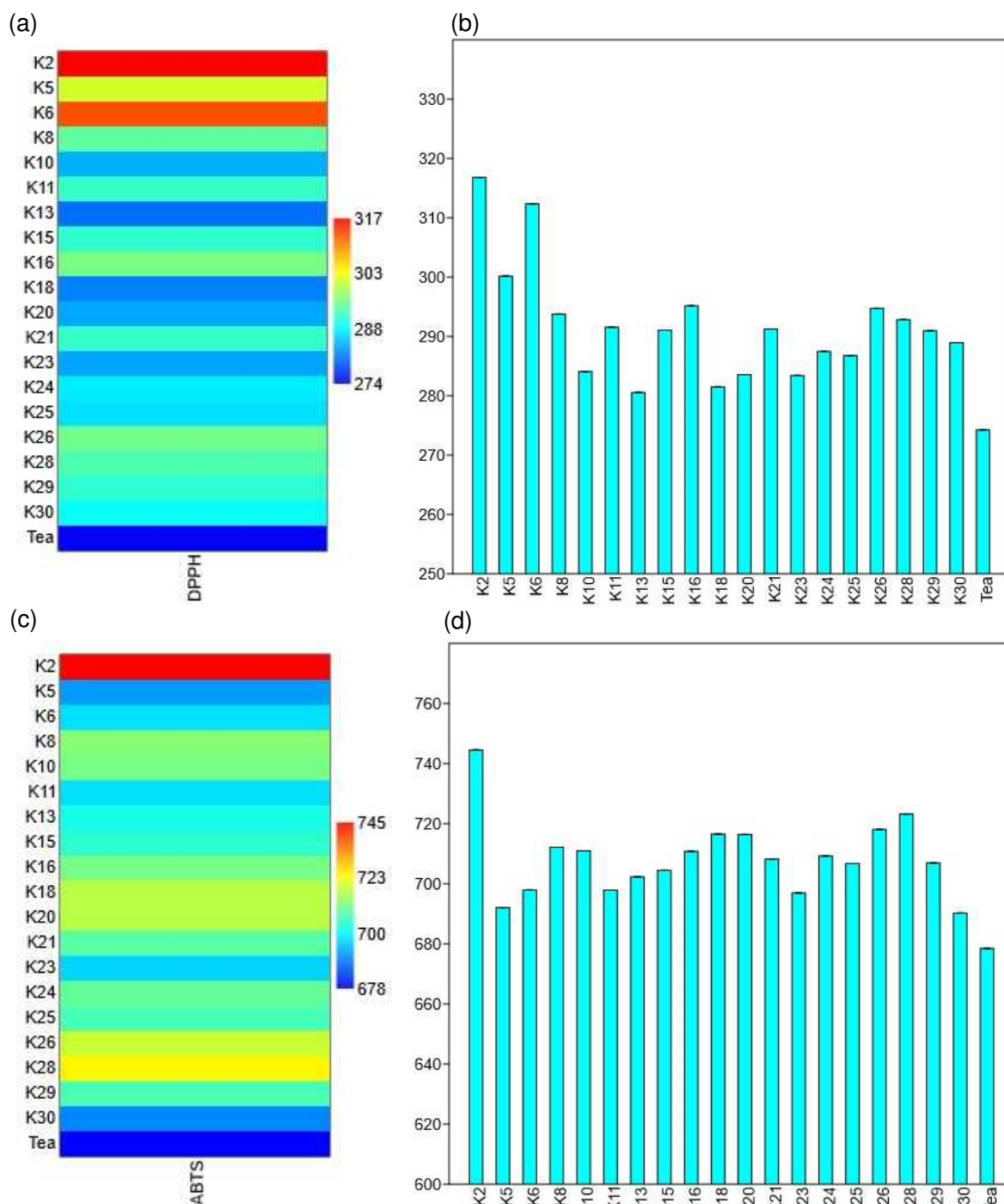
A maior concentração de fenólicos foi observada para as amostras K2, K5 e K26 ( $76,81 \pm 6,4$ ;  $72,94 \pm 1,3$  e  $69,84 \pm 3,4$  mg EAG/mL, respectivamente), com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao chá não fermentado (CNF) ( $28,07 \pm 0,5$  mg EAG/mL). Menores concentrações de flavonoides foram observadas, com apenas K6, K21, K26 e K29 com teores significativamente diferentes da amostra controle (CNF) ( $80,85 \pm 1,1$  mg EQ/mL); destaque para o maior teor relacionado à amostra K21 ( $104,48 \pm 0,6$  mg EQ/mL).

No processo de fermentação da kombucha, tanto altos teores de compostos bioativos (Zhou et al., 2022; Reyes-Flores et al., 2023) quanto baixos (Kaewkod et al., 2019; Oliveira et al., 2023) já foram relatados por diversos estudos; tal variação se deve principalmente à diversidade da microbiota, influenciada por características como origem da planta, localização geográfica, clima, tempo de fermentação, substrato utilizado para o processo, dentre outros (Sanwal et al., 2023; Kitwetcharoen et al., 2023; Su et al., 2023). Enzimas como tanases, produzidas por determinadas espécies microbianas, estão relacionadas à degradação de polifenóis complexos em moléculas menores, responsáveis pela elevação do conteúdo fenólico com potencial bioativo (Dueñas et al., 2007; Casarin et al., 2021); dessa forma, a ocorrência de determinadas espécies no processo fermentativo, como *Lactobacillus* spp., pode cumprir um papel relevante no perfil bioativo da bebida (Lekshmi et., 2021).

Além da presença de compostos bioativos, a análise do potencial antioxidante pelos ensaios de redução dos radicais DPPH e ABTS, revelou que a maioria das amostras de kombucha analisadas apresentaram atividade antioxidante maiores que o CNF (DPPH:  $274,25$  mg/mL $\pm 2,1$ ; ABTS:  $645,21$  mg/mL $\pm 3,5$ ), sobretudo em K2 (DPPH:  $316,80$  mg/mL $\pm 2,4$ ; ABTS:  $711,24$  mg/mL $\pm 8,0$ ) (Tabela 5, Figura 5). Zhou et al. (2022) observaram que a fermentação pode aumentar em até 3 vezes o potencial antioxidante do chá verde; já Gaggia et al. (2019) verificaram que o crescimento nesta atividade está principalmente relacionado à diversidade de leveduras na composição

das amostras; por fim, Jakubczyk et al. (2020) ressaltam o papel dos teores iniciais de polifenóis no chá, previamente à fermentação.

Figura 5. Atividade antioxidante (ensaio DPPH e ABTS) *in vitro* de amostras de kombucha brasileiras, após fermentação a 25 °C durante 7 dias.



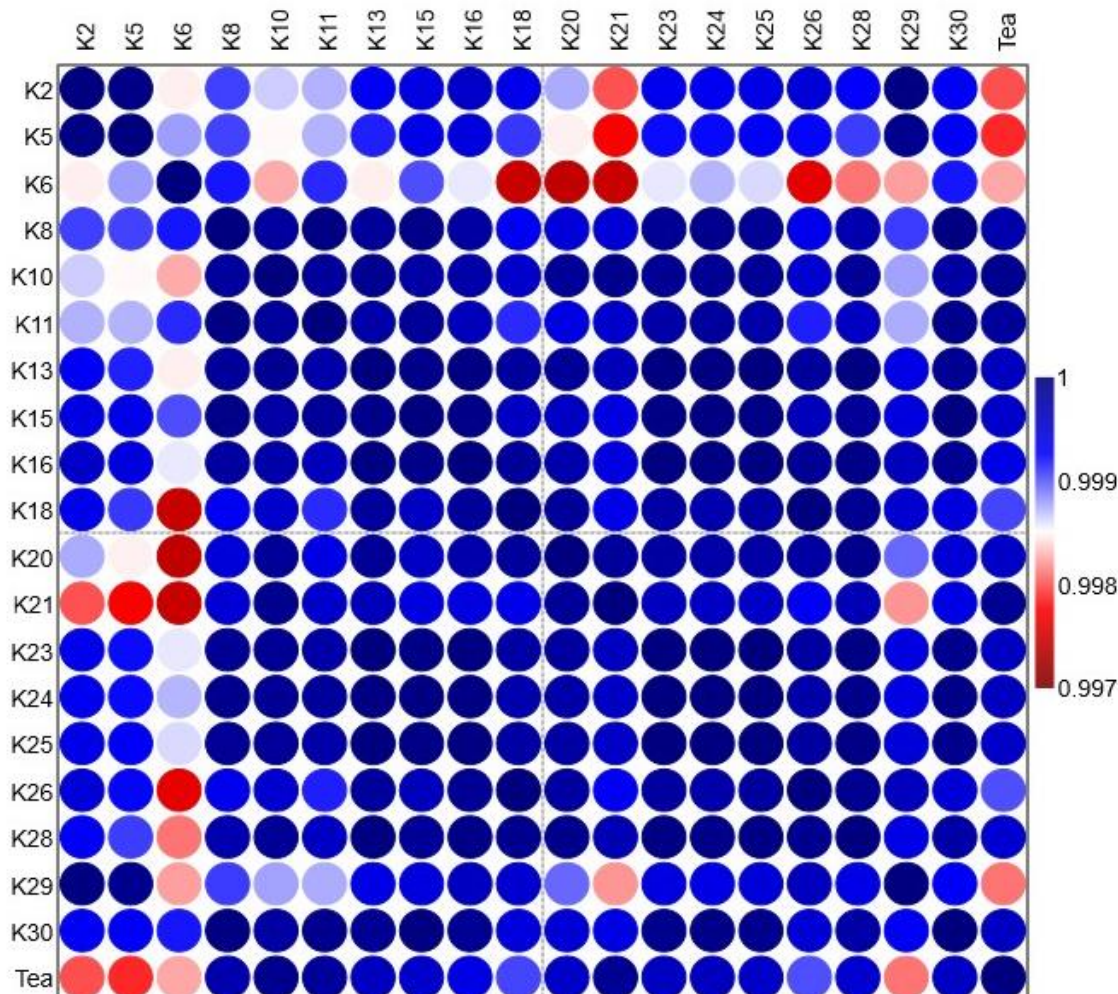
Ensaio de atividade antioxidante em DPPH *heat map* (a) e *bar chart* (b); em ABTS *heat map* (c) e *bar chart* (d). DPPH: Redução do radical 1-difenil 2-picrilhidrazil (mg

ET/mL). ABTS: Redução do radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (mg EAA/mL).

Entre os valores obtidos nas amostras, a menor redução dos radicais foi observada para K13 (DPPH:  $280,56 \pm 3,6$  mg/mL; ABTS:  $669,04 \pm 10,4$  mg/mL); apenas K10, K13, K18, K20, K23, K24, K25 e K30 não apresentam diferença significativa em relação ao CNF ( $p < 0.05$ ) para redução do radical DPPH; entretanto, para o radical ABTS, K2, K18, K20, K26 e K28 foram as únicas com diferença significativa em relação à amostra CNF (Tabela 3, Figura 6), não havendo grandes variações no perfil das amostras. Segundo Mizuta et al. (2020), análises de DPPH são mais eficientes para determinar e classificar amostras quanto ao perfil antioxidante; já para a análise de ABTS, devido à sua natureza, todos os compostos são quantificados.

Nesse contexto, não apenas a composição química natural do chá, mas fatores como a microbiota fermentadora, podem influenciar fortemente no potencial antioxidante, uma vez que, os compostos presentes precisam ser transformados e/ou degradados em moléculas menos complexas para que sua atividade bioativa seja verificada. Além disso, vale destacar que polifenóis não são os únicos compostos responsáveis pela atividade antioxidante presente na kombucha, com destaque para os ácidos orgânicos (Abaci, Deniz e Orhan, 2022; Wang et al., 2022). A partir dos dados de composição bioativa e atividade antioxidante, podemos observar ainda que algumas amostras apresentam perfil semelhante, o qual pode estar relacionado à uma composição da microbiota similar, bem como a presença de espécies metabolicamente correlacionadas (Figura 6).

Figura 6. Correlação entre as diferentes amostras de kombuchas brasileiras em termos de composição bioativa e atividade antioxidante.



### 5.3.1 Atividade antimicrobiana

O potencial antimicrobiano de kombuchas já foi avaliado em estudos publicados, com resultados promissores frente a diversas linhagens de patógenos de relevância alimentar (Nyiew, Kwong e Yow, 2022; İçen et al., 2023). Neste estudo, o potencial antimicrobiano de kombuchas brasileiras e o chá não fermentado (CNF) contra espécies microbianas comumente associadas a infecções alimentares foi avaliado (Tabela 6). Após um período de fermentação de 7 dias, nenhuma bebida apresentou efeito contra *L. monocytogenes* ou *E. coli*. Por outro lado, *S. aureus* e *S. enterica* tiveram seu crescimento inibido por várias amostras. O CNF não apresentou efeito no crescimento das culturas microbianas. Variáveis como o método de produção, qualidade do chá, condições de fermentação, bem como composição

microbiana do SCOBY podem interferir nas propriedades antimicrobianas da bebida (Hou, et al., 2020; Martin et al., 2022).

Tabela 6. Atividade antimicrobiana *in vitro* (teste de disco-difusão) de amostras de kombuchas brasileiras, após fermentação de 7 dias a 25 °C (halos de inibição em mm).

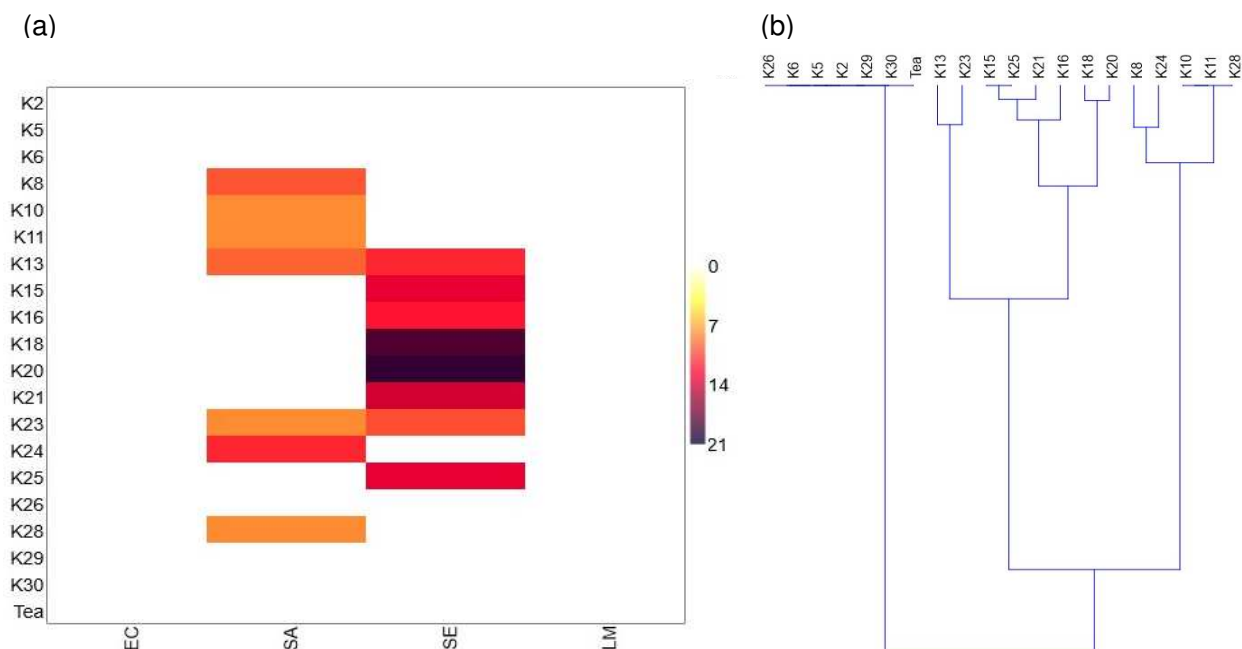
Amostras	Microrganismos			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella enterica</i>
K2	-	-	-	-
K5	-	-	-	-
K6	-	-	-	-
K8	9,77 ± 0,4 <sup>a</sup>	-	-	-
K10	8,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	-	-	-
K11	8,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	-	-	-
K13	9,33 ± 0,9 <sup>a</sup>	-	-	11,33 ± 0,9 <sup>a</sup>
K15	-	-	-	13,33 ± 0,9 <sup>b</sup>
K16	-	-	-	12,0 ± 0,0 <sup>a, b, c</sup>
K18	-	-	-	18,33 ± 0,4 <sup>d</sup>
K20	-	-	-	19,33 ± 0,4 <sup>d</sup>
K21	-	-	-	14,0 ± 0,0 <sup>e</sup>
K23	8,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	-	-	10,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
K24	11,33 ± 0,9 <sup>c</sup>	-	-	-
K25	-	-	-	13,33 ± 0,9 <sup>b, c, e</sup>
K26	-	-	-	-
K28	8,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	-	-	-
K29	-	-	-	-
K30	-	-	-	-
Chá	-	-	-	-

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de ensaios em triplicado. Os sobrescritos representam dados com similaridade significativa ( $p < 0,05$ ) entre si pelo teste de Tukey, em ANOVA um critério. (-): ausência de halo de inibição. ATCC: *American Type Culture Collection*.

Apenas as amostras K13 e K23 foram capazes de reduzir o crescimento tanto de *S. aureus* quando de *S. enterica* nas condições avaliadas. Além dessas amostras, K8, K10, K11, K24 e K28 inibiram o crescimento de *S. aureus*, enquanto K15, K16, K18, K20, K21 e K25, o de *S. enterica*, inclusive com a formação de halos maiores que os demais (até 19,33 ± 0,4 mm) (K20). Todas as amostras com atividade antimicrobiana diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do controle (CNF) (Figura 7). A ausência de atividade antimicrobiana no CNF confirma que as propriedades verificadas são provenientes de metabólitos sintetizados durante a fermentação da

kombucha, e não de compostos naturalmente presentes na matéria-prima. Segundo Bhattacharya et al. (2018), o efeito antimicrobiano de amostras de chá após 14 dias de fermentação (28 °C) estava principalmente relacionado à presença de compostos capazes de provocar aumento na permeabilidade da membrana em bactérias, resultando em estresse oxidativo devido à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que comprometem a membrana e inibem o crescimento microbiano. No caso do ácido acético, comumente associado a fermentações de kombucha, possui alta capacidade antimicrobiana, mesmo em baixas concentrações; sendo uma molécula lipofílica fraca, esse ácido difunde facilmente através da membrana, e seu efeito ocorre após sua dissociação na presença de pH mais elevado do interior da célula; os prótons liberados reduzem o pH interno e provocam o desacoplamento da fosforilação oxidativa, rompendo o gradiente de prótons da membrana, resultado na morte da célula (Matsushita et al., 2016).

Figura 7. Perfil de atividade antimicrobiana e similaridade entre amostras de kombucha brasileiras após fermentação a 25 °C durante 7 dias, frente microrganismos de importância alimentar.



(a) Diâmetro do halo de inibição (mm). (b) Dendrograma de similaridade entre as amostras. SA: *Staphylococcus aureus*. LM: *Listeria monocytogenes*. EC: *Escherichia coli*. SE: *Salmonella enterica*.

O tempo de fermentação parece ser um fator importante para os efeitos inibitórios da kombucha frente a patógenos. Segundo Akarca (2022), o chá fermentado durante 21 dias foi capaz de reduzir o crescimento de ampla gama de microrganismos patogênicos de origem alimentar, dentre eles *S. aureus* ( $12,64 \pm 0,17$ mm) e *S. enterica* ( $13,37 \pm 0,16$  mm), além de resultados positivos contra *Escherichia coli* O157:H7 ( $13,32 \pm 0,15$  mm), *L. monocytogenes* ( $10,13 \pm 0,12$  mm), *Enterococcus faecalis* ( $11,26 \pm 0,19$  mm) e *Bacillus cereus* ( $12,54 \pm 0,23$  mm). Resultados semelhantes foram relatados por Tomar (2023) para bebidas fermentadas durante o mesmo tempo (*S. aureus* =  $24,99 \pm 0,14$  mm; *S. enterica* =  $17,37 \pm 0,10$  mm; *E. coli* =  $20,53 \pm 0,11$  mm; e *L. monocytogenes* =  $14,68 \pm 0,12$  mm).

Já Vohra et al. (2019) analisaram o potencial antimicrobiano de diferentes amostras de kombucha após 60 dias de fermentação; seus resultados mostraram que, em todas as condições avaliadas, apenas a partir no 14<sup>o</sup> o crescimento dos patógenos foi inibido. Além disso, esse potencial aumentou durante todo o processo, atingindo efeito máximo após 60 dias de fermentação, período no qual todos os microrganismos avaliados (*E. coli*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*) foram inibidos. Resultados semelhantes foram obtidos por Mizuta et al. (2020); neste caso, na atividade antimicrobiana observada após 7 dias de fermentação, os valores de concentração inibitória e bactericida mínimas foram menores dos geralmente observados para estudos com chá fermentado por períodos maiores.

A neutralização das amostras até pH 7,0 suprimiu o efeito antimicrobiano tanto contra *S. aureus* quanto *S. enterica*, revelando que o potencial anteriormente verificado estava possivelmente relacionado ao conteúdo ácido da bebida. O teor de ácidos orgânicos, sobretudo do ácido acético, tem sido relacionado ao perfil inibitório da kombucha (Akarca, 2022; Vukmanović et al., 2022); no entanto, outras substâncias antimicrobianas, como as bacteriocinas, também têm sido consideradas (Içen et al., 2023). Em ensaios após fermentação de 7 dias, Vukmanović et al. (2022) verificaram que a neutralização do chá interrompe o efeito inibitório contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *Salmonella Typhimurium* e *E. coli*; ademais, este efeito foi diretamente correlacionado à concentração inicial de açúcar e temperatura de fermentação, que interferem na acidez final da bebida. Esses resultados corroboram aqueles demonstrados por Barbosa et al. (2022), no qual o ajuste do pH para 6,5 eliminou totalmente a

capacidade antimicrobiana frente às linhagens analisadas tanto em kombucha produzida com chá verde quanto com chá preto.

Ainda que a neutralização da bebida em geral reduza o potencial de inibição de patógenos, o conteúdo de ácidos orgânicos nem sempre é o principal responsável pela atividade antimicrobiana. De acordo com Al-Mohammadi et al. (2022), o ajuste de pH de amostras de kombucha com alta capacidade de inibir ou reduzir o crescimento de microrganismos resultou em diminuição significativa da atividade inibitória; entretanto, as amostras avaliadas ainda foram capazes de inibir patógenos como *S. aureus* e *E. coli*, cujo efeito foi relacionado principalmente à alta concentração de alcaloides responsáveis por danos na membrana celular microbiana, resultando em lise celular.

Após os ensaios de atividade inibitória e bactericida mínima, as amostras diluídas em diferentes concentrações (50 – 0,1%) não apresentaram efeito no crescimento dos patógenos analisados, assim como o CNF (0±0), sendo necessária a máxima concentração da bebida fermentada para o efeito inibitório. Para Motafeghi et al. (2023), diferentes concentrações da bebida mostram variações no potencial bioativo, como antimicrobiano, antioxidante e anticancerígeno. Este fenômeno pode ser explicado tendo em vista que soluções diluídas contêm concentrações menores dos compostos responsáveis pelas respectivas atividades; além disso, como já discutido, o tempo de fermentação não foi suficiente para produzir um conteúdo de metabólitos antimicrobianos que mantém efeito inibitório após sua neutralização e diluição.

Considerando-se os resultados obtidos após 7 dias de fermentação, bem como os demais descritos na literatura, um maior tempo de fermentação é recomendado para aumento da atividade antimicrobiana. Vale ressaltar, contudo, que fermentações mais prolongadas reduzem a atividade antioxidante da kombucha; assim, as condições de fermentação para tal finalidade devem respeitar os parâmetros ideais para a produção de bebidas com boa aceitação dentre os consumidores, cujas preferências podem variar consideravelmente.

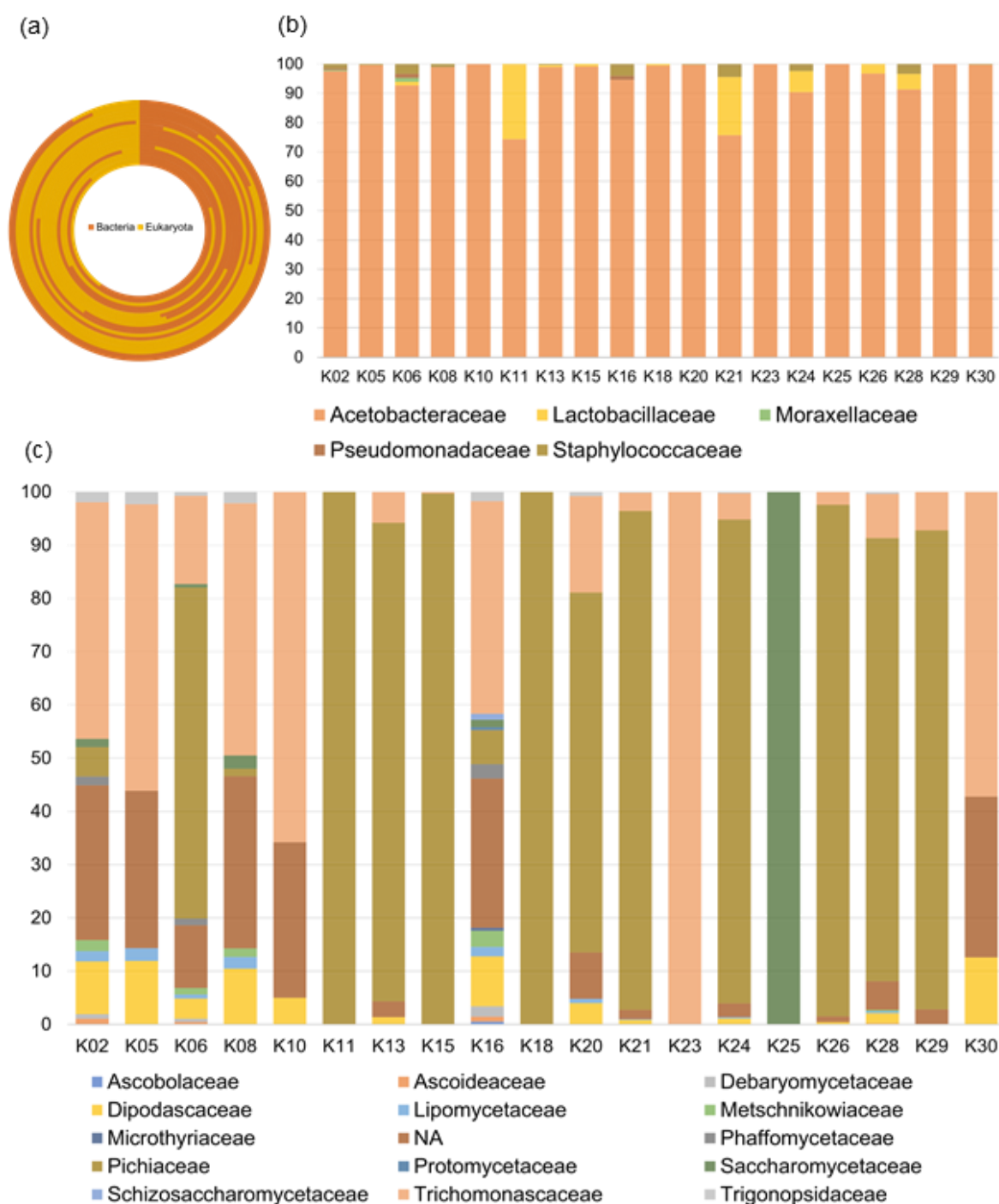
Destaca-se, ainda, que, apesar da extensa triagem de potencial antimicrobiano já revelado por diversos estudos, a compreensão acerca dos mecanismos moleculares e genéticos relacionados à biossíntese desses compostos ainda representa um gargalo a ser explorado. A resposta para essa questão, assim

como para o perfil bioativo de modo geral, pode ser melhor compreendida após um maior entendimento de como a composição microbiana e sua dinâmica no decorrer do processo fermentativo influenciam na qualidade e no potencial bioativo da kombucha

#### **5.4 Estrutura taxonômica e diversidade microbiana de kombucha brasileiras**

Dado os potenciais bioativos verificados anteriormente após o processo de fermentação, metagenômica tipo *Shotgun* foi utilizada para examinar o perfil da microbiota nas 19 comunidades de kombucha (fase líquida) após 7 dias (Figura 8). A análise dos metadados revelou diferenças na abundância total de bactérias e leveduras, assim como variações na composição destas comunidades. As sequências que compõem o total de *reads* (n: 62.223.438) corresponderam a 3 filos, 6 classes, 10 ordens, 19 famílias, 54 gêneros e 118 espécies. A diversidade microbiana geral foi superior à verificada em estudos anteriores (Pradhan et al., 2023; Kahraman-Ilikkan, 2023; Jafari et al., 2022; Yang et al., 2022; Yuan et al., 2022; Torán-Pereg et al., 2021). Os dados sugerem que a abordagem do tipo *Shotgun* pode fornecer um perfil de microbiota mais completo, com ampla resolução taxonômica e precisão na análise deste tipo de bebida.

Figura 8. Composição metagenômica de comunidades presentes na fase líquida em diferentes kombucha brasileiras.



(a) Perfil metagenômico a nível de reino. (b) Nível de família para bactérias. (c) Nível de família para leveduras. NA: Não Atribuído.

A abundância relativa de bactérias (60,60%) foi maior que a verificada para leveduras (39,40%). Pseudomonadota (Proteobacteria) (99,39%) foi o principal filo bacteriano encontrado, em acordo com os resultados demonstrados por Çelik Doğan

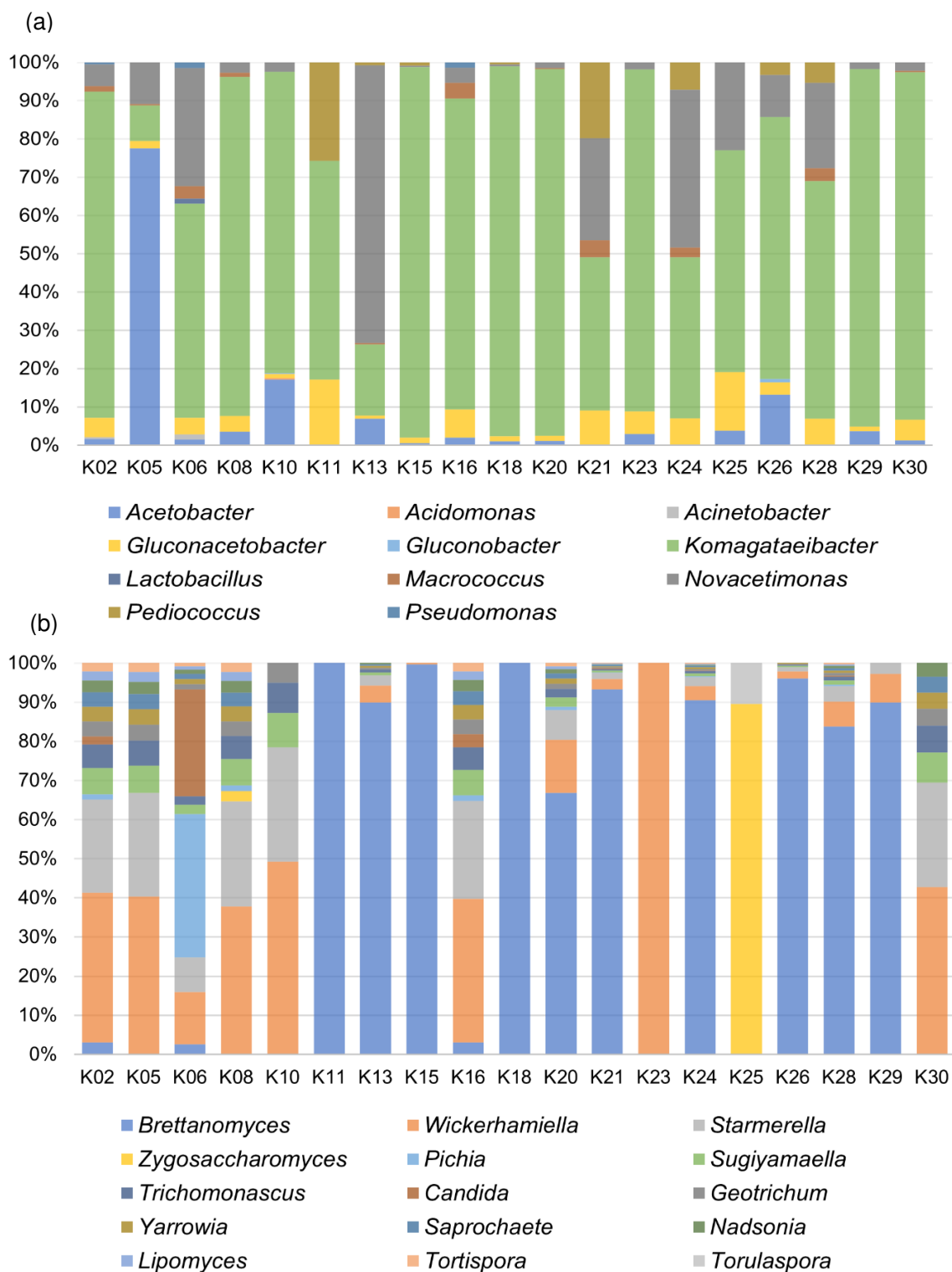
et al. (2023) e Yuan et al. (2022). As famílias Acetobacteraceae, Lactobacillaceae, Staphylococcaceae, Pseudomonadaceae e Moraxellaceae foram identificadas nas amostras, sendo Acetobacteraceae (99,32%) a dominante para o grupo de bactérias. No caso das leveduras, os táxons dominantes pertenciam às famílias Pichiaceae (82%) e Trichomonascaceae (8,23%), ambas correspondendo ao filo Ascomycota (100%).

Acetobacteraceae é tida como a família de bactérias geralmente dominante em diferentes estudos envolvendo kombuchas, apesar das variações no processo de fermentação. Villarreal-Soto et al. (2020), verificaram que tanto a fase líquida (chá fermentado) quanto para a fase sólida (SCOBY), cerca de 80% da comunidade foi composta por esse táxon após 15 dias de fermentação; Coton et al. (2017) observaram que kombuchas fermentadas a partir de chá preto ou verde apresentaram o mesmo perfil de dominância em ambas as fases a nível de família, apesar de variar a nível de espécie; já Kaashyap, Cohen e Mantri, (2021) observaram que mais de 99% da comunidade de kombucha era composta por Acetobacteraceae, mesmo quando da adição de 25% de chá *oolong*. Ainda que os parâmetros de produção possam variar, a constante presença e dominância de bactérias do ácido acético (BAA) cumpre um papel relevante para as características típicas da bebida, como a biossíntese de celulose e conteúdo ácido, mesmo que existam variações na dinâmica e interação entre os microrganismos que compõem uma cultura de kombucha (Li et al., 2022; Subbiahdoss, Osmen e Reimhult, 2022).

Os principais gêneros de bactérias observados nas kombuchas foram *Komagataeibacter* (79,56%), *Acetobacter* (12,37%), *Novacetimonas* (5,21%) e *Gluconacetobacter* (2,02%), correspondendo a até 99,17% dessa comunidade; estes resultados estão em consonâncias com os observados por Yuan et al. 2022. O perfil de leveduras demonstrou dominância de *Brettanomyces* (79,84%), ocorrendo, ainda, espécies de *Wickerhamiella* (6,19%), *Starmerella* (3,84%), *Zygosaccharomyces* (1,47%) e *Pichia* (1,18%), correspondendo a 92,54% das espécies detectadas (Figura 9). Os mesmos gêneros bacterianos foram os dominantes em amostras analisadas por Yao et al. (2023), enquanto que para leveduras, os gêneros em destaque *Saccharomyces*, *Brettanomyces* e *Pichia*. Os referidos autores analisaram a composição metagenômica da bebida após três e seis dias de fermentação. Apesar da complexidade da comunidade microbiana da kombucha, esses dados sugerem que

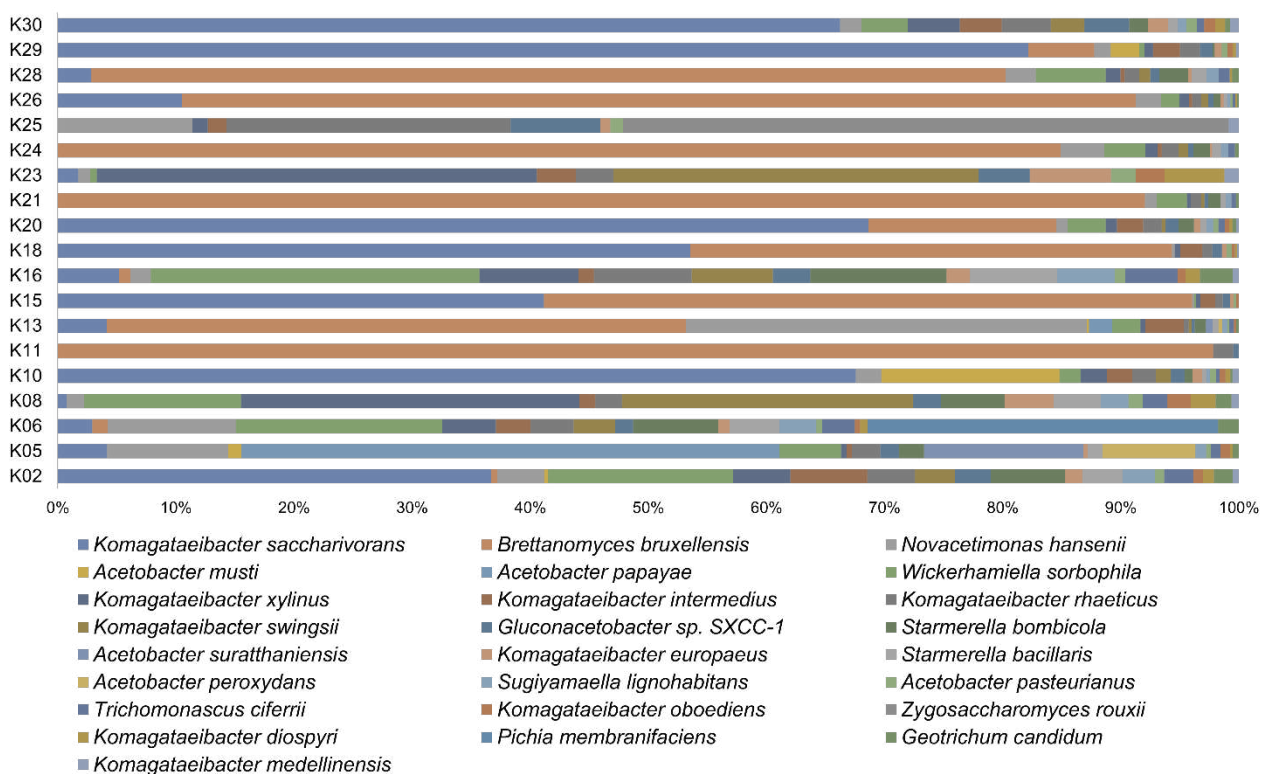
seu perfil microbiano é relativamente estável a nível de gênero, mesmo com alterações nos parâmetros de fermentação, cuja composição de predominância é observada desde os primeiros dias de fermentação do chá.

Figura 9. Distribuição dos principais gêneros de bactérias (a) e leveduras (b) em comunidades presentes na fase líquida de kombuchas brasileiras



As 25 espécies microbianas mais abundantes nas kombucha analisadas são mostradas na Figura 10. Dentre elas, destacam-se *Acetobacter musti*, *Acetobacter papayae*, *Komagataeibacter xylinus*, *Komagataeibacter intermedius*, *Komagataeibacter rhaeticus*, *Komagataeibacter swingsii*, *Novacetimonas hansenii*, *Wickerhamiella sorbophila*, *Komagataeibacter saccharivorans* e *Brettanomyces bruxellensis*; as duas últimas foram predominantes na maioria das amostras, correspondendo a 39,60 e 31,38%, respectivamente, para os metadados. Para as bactérias, *K. saccharivorans* representa 79,64% da comunidade, enquanto *B. bruxellensis* corresponde a 65,35% nas leveduras. Para Pradhan et al. (2023), Landis et al. (2022) e Villarreal-Soto et al. (2020), *Komagataeibacter* spp. e *B. bruxellensis* também foram os táxons majoritariamente dominantes, apesar das condições de fermentação terem sido distintas; nesse contexto, os resultados aqui apresentados indicam sua relevância para a tipicidade da bebida, bem como para sua qualidade, independentemente das variáveis de fermentação utilizadas.

Figura 10. Espécies mais abundantes na comunidade metagenômica de kombucha brasileiras após fermentação de 25 °C durante 7 dias.



A grande relevância desses microrganismos dominantes para o perfil da bebida fica evidente ao se comparar a microbiota de uma comunidade de kombucha exposta a condições de estresse extremos, semelhantes a Marte (atmosfera de 95,55% CO<sub>2</sub>, 2,70% N<sub>2</sub>, 1,60% Ar, 0,15% O<sub>2</sub>, ~370 ppm H<sub>2</sub>O, pressão de 980 Pa, e constantes variações de temperatura (-20 a 50 °C)), a um controle sob fermentação padrão; apesar da comunidade bacteriana reduzir drasticamente, de modo geral, a dominância (81 a 84%) de espécies de *Gluconacetobacter* sp., *Acetobacter* sp. e principalmente *Komagataeibacter* sp. foi significativamente superior mesmo nestas condições (Góes-Neto et al., 2021). Além disso, o genoma dessas cepas dominantes permaneceu inalterados (Lee et al., 2021), e sem mudanças relevantes no perfil metabólico (Santana de Carvalho et al., 2022) evidenciando que, mesmo em situações de alto estresse, a comunidade se mantém relativamente estável.

Apenas *K. rhaeticus* e *Gluconacetobacter* sp. SXCC-1 foram identificados em todas as amostras analisadas (100%; n = 19); nesse sentido, ambas poderiam caracterizar a microbiota *core* das kombuchas avaliadas. Além destas, *N. hansenii*, *K. xylinus* e *K. intermedius* foram identificados em 90% das amostras (n = 17), sugerindo-se uma função relevante para a comunidade fermentadora. A abundância de táxons em 103 amostras de culturas *starter* de diferentes origens utilizadas comercialmente para produção de kombucha foi analisada por Harrison e Curtin, (2021); estes autores verificaram a dominância dos gêneros *Komagataeibacter* (70,8%) *Acetobacter* (11,7%), *Gluconobacter* (3,5%) e *Lactobacillus* (3,5%); das espécies do gênero *Komagataeibacter*, 64% corresponderam a *K. rhaeticus*, em consonância com dados revelados neste estudo, bem como reforçando a hipótese de SCOBY terem comunidades microbianas relativamente conservadas, independentemente da origem.

Importante destacar que, apesar de *B. bruxellensis* não compor a microbiota *core* das amostras analisadas, a espécie foi observada em 68,42% das amostras (n = 13), sendo a terceira levedura mais prevalente, depois de *W. sorbophila* (84,21%, n = 16) e *Starmerella bombicola* (74,68%, n = 14). Além de *Komagataeibacter* (97%), Harrison e Curtin, (2021) verificaram, ainda, a prevalência de *Brettanomyces* em 99% das amostras.

A maioria das espécies dominantes encontradas neste estudo já foi extensivamente relatada na literatura; entretanto, *Komagataeibacter oboediens* é tida

como uma espécie pouco comum para comunidades de kombucha, apesar do gênero ser geralmente abundante. Essa espécie foi verificada anteriormente como dominante apenas por Kahraman-Ilikkan (2023), que analisou a fermentação artesanal de uma amostra obtida na Turquia, onde também foram evidenciadas outras espécies geralmente não convencionais, como *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Tetrapisispora* sp. Isso acontece, uma vez que, particularidades nos meios de produção ou condições de fermentação podem contribuir tanto para reduzir a abundância, quanto colaborar com crescimento de determinadas espécies (Landis et al., 2021).

Índices e estimadores da diversidade alfa foram calculados a partir dos metadados a nível de espécie (Tabela 7), e a partir dos grupos microbianos a nível de gênero para todas as amostras (Tabela 8 e Figura 11). Os dados demonstram que a estrutura da comunidade microbiana das kombuchas brasileiras é altamente variável, tendo amostras com diferentes perfis, além de apresentarem variações entre as comunidades de bactérias e leveduras. A heterogeneidade na composição da população e perfil de diversidade estão relacionados sobretudo à falta de padronização durante produções artesanais, que resultam na modulação de uma população característica, principalmente da microbiota menos abundante (Andreson et al., 2022; Noronha et al., 2022).

Tabela 7. Índices e estimadores de diversidade (alfa) a nível de gênero a partir dos dados para os diferentes grupos nas amostras de kombuchas brasileiras.

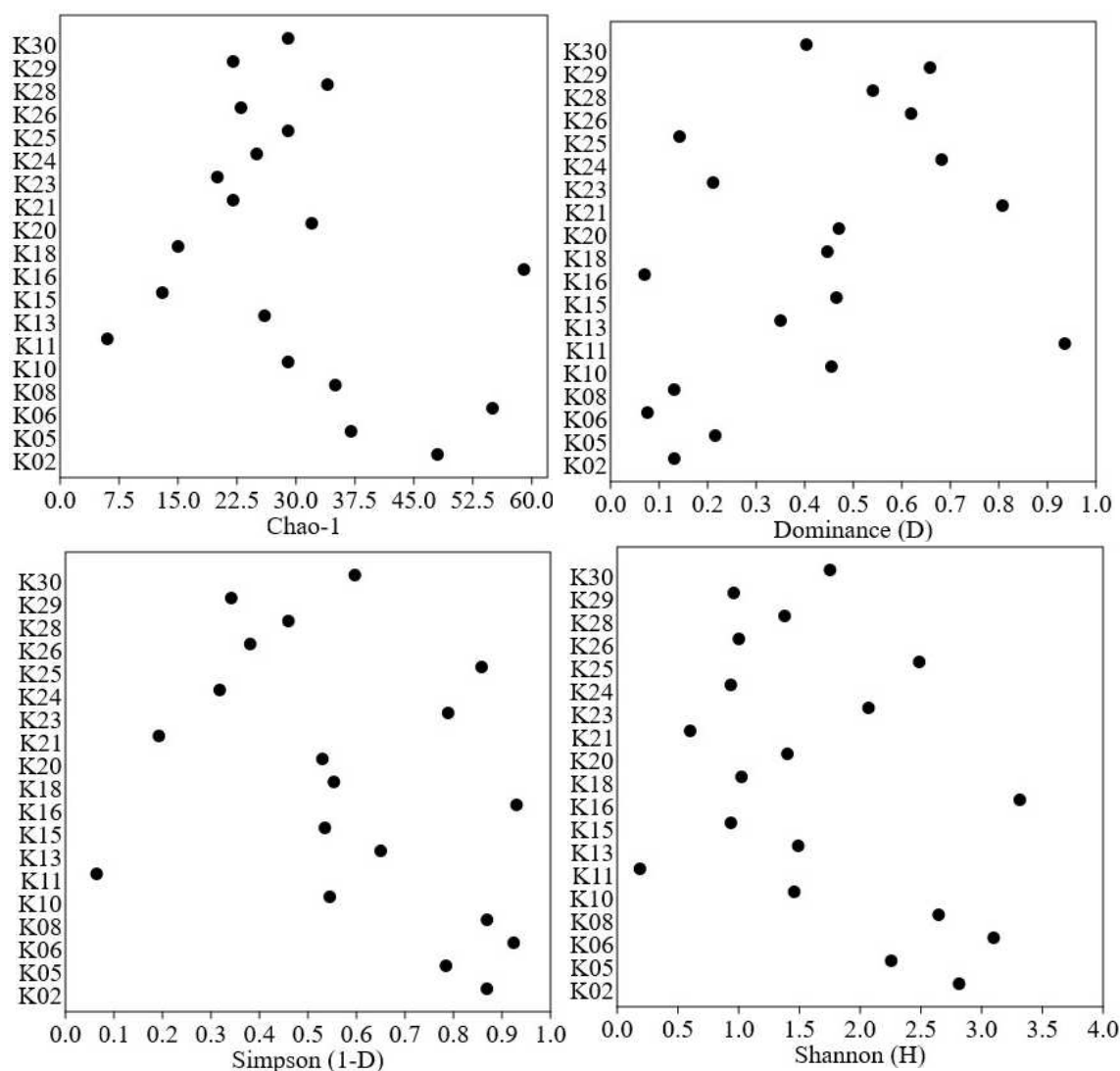
Amostra	Chao-1		Dominância (D)		Simpson (1-D)		Shannon (H')		Equitabilidade (J)	
	Bac	Lev	Bac	Lev	Bac	Lev	Bac	Lev	Bac	Lev
K02	7	25	0,7325	0,1676	0,2675	0,8324	0,6304	2,399	0,324	0,7452
K05	5	10	0,6223	0,2487	0,3777	0,7513	0,7552	1,751	0,4692	0,7602
K06	8	28	0,4122	0,2026	0,5878	0,7974	1,172	2,108	0,5637	0,6327
K08	5	16	0,7875	0,2039	0,2125	0,7961	0,5049	2,069	0,3137	0,7462
K10	6	5	0,6511	0,3442	0,3489	0,6558	0,6598	1,27	0,3683	0,7891
K11	3	1	0,4228	1	0,5772	0	0,9703	0	0,8832	-
K13	6	9	0,5658	0,8104	0,4342	0,1896	0,8283	0,4916	0,4623	0,2237
K15	5	2	0,9394	0,9939	0,06064	0,006083	0,1774	0,02072	0,1102	0,02989
K16	6	34	0,6689	0,1431	0,3311	0,8569	0,756	2,638	0,4219	0,748
K18	5	1	0,9357	1	0,06428	0	0,1864	0	0,1158	-
K20	5	12	0,9191	0,4726	0,08089	0,5274	0,2252	1,244	0,1399	0,5007
K21	5	14	0,2803	0,8689	0,7197	0,1311	1,397	0,386	0,8679	0,1463
K23	4	1	0,8045	1	0,1955	0	0,441	0	0,3181	-
K24	5	14	0,3583	0,8177	0,6417	0,1823	1,196	0,5077	0,7429	0,1924
K25	4	10	0,4133	0,5739	0,5867	0,4261	1,066	1,035	0,7687	0,4496
K26	6	7	0,5007	0,9238	0,4993	0,07624	1,03	0,2205	0,5751	0,1133

Continua

										Conclusão
K28	5	20	0,4439	0,6849	0,5561	0,3151	1,086	0,8514	0,6747	0,2842
K29	4	3	0,8757	0,8154	0,1243	0,1846	0,3043	0,3853	0,2195	0,3507
K30	5	8	0,8286	0,2712	0,1714	0,7288	0,4019	1,611	0,2497	0,7747

De modo geral, quando a comunidade de leveduras a nível de gênero é mais diversa que a de bactérias, a diversidade pode ser até 5 vezes maior, o que é evidenciado tanto pelo índice de Shannon ( $H'$ ), com valores de até 2,63 (K16), quanto pelos estimadores de equitabilidade e riqueza, valores semelhantes aos verificados por Yuan et al. (2022). Entretanto, em comunidades como as observadas em K11, K18 e K23, os índices apresentaram baixos valores para leveduras, com apenas um gênero em sua composição (*Brettanomyces* sp. para K11 e K18, e *Wickerhamiella* sp. para K23). Cabe ressaltar que o efeito negativo de espécies dominantes de leveduras sobre a diversidade foi relatado anteriormente por Yang et al. (2022). Importante destacar, ainda, que a despeito da microbiota da amostra K11 apresentar apenas o gênero *Brettanomyces*, três espécies distintas foram observadas (*B. bruxellensis*, *Brettanomyces naardenensis* e *Brettanomyces nanus*); esses dados reforçam a relevância deste táxon para a comunidade microbiana de kombuchas brasileiras.

Figura 11. Índices e estimadores de diversidade (alfa) a nível de gênero a partir dos dados para os diferentes grupos nas amostras de kombuchas brasileiras.



Em relação às bactérias, a maior diversidade foi verificada para as amostras K21, K24 e K06, com índices  $H'$  de 1,39, 1,19 e 1,17 respectivamente; e em K21 e K24, com índice de Simpson (1-D) de 0,71 e 0,64, respectivamente. Estes valores podem ser explicados devido aos diferentes pesos que cada índice confere a espécies raras em relação àquelas mais abundantes (Melo, 2008). De qualquer maneira, estes valores são semelhantes aos observados por Kaashyap, Cohen e Mantri, (2021), a nível de espécie ( $H'$ : 1,38). As comunidades mais diversas de leveduras foram K02 ( $H'$ : 2,39, 1-D: 0,83) e K16 ( $H'$ : 2,63, 1-D: 0,85), com destaque para a riqueza de 34 gêneros diferentes nesta última amostra.

Geralmente, as leveduras apresentaram maior número de táxons distintos em comparação com populações mais homogêneas de bactérias. A maior riqueza de

gêneros bacterianos ocorreu em K06 (n: 8). Mesmo que o número de táxons seja um ponto importante para a diversidade em uma comunidade, não define todos os índices de diversidade, uma vez que, a abundância desses táxons é tão relevante quanto (Andreson et al., 2022); no presente estudo, são verificados apenas 11 gêneros de bactérias, ainda assim, a diversidade desde grupo neste nível taxonômico é, em algumas comunidades, superior a diversidade de leveduras, que possuem alta riqueza de gêneros (n: 43) distribuídos entre as diferentes comunidades.

As análises dos dados metagenômicos mostraram que a nível de espécie, a maior diversidade microbiana ocorreu nas amostras K02, K05, K08, K23, K25, e sobretudo em K06 e K16, segundo os índices de H' e 1-D, tanto para bactérias quanto leveduras. Tais comunidades também estiveram entre aquelas com maior número de espécies distintas em sua composição e de maior equitabilidade; além disso, tenderam a apresentar uma menor dominância de um ou mais táxons. Mesmo que determinado gênero seja dominante, a presença de várias espécies pode garantir uma maior diversidade; segundo Kaashyap, Cohen e Mantri, 2021, apesar de *Acetobacter* sp. corresponder ao gênero como maior número de indivíduos, a ocorrência de 14 espécies lhe garantiu alta diversidade no estudo.

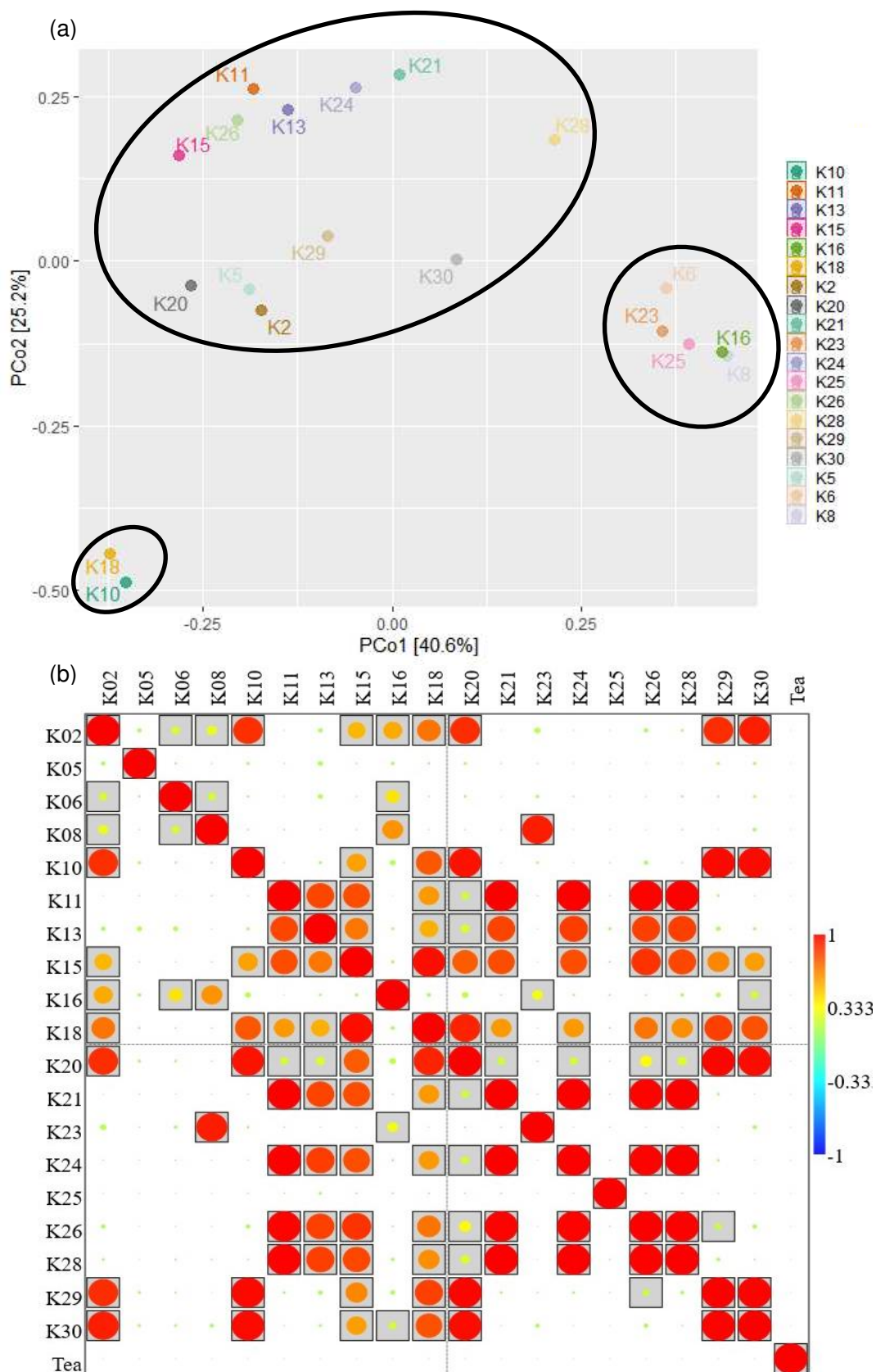
Uma menor diversidade foi verificada nas amostras K15, K24, K29, principalmente em K21 e K11. Estas também apresentam a menor equitabilidade e a maior dominância. Em ambas as amostras (K21 e K11), as espécies dominantes foram *K. rhaeticus* e *B. bruxellensis*. Além da já discutida dominância, outros fatores, como condições empregadas no processo fermentativo podem reduzir significativamente a diversidade; estes fatores não só interferem na composição geral da comunidade como também na sucessão e dinâmica entre as espécies microbianas; por serem estirpes dominantes altamente adaptadas, suprimem o desenvolvimento de outras pelo esgotamento de recursos e geração de compostos tóxicos (Çelik Doğan et al., 2023). Segundo Arıkan et al. (2020), as variações entre as diferentes comunidades também podem estar relacionadas à rapidez com que o consumo de nutrientes e a biossíntese de compostos ocorre.

Tabela 8. Índices e estimadores de diversidade (alfa) a nível de espécie a partir dos dados do metagenoma (bactérias e leveduras) das diferentes amostras de kombuchas brasileiras.

Amostra	Chao- 1	Dominância (D)	Simpson (1-D)	Shannon (H')	Equitabilidade (J)
K02	48	0,1311	0,8689	2,814	0,7269
K05	37	0,2155	0,7845	2,255	0,6246
K06	55	0,07597	0,924	3,099	0,7733
K08	35	0,1309	0,8691	2,646	0,7442
K10	29	0,4551	0,5449	1,457	0,4327
K11	6	0,9358	0,06417	0,1869	0,1043
K13	26	0,3501	0,6499	1,49	0,4572
K15	13	0,4652	0,5348	0,9359	0,3649
K16	59	0,06992	0,9301	3,314	0,8127
K18	15	0,4466	0,5534	1,023	0,3777
K20	32	0,4703	0,5297	1,401	0,4043
K21	22	0,8075	0,1925	0,6003	0,1942
K23	20	0,211	0,789	2,069	0,6905
K24	25	0,6819	0,3181	0,9354	0,2906
K25	29	0,142	0,858	2,486	0,7383
K26	23	0,6191	0,3809	1,001	0,3193
K28	34	0,5405	0,4595	1,378	0,3908
K29	22	0,6582	0,3418	0,9589	0,3102
K30	29	0,4033	0,5967	1,751	0,5201

A partir dos metadados, foi possível correlacionar e agrupar as diferentes amostras em três grupos principais, considerando-se a distribuição e abundância das espécies (Figura 12). As amostras K06, K08, K16, K23 e K25 foram agrupadas, correspondendo às comunidades com alta diversidade e distribuição de espécies; por outro lado, as amostras K10 e K18 agrupadas correspondem ao grupo com maior número de indivíduos, predominantemente *K. saccharivorans*. As demais amostras formaram um outro agrupamento, menos próximo entre si quando comparado aos dois primeiros grupos.

Figura 12. Agrupamento e correlação entre as diferentes amostras baseada no perfil de distribuição metagenômica das comunidades.



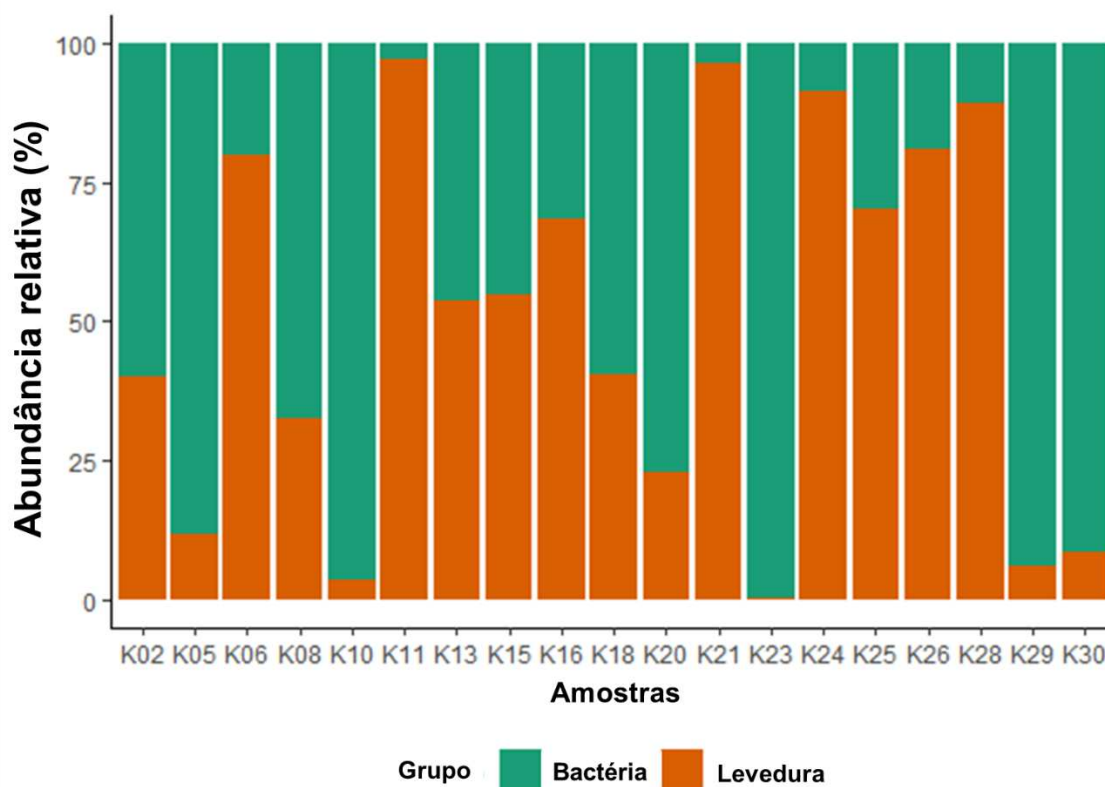
Nesse contexto, compreender o papel da origem do SCOBY no perfil de distribuição taxonômica e diversidade microbiana, além do potencial bioativo, podem revelar o quão diverso é o mercado brasileiro de kombucha, bem como evidenciar pontos para atualizações e/ou reformulações da regulamentação vigente no Brasil. Compreender a dinâmica dessas comunidades, assim como seu papel na produção de compostos de interesse, poderá trazer insights relevantes para se modular e se definirem critérios para uma cultura de qualidade.

### **5.5 Efeito da proporção entre bactérias e leveduras no perfil bioativo**

A distribuição das comunidades de bactérias e leveduras é mostrada na Figura 13 para cada uma das amostras. Baseado na distribuição dos grupos microbianos, as amostras foram classificadas em três grandes grupos: i) o primeiro (> 31%, n = 6), de maior equilíbrio dentre os grupos microbianos, compreendido por K13, K15, K20, K08, K18 e K02; o segundo (> 26%, n: 5), com dominância de bactérias, compreendido por K10, K23, K29, K30 e K05; e, por fim, o terceiro, com prevalência de leveduras (> 42%, n: 8), compreendido por K11, K21, K24, K28, K06, K26, K16 e K25 (Figura 14). Apesar de bactérias serem consideradas as mais abundantes em kombucha (Landis et al., 2022; Pradhan et al., 2023), diversos estudos têm demonstrado que essa proporção pode variar, com amostras sendo compostas predominantemente por leveduras, sobretudo na fração líquida da bebida (Kaashyap, Cohen e Mantri, 2021; Kahraman-Ilkkan, 2023; Yao et al., 2023).

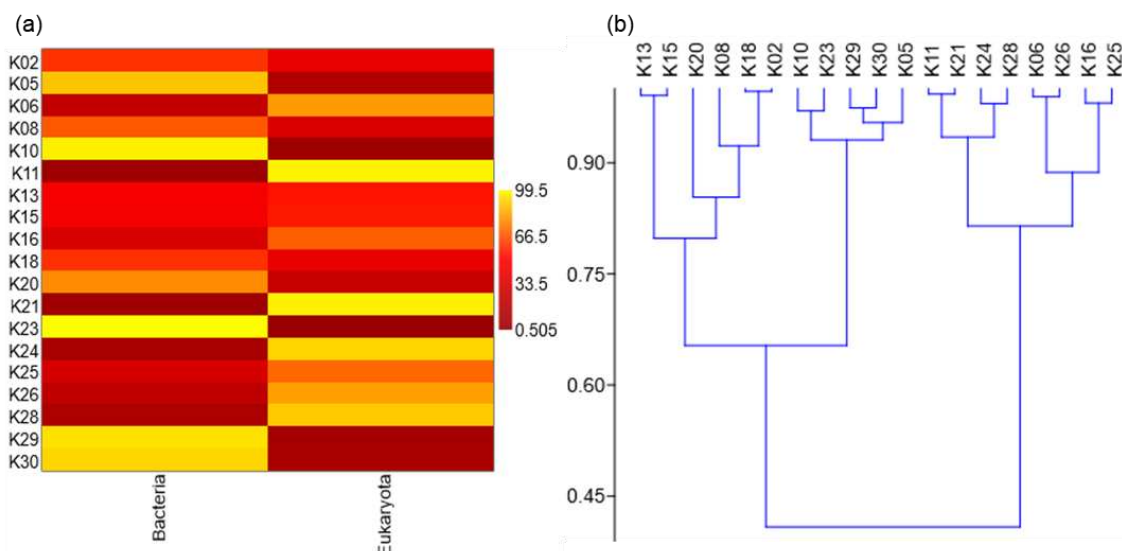
Comunidades compostas majoritariamente por leveduras podem conter maior teor alcoólico, uma vez que, esse grupo são consideradas os principais produtores de etanol na fermentação da kombucha (Antolak, Piechota e Kucharska, 2021). Por outro lado, uma composição dominante em bactérias pode produzir uma bebida mais ácida, sobretudo com altos teores de ácido acético (Neffe-Skocinska et al., 2017). Vale destacar que, espécies como *B. bruxellensis* são excelentes produtoras de ácido acético em condições aeróbias, e, portanto, podem modificar esse perfil da bebida (Villarreal-Soto et al. 2018). Além disso, quando na população de leveduras no inóculo estão presentes espécies com alta atividade invertásica, o conteúdo de compostos fenólicos é alto, e contribui diretamente com atividades antioxidantes devido a maior disponibilidade de açúcares fermentáveis (Jafari et al., 2020).

Figura 13. Distribuição de bactérias e leveduras em kombuchas brasileiras após fermentação a 25 °C por 7 dias.



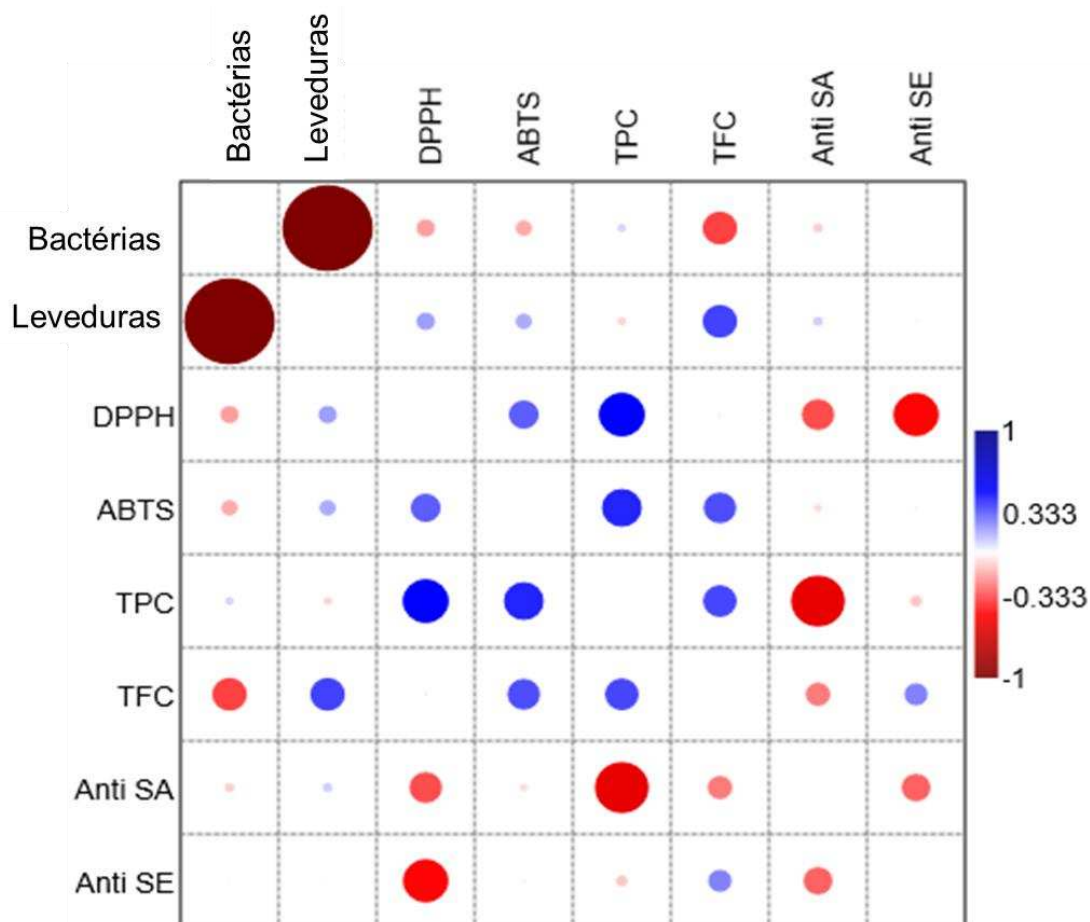
Nesse contexto, o papel das populações de bactérias e leveduras são distintos durante a fermentação da kombucha (Villarreal-Soto et al. 2020); assim, além da composição de espécies, a distribuição e sucessão entre esses grupos pode influenciar nas características bioativas das bebidas. Durante a fermentação, a invertase periplasmática das leveduras presentes catalisam a hidrólise enzimática da sacarose, resultando nos monossacarídeos glicose e frutose, além do etanol produzido na fermentação alcoólica (Villarreal-Soto et al. 2018), logo após, a microbiota acética oxida a glicose principalmente em ácido acético e glicônico e converte a frutose e o etanol em ácido acético como resultado do metabolismo oxidativo; além de produzirem a película celulósica para formação de um novo SCOBY (Lynch et al., 2019; Tran et al. 2020).

Figura 14. Abundância relativa (%) (a) e agrupamento (b) das amostras de kombucha baseado na distribuição de bactérias e leveduras na comunidade microbiana.



Foi observada uma correlação positiva entre a predominância de leveduras e o perfil de atividade antioxidante e teor de flavonoides totais nas kombucha produzidas; não foram verificadas associações entre a abundância de um grupo específico e o teor de fenólicos e/ou atividade antimicrobiana (Figura 15). Além disso, foi observada uma alta correlação negativa entre a predominância de leveduras e de bactérias. Os diferentes perfis metabólicos na complexa composição espécies de leveduras na comunidade microbiana da kombucha podem estar relacionados à baixa correlação a nível de reino, uma vez que a abundância de leveduras não indica, necessariamente, a presença de espécies responsáveis e/ou associadas à produção de compostos bioativos; ademais, mesmo que em abundâncias baixas, espécies de bactérias podem desempenhar papéis essenciais na fermentação (Tran et al., 2020).

Figura 15. Correlação entre o perfil bioativo e proporção de bactérias e leveduras na comunidade microbiana de kombucha



DPPH: Redução do radical 1-difenil 2-picrilhidrazil. ABTS: Redução do radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico. TPC: Teor de compostos fenólicos totais. TFC: Teor de flavonoides totais. Anti SA: Atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*. Anti SE: Atividade antimicrobiano frente a *Salmonella enterica*.

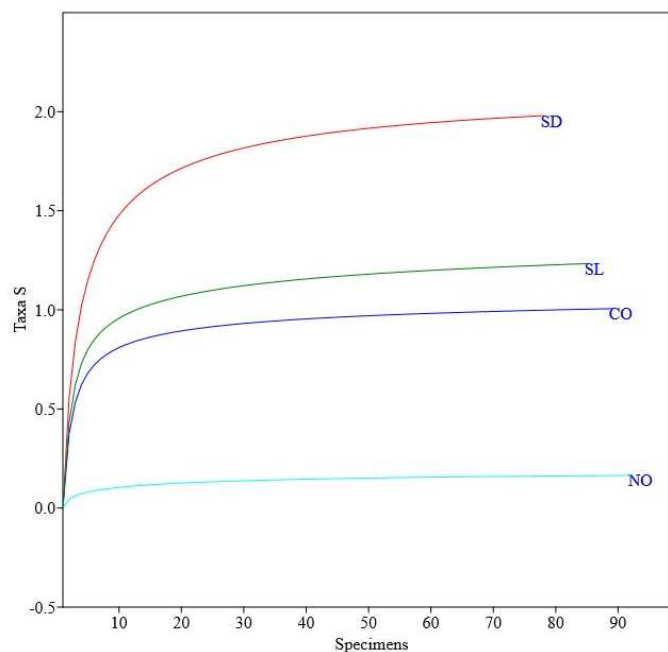
É correto supor, portanto, que apesar da relação entre a abundância relativa de bactérias e leveduras e, conseqüentemente, sua proporção, e o potencial de atividade biológica, outros fatores podem cumprir um papel relevante, a exemplo da composição da comunidade a nível de espécie. Assim, faz-se necessário avaliar o papel dos diferentes grupos microbianos da microbiota da kombucha, a fim de se elucidar seu verdadeiro papel na biossíntese de compostos bioativos de interesse.

## 5.6 Influência da origem do SCOBY na diversidade microbiana de kombucha brasileiras

O Brasil foi o primeiro país a regulamentar a produção e identidade de kombucha, fenômeno que acompanhou a popularização da bebida nos últimos anos em território nacional (MAPA, 2019; Batista et al., 2022). Vale destacar, ainda, que o Brasil é um dos maiores países do mundo em termos de extensão territorial, de significativa variedade climática a depender da região (IBGE, 2010); nesse sentido, faz-se necessário avaliar como essa heterogeneidade de condições pode influenciar nas características das bebidas aqui produzidas e comercializadas.

A Figura 17 mostra o perfil metagenômico das espécies que compõem a comunidade das kombuchas obtidas de matérias-primas das diferentes regiões brasileiras. Foram selecionadas amostras de comunidades de quatro regiões do país (Centro-oeste: 5; Nordeste: 1; Sul: 5; e Sudeste: 8). Apesar do n amostral não ser igual entre todas as regiões, a curva de rarefação (Figura 16) demonstrou que o esforço amostral foi suficiente para inferir aspectos em todos os grupos. As comunidades possuem diferentes perfis mesmo entre amostras de uma mesma região. A maior diversidade de espécies foi verificada da região Sudeste (SD), seguida pela região Sul (SL), Centro-oeste (CO) e Nordeste (NO). No entanto, ao se considerar o número de amostras para cada região, a ordem média de riqueza é modificada, com o maior número de espécie seguindo o padrão  $NO > SL > CO > SD$ . Mesmo no limite regional, diversos fatores ambientais podem variar entre os Estados, como domínios e subdomínios climáticos, além da sazonalidade de temperatura e umidade relativa do ar (Novais e Machado, 2023; Cavalcanti, 2016). Estes resultados reforçam a heterogeneidade das populações para cada grupo de estados brasileiros.

Figura 16. Curva de rarefação do esforço amostral para cada região do Brasil.



SD: Região Sudeste. CO: Região Centro-oeste. SL: Região Sul. NO: Região Nordeste

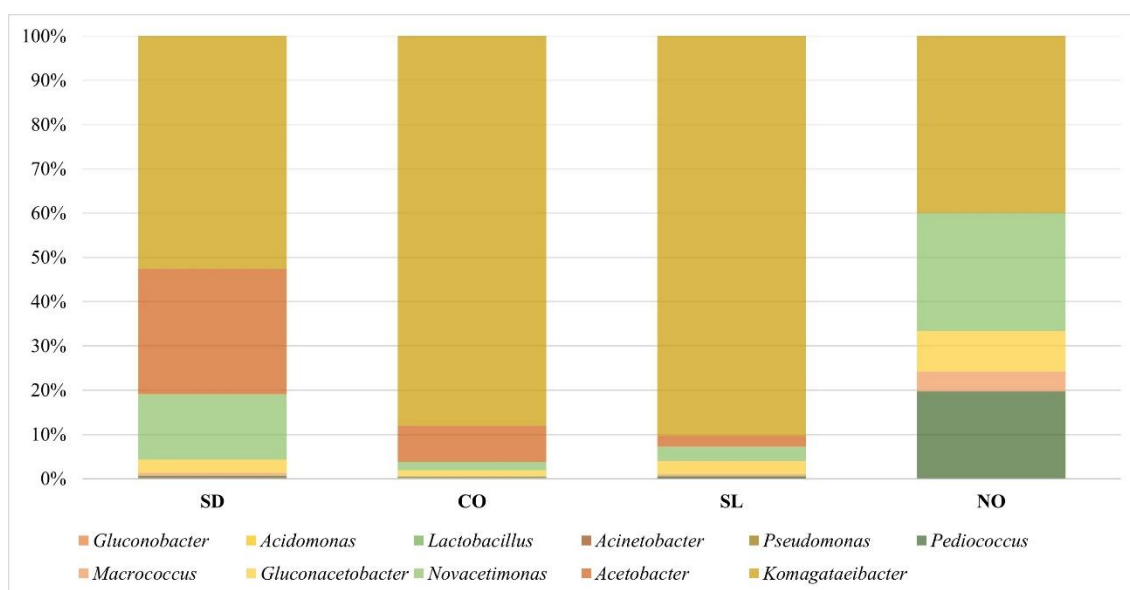
Bactérias compõem a maior parte da microbiota das amostras de todas as regiões avaliadas: SD (53,24%), CO (69,40%), SL (52,12%); exceto NO, cujas amostras apresentaram > 95% de leveduras. Para todas as regiões, o filo predominante foi Pseudomonadota (Proteobacteria). De acordo com Suhre et al. (2021), que analisaram 6 amostras de kombucha produzidas e comercializadas no Brasil, estas revelaram, além de Pseudomonadota, o filo Bacillota (Firmicutes) como o mais abundante nas amostras analisadas (69-99%). No presente estudo, apesar de ocorrer em >75% (n: 15) das amostras, a abundância relativa de Bacillota é menor que 1% no total.

Lactobacillaceae, Staphylococcaceae e Acetobacteraceae foram comuns para as amostras de todas as regiões; estas famílias foram dominantes em apenas 1 das 6 amostras de kombuchas brasileiras avaliada por Suhre et al. (2021), provenientes da região Sul do país. A nível de gênero, *Komagataeibacter* sp. foi dominante em todas as comunidades, entre 90 e 40% na SL e NO, respectivamente; apesar dos demais principais gêneros diferirem entre as amostras. De acordo com Barbosa et al. (2021), que analisaram kombuchas da região Sudeste, a abundância de bactérias foi, em geral, maior que a de leveduras, de acordo com o observado neste estudo; *Komagataeibacter* sp. foi o gênero bacteriano dominante no decorrer de 15

dias de fermentação, com destaque para *K. hansenii* (41,2%), *K. europaeus* (23,5%) e *K. xylinus* (14,7%), demonstrando seu relevante papel na fermentação do chá.

A abundância relativa da microbiota de kombuchas, a nível de gênero é mostrada na Figura 17. Para amostras da região SD e CO, os gêneros mais abundantes foram *Acetobacter* sp. e *Novacetimonas* sp.; no SL e NO, o segundo gênero de maior ocorrência foi *Novacetimonas* sp.; contudo, *Gluconacetobacter* sp. e *Pediococcus* sp. ocorreram como terceiro táxon mais abundante em amostras produzidas nestas regiões. *Komagataeibacter* sp., *Gluconobacter* sp., *Liquorilactobacillus* sp. e *Oenococcus* sp. foram os principais gêneros bacterianos revelados por Suhre et al. (2021).

Figura 17. Distribuição dos principais gêneros de bactérias na microbiota de kombuchas brasileiras.



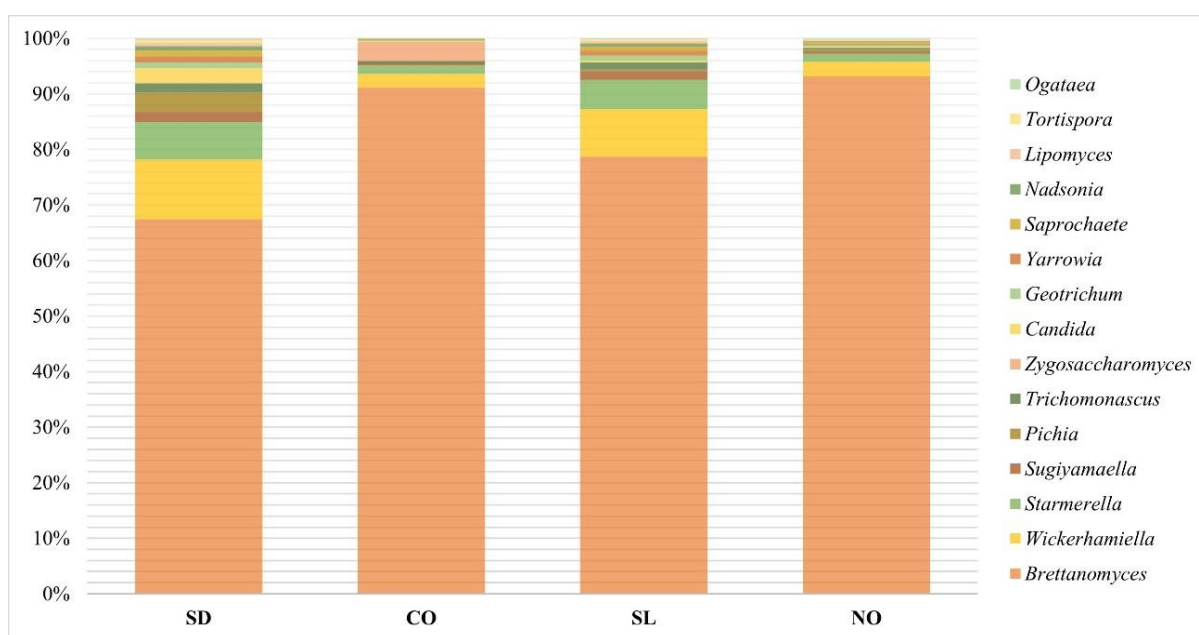
SD: Região Sudeste. CO: Região Centro-oeste. SL: Região Sul. NO: Região Nordeste

Pichiaceae foi a principal família de leveduras nas amostras de todas as regiões, com dominância entre 71,61 a 93,68% no SD e NO, respectivamente. A família Trichomonascaceae foi a segunda mais abundante nas comunidades. Segundo Linder (2019), Pichiaceae e Trichomonascaceae fazem parte de um grupo restrito de leveduras que possuem a via completa de assimilação de nitrato, o que pode favorecer seu crescimento mesmo em condições de depleção de nutrientes. Nas regiões CO e NO, *Brettanomyces* sp. compôs > 90% da população, enquanto que no SD e SL, apesar de ser o táxon mais abundante, este representou menos de 80%

dos gêneros verificados (Figura 18). Segundo Noronha et al. (2022), em trabalho realizado com amostras do Sul do Brasil, a abundância de leveduras comuns tendeu a permanecer constante durante todo o processo de fermentação, enquanto que BAA apresentaram tendência à redução a depender da disponibilidade de oxigênio e nutrientes. Por outro lado, não foi observada diferença estatística nas contagens de ambos os grupos em amostras da referida região brasileira (Cardoso et al., 2020). Esse perfil é importante para o equilíbrio na produção de ácidos orgânicos, que em altas concentrações influenciam negativamente na qualidade do produto, sobretudo no *flavor*.

Em amostras do SD, CO e NO, *Wickerhamiella* sp. e *Starmerella* sp. foram mais abundantes; o SL difere em apresentar *Zygosaccharomyces* sp. entre os três principais táxons. Altas abundâncias de *Zygosaccharomyces* têm sido identificadas em kombuchas brasileiras, bem como *Rhodotorula* sp. e *Saccharomyces* sp. (Barbosa et al., 2021). Tais gêneros compõem a microbiota relevante para a fermentação da kombucha; assim, cumprem um papel relevante não apenas durante a hidrólise inicial de açúcares, mas também durante todo o processo produtivo.

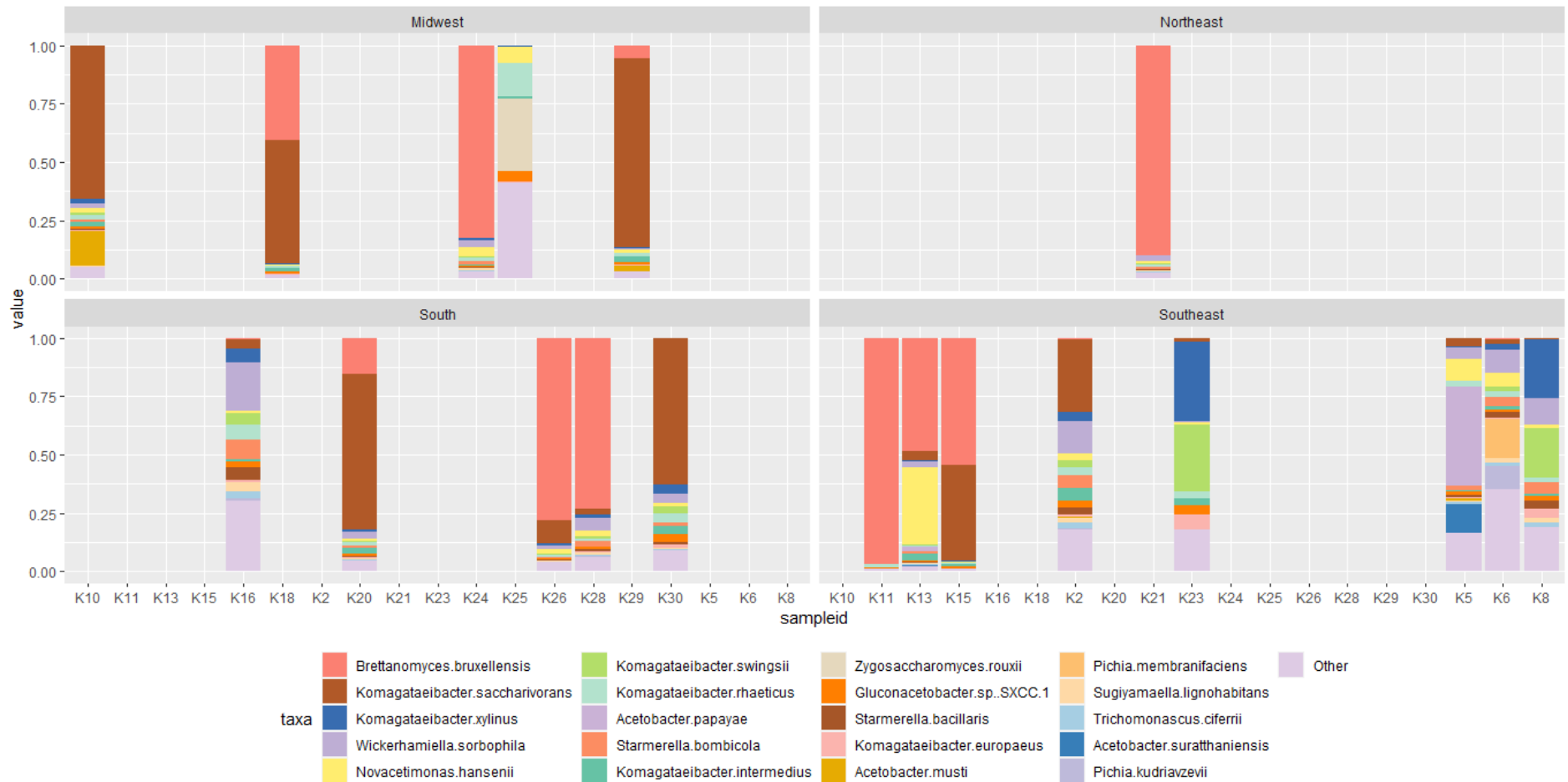
Figura 18. Distribuição dos principais gêneros de leveduras na microbiota kombuchas brasileiras.



SD: Região Sudeste. CO: Região Centro-oeste. SL: Região Sul. NO: Região Nordeste.

Em termos de abundancia relativa de espécies, as regiões CO e SL possuem maior similaridade entre si, é mostrado na Figura 19. Ambos os grupos apresentaram dominância de *K. saccharivorans* e *B. bruxellensis*, com 54.42% e 27.56% para o CO e 38.66% e 36.93% para o SL, respectivamente. No SD, essas duas espécies também predominaram, com índices de 30,45% para *B. bruxellensis* e 14,72% para *K. saccharivorans*. Apesar da abundância de *B. bruxellensis* ter sido semelhante nas regiões SL, CO e SD, nesta última o perfil de BAA também foi dominado por *Acetobacter papayae* (9.06%) e *Novacetimonas hansenii* (7.79%).

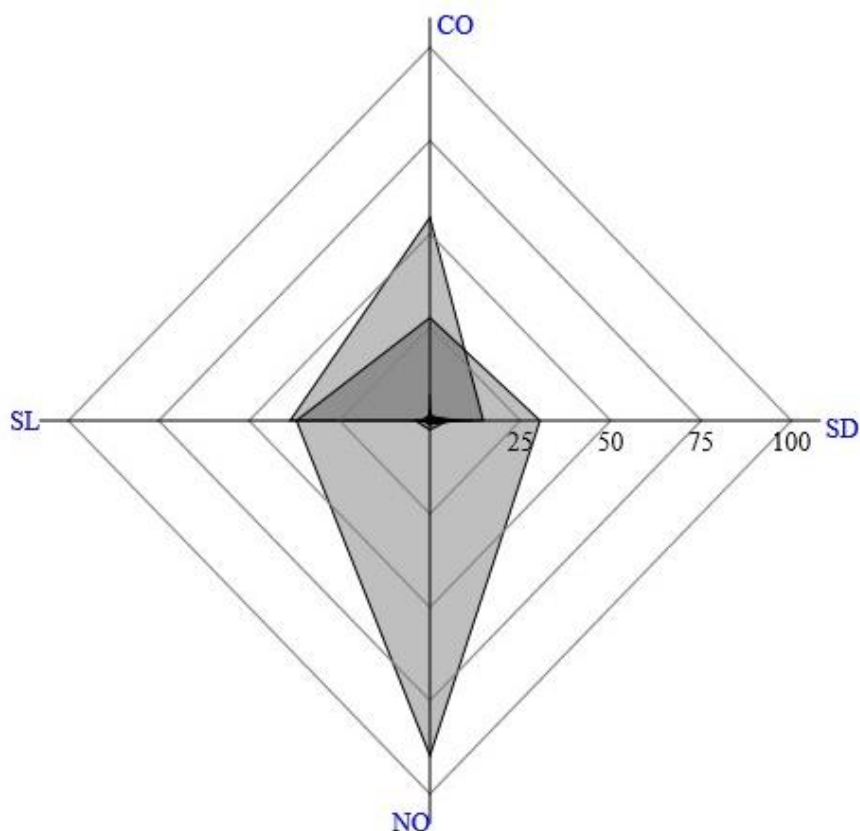
Figura 19. Distribuição das principais espécies de bactérias e leveduras em comunidades presentes na fase líquida de kombucha com origem em diferentes regiões do Brasil



Apesar da microbiota de kombuchas brasileiras ser composta por espécies similares para todas as amostras, a divergência de riqueza e abundância deve desempenhar importantes papéis durante a fermentação, apesar de não serem criticamente indispensáveis para que o processo ocorra. Suhre et al. (2021), também destacou diferenças significativas entre suas seis amostras de kombucha comerciais, que foram agrupadas em três grupos, o primeiro, dominado por *Oenococcus oeni* (44 - 99%), *Liquorilactobacillus ghanensis* (25%) e *Pantoea stewartii* (16%); o segundo, predominantemente continha *K. rhaeticus* (44,7%), *G. oxidans* (22,9%), *K. saccharivorans* (11,9%) e *Acetobacter peroxidans* (11,7%), e o terceiro grupo, composto por *Liquorilactobacillus nagelii* (40-92%), *L. ghanensis*, (21,5%), *K. rhaeticus* (11%) e *K. saccharivorans* (10%); em cada um destes grupos, ocorreram tanto espécies abundantemente encontradas no presente estudo, como *K. saccharivorans*, quanto espécies não identificadas previamente, como as predominantes do primeiro grupo.

A região NO possui alta dominância de espécies (Figura 20), dentre elas, as três mais abundantes são leveduras: *B. bruxellensis* (89,7%), *Wickerhamiella sorbophila* (2,4%) e *S. bombicola* (1,0%); *K. saccharivorans* não foi detectada. Nessa comunidade, *N. hansenii*, *K. rhaeticus* e *Pediococcus pentosaceus* foram as bactérias mais abundantes, que juntas, representam menos de 3% da composição da comunidade.

Figura 20. Distribuição da abundância relativa de espécies para amostras de kombucha de cada região.

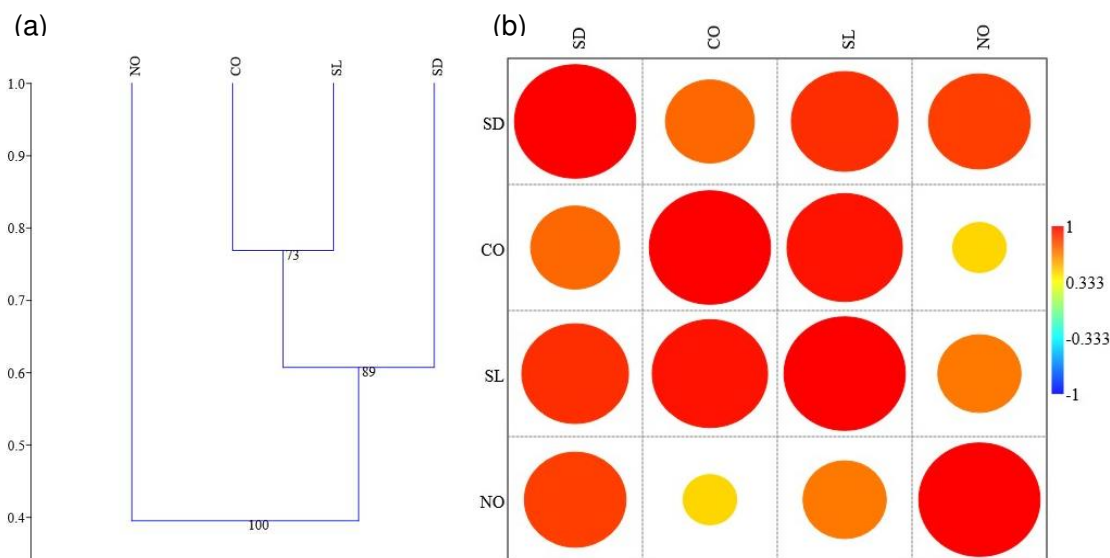


SD: Região Sudeste. CO: Região Centro-oeste. SL: Região Sul. NO: Região Nordeste

Uma alta riqueza de BAA foi verificada na região CO, onde, nas 15 espécies mais abundantes, estão incluídas principalmente espécies do gênero *Komagataeibacter* sp., como *K. intermedius*, *K. rhaeticus*, *K. xylinus*, *Komagataeibacter europaeus* e *Komagataeibacter swingsii*; de *Acetobacter musti* e *Acetobacter pasteurianus*; ainda *N. hansenii* e *Gluconacetobacter* sp. SXCC-1. A ocorrência frequente de *Komagataeibacter* spp. tem sido discutida em diversos estudos; este gênero têm sido relacionado a diferentes funções durante a fermentação de kombucha, como a biossíntese de ácidos orgânicos que conferem características típicas da bebida, elevada taxa de consumo do açúcar disponível e/ou formação do biofilme celulósico (Semjonovs et al., 2017; Gullo et al., 2019; La China et al., 2021; Gupte et al., 2021; Landis et al., 2022). Além disso, como já destacado, apresentam um genoma estável em diferentes condições ambientais (Santana de Carvalho et al., 2022), características que conferem vantagens seletivas ao táxon.

Baseado na similaridade da distribuição de espécies que compõem as diferentes comunidades avaliadas, uma correlação pôde ser observada dentre as regiões avaliadas, bem como um provável agrupamento (Figura 21).

Figura 21. Agrupamento (a) e correlação (b) entre as diferentes regiões do Brasil baseada no perfil de distribuição metagenômica das comunidades.



(a) Dendrograma de similaridade entre as amostras. (b) Correlação de Pearson. SD: Região Sudeste. CO: Região Centro-oeste. SL: Região Sul. NO: Região Nordeste

Espécies comuns às amostras de todas as regiões podem ser consideradas como microbiota *core*, com destaque para *B. bruxellensis*, *Candida boidinii*, *Geotrichum candidum*, *Lipomyces starkeyi*, *Nadsonia fulvescens*, *Ogataea polymorpha*, *Saprochaete ingens*, *Pichia kudriavzevii*, *Starmerella bacillaris*, *S. bombicola*, *Sugiyamaella lignohabitans*, *Tortispora caseinolytica*, *Trichomonascus ciferrii*, *W. sorbophila* e *Yarrowia lipolytica*. Dentre as bactérias, destaque para *Gluconacetobacter* sp., *K. rhaeticus*, *Komagataeibacter swingsii*, *K. xylinus*, *Macrococcus caseolyticus*, *N. hansenii* e *P. pentosaceus*. A presença e interação de táxons pertencentes a comunidades *core* garantem a tipicidade da bebida, apesar das diferenças nas variáveis de processo.

Apesar da microbiota *core* ser considerada geralmente estável, diferenças significativas na composição da comunidade microbiana na fase líquida (chá fermentado) e fase sólida (SCOBY) já foram destacadas (Fabrício et al., 2022). Várias espécies tidas como frequentemente presentes em amostras de kombucha por

diversos estudos (inclusive nesta pesquisa), a exemplo de *Komagataeibacter* spp., para Fabrício et al. (2022), são comuns apenas na fração sólida, enquanto espécies de leveduras como *B. bruxellensis* compõem entre 98,8 – 99,9% da comunidade nas duas fases da kombucha. Segundo Kilmanoğlu, Yigit e Durak, (2023), que analisaram a fermentação de kombucha por uma monocultura de *B. bruxellensis* e sua co-cultura com *Acetobacter papayae*, apenas a levedura não é capaz de sintetizar compostos com atividade antioxidante significativa, além de produzir uma bebida com maior teor de ácido acético; dessa forma, apesar de compor a comunidade microbiana, as interações são indispensáveis para a tipicidade da bebida.

Tão relevante quando reconhecer a microbiota *core*, é evidenciar espécies que compõem apenas uma região, permitindo projetar características fermentativas durante a produção, baseadas no papel de cada táxon. Das quatro regiões, apenas no NO não apresentou espécies exclusivas. No SD, destacaram-se *Acetobacter* spp., tais como *Acetobacter conturbans*, *Acetobacter fabarum*, *Acetobacter garciniae*, *Acetobacter lambici*, *Acetobacter lovaniensis*, *Acetobacter orientalis*, *Acetobacter papayae*, *Acetobacter peroxydans*, *Acetobacter vaccinii*, *Acetobacter suratthaniensis* e *Acetobacter syzygii*; *Acetobacter* consiste em um dos gêneros mais diversos da kombucha (Ojo e Smidt, 2023). Ademais, *Acinetobacter guillouiae*, *Gluconacetobacter azotocaptans* e *Lactobacillus* sp., bem como *Candida californica*, *Candida inconspicua*, *Pichia kluyveri* e *Pichia membranifaciens* também foram detectados.

*Lactobacillus* sp., que ocorrem apenas na região SD, não foram relatados em estudos na mesma região por Barbosa et al. (2021); esses autores destacaram a ausência de espécies de bactérias do ácido láctico (BAL) em todas amostras analisadas, indicando que, apesar de possuírem um importante papel, esse grupo não é indispensável para o processo de fermentação. O papel de BAL é frequentemente relacionado à produção de ácidos orgânicos que contribuem para a acidificação inicial do chá, permitindo o crescimento mais eficiente de bactérias e leveduras ácido tolerantes essenciais para o processo; portanto, apesar de fornecerem meios que favoreçam populações, sua ausência não implica em perda da capacidade fermentativa da bebida (Savary et al., 2021; Hooi et al., 2023).

Tanto no SL quanto no CO, as amostras avaliadas apresentaram principalmente espécies de leveduras como microbiota exclusivamente típica destas regiões. No SL, destaque para *Ascobolus immersus*, *Candida intermedia*,

*Galactomyces reessii*, *Microthyrium microscopicum*, *Protomyces lactucae-debilis*, *Schizosaccharomyces japonicus*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Yamadazyma tenuis*, bem como *Acetobacter senegalensis* e *Gluconobacter cerinus*. Dartora et al. (2023) verificaram em amostras do sul do país, leveduras como *Myrmecridium schulzeri*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida orthopsilosis*, *Naganishia diffluens* e *Naganishia liquefaciens*, assim como *Methylobacterium radiotolerans*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas mendocina* e *Sphingomonas paucimobilis* foram detectadas em amostras de kombucha produzidas no Sul do país (Dartora et al, 2023), consideradas relevantes tanto para a formação de características típicas da bebida, quanto compostos *off-flavour* indesejáveis.

Nas amostras do CO, espécies bacterianas de 3 gêneros distintos foram detectadas, como *Acetobacter fallax*, *Acetobacter oeni*, *Acetobacter pomorum*, *Acidomonas methanolica* e *Gluconobacter oxydans*; por outro lado, leveduras foram mais diversas, com destaque para *Nakaseomyces glabratus* (*Candida glabrata*), *Kazachstania africana*, *Kazachstania naganishii*, *Lachancea dasiensis*, *Lachancea fermentati*, *Naumovozya castellii*, *Naumovozya dairenensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Tetrapisispora blattae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Torulaspora globosa*, *Vanderwaltozyma polyspora*, *Zygosaccharomyces bisporus*, *Zygosaccharomyces mellis*, *Zygosaccharomyces parabailii*, *Zygosaccharomyces rouxii* e *Zygotorulaspora mrakii*.

Dentre as espécies exclusivas do CO, *S. cerevisiae* se destaca, tendo em vista que este consiste no táxon geralmente relatado em estudos anteriores (Ansari et al., 2023). Segundo Meng et al. (2024), populações de *S. cerevisiae* ocorrem principalmente no início da fermentação, com abundância de até 77,60% no segundo dia de fermentação, sendo dominante neste período; entretanto, o processo de fermentação geralmente favorece o crescimento de *B. bruxellensis*, que se torna dominante até o 7<sup>o</sup> dia. Essa dinâmica microbiana ocorre em todas comunidades de kombucha, de forma diversa e entre diferentes espécies e grupos. Compreender os mecanismos de ajuste das populações em cada ambiente e composição é o primeiro passo para desenvolver um inóculo que possa ser utilizado como cultura *starter*, e que seja capaz de produzir uma bebida com composição bioativa e microbiológica predita.

## 5.7 Efeito da interação e perfil da comunidade microbiana na composição química e bioativa da kombucha

A composição química das amostras de kombucha está apresentada na Tabela 9. As diferentes comunidades microbianas resultam em perfis químicos distintos, com concentrações de metabólitos maiores nas amostras fermentadas do que no chá não fermentado (CNF). Os ácidos acético, glicurônico e succínico correspondem aos principais metabólitos gerados no decorrer do processo fermentativo, cujas concentrações são mais elevadas em relação aos demais, com até 2271,11; 1884,88 e 1424,51 mM, respectivamente. Segundo Leal et al. (2018) e Sknepnek et al. (2021), glicurônico e acético, são os ácidos orgânicos majoritários na fermentação da kombucha, e colaboram diretamente com sabor da bebida (Vitas et al., 2018; Tran et al., 2020). *Starmerella* spp. e *Komagataeibacter* spp. estão relacionadas à produção de ácido glicurônico, sendo geralmente dominantes em bebidas com alto teor do ácido (Li et al., 2022) Em nosso estudo, ambas as espécies ocorrem com frequência das comunidades, exceto nas amostras K11, K23, K15 e K18, onde não foram identificadas cepas da levedura; importante ressaltar que, essas duas últimas amostras (K15 e K18) possuem o menor teor e ND, respectivamente. Dessa forma, a ocorrência de *Starmerella* spp., como *S. bacillaris* e *S. bombicola*, podem contribuir direta ou indiretamente com a biossíntese de ácido glicurônico durante a fermentação da kombucha.

Os ácidos butírico, málico e láctico foram detectados em todas as amostras fermentadas, exceto para K02 para os dois últimos. Segundo Savary et al. (2021), diversos ácidos orgânicos, incluindo os ácidos málico, glicurônico, glicônico, são produzidos em fermentações na presença simultânea de *B. bruxellensis* e *Acetobacter tropicalis*, que ocorrem nas comunidades analisadas nesse estudo. Apesar de detectado na maioria das amostras, o ácido láctico esteve presente em baixas concentrações, quando comparados a estudos anteriores; de acordo com Moens, Lefeber e De Vuyst (2014), algumas espécies de BAA, como *A. pasteurianus*, podem oxidar esse composto em ácido acético. Ácido propiônico foi observado em diversas amostras, exceto em K02, K08, K10, K11, K15, K18, K21, K25 e K28, significativamente ( $p > 0,05$ ) semelhantes ao CNF. Dentre as amostras onde foi detectado, K13 e K23 foram as únicas que apresentaram atividade antimicrobiana

tanto contra *S. aureus*, quanto para *S. enterica*. De acordo com Antone et al. (2022), esse ácido orgânico possui um alto potencial antimicrobiano, que pode atuar mesmo em baixas concentrações, incluindo *S. aureus*.

O ácido glicônico foi detectado apenas em K24 e K25. Segundo Martínez-Leal, Ponce-García e Escalante-Aburto (2020), durante o processo de fermentação da kombucha, o ácido glicônico pode ser convertido a ácido glicurônico pela atividade de BAA, o que pode explicar a falta de detecção desse metabólito em nossas amostras, visto o alto teor de ácido glicurônico em todas as bebidas. Assim como o ácido glicônico, dentre os compostos fenólicos, ácido gálico foi detectado apenas nas amostras K24 e K25. K25 está entre as amostras que possuem a maior diversidade microbiana e distribuição de espécies, além disso possui um perfil de composição distinto das demais analisadas, com dominância de *Z. rouxii*, espécie que não ocorre das demais comunidades; além disso, essa amostra apresentou o menor teor de ácido succínico, indicando o seu uso como fonte de carbono para produção dos demais ácidos. Li et al. (2022) obtiveram achados semelhantes, descreveram que fermentações contendo uma co-cultura de *Z. rouxii* e *S. cerevisiae* apresentaram baixa produção de ácido succínico, enquanto produziram altas concentrações de ácido gálico. Ácido gálico é um importante antioxidante frequentemente observado em fermentações de kombucha em diversos estudos (Ivanišová et al., 2019); no entanto, seu conteúdo está intimamente relacionado ao tipo de substrato, sendo encontrado naturalmente em maiores concentrações no chá preto, diferente do padronizado para esse estudo.

O ácido fólico foi o principal composto fenólico identificado, estando presente em todas as amostras, com concentrações de até 275,03 mM (K05), e no CNF (87,45 mM). Esse metabólito, conhecido também como vitamina B9, não é sintetizado naturalmente por células de mamíferos, que carecem de fontes exógenas, entretanto é um importante suplemento para o metabolismo humano, sendo associado a diversos efeitos benéficos a saúde (Barry et al., 2023). Apesar de serem altamente sensíveis a variações de temperatura e presença de oxigênio, Shulpekova et al. (2021), relataram que compostos antioxidantes podem inibir sua oxidação, o que pode explicar as altas concentrações nas amostras de kombucha analisadas.

Os metabólitos ácido caféico, quercetina e rutina não foram detectados nas amostras. Para Kim et al. (2023), é possível obter altas concentrações de ácido caféico

utilizando linhagens de *Bacillus xiamenensis* e *S. cerevisiae* como principal composição da microbiota; o primeiro não foi identificado nas comunidades nesse estudo e o segundo apenas na amostra K25. Esses autores relataram ainda que a síntese de rutina, pode estar relacionada a uma dominância de *K. intermedius* e *B. bruxellensis*. De modo geral, mesmo que compostos sejam produzidos durante o processo de fermentação, a continuidade das interações microbianas pode resultar na degradação e/ou utilização desses metabólitos para síntese de produtos finais ou outros intermediários (Wu et al., 2023).

Apesar de ocorrer a fermentação alcóolica por leveduras, o etanol foi detectado apenas nas amostras K24, K28, K29 e K30. Segundo Kim et al. (2023), o etanol é abundantemente produzido em fermentações tendo *K. intermedius* e *B. bruxellensis* como cultura *starter*; no presente estudo, apesar de estarem presentes na maioria das comunidades, essas espécies não foram capazes de produzir esse metabólito em grandes concentrações; seus baixos teores podem indicar rápida oxidação do metabólito, pelo metabolismo das BAA, em ácido orgânicos, sobretudo o ácido acético.

Tabela 9. Composição química (mM) de diferentes amostras de kombucha após o 7º dia de fermentação (25 °C).

Amostra	Ác. Acético	Ác. Glicurônico	Ác. Glicônico	Ác. Lático	Ác. Succínico	Ác. Málico	Ác. Propiônico
K02	107.08 ± 0,2 <sup>a</sup>	1884.88 ± 8,8	ND <sup>a</sup>	ND	1181.13 ± 11,5	ND	ND <sup>a</sup>
K05	46.46 ± 0,8 <sup>a</sup>	1848.67 ± 9,7	ND <sup>a</sup>	116.01 ± 1,7	770.85 ± 6,4	15.89 ± 0,0	2.97 ± 0,1
K06	2271.11 ± 16,6	1677.04 ± 17,4	ND <sup>a</sup>	134.33 ± 0,7	865.36 ± 4,2	15.74 ± 0,3	23.22 ± 0,3
K08	148.71 ± 5,0 <sup>a</sup>	1463.58 ± 12,8	ND <sup>a</sup>	37.19 ± 0,9	763.40 ± 3,9	13.80 ± 0,2	ND <sup>a</sup>
K10	1559.37 ± 13,9	1353.71 ± 18,5	ND <sup>a</sup>	100.13 ± 1,6	552.46 ± 1,8	13.35 ± 0,2	ND <sup>a</sup>
K11	270.61 ± 1,2 <sup>a</sup>	1538.12 ± 3,1	ND <sup>a</sup>	39.96 ± 0,1	1424.51 ± 6,3	14.39 ± 0,0	ND <sup>a</sup>
K13	1694.25 ± 14,1	1347.43 ± 11,3	ND <sup>a</sup>	100.47 ± 0,6	611.82 ± 8,4	14.54 ± 0,1	8.23 ± 0,3
K15	35.14 ± 0,4 <sup>a</sup>	794.48 ± 13,8 <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND	415.62 ± 6,3	9.32 ± 0,1 <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
K16	32.31 ± 0,4 <sup>a</sup>	953.02 ± 19,6 <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	119.23 ± 2,2	392.58 ± 1,8	14.47 ± 0,2	3.10 ± 0,0
K18	979.18 ± 5,9	ND	ND <sup>a</sup>	76.93 ± 0,4	518.42 ± 5,5	12.01 ± 0,1	ND <sup>a</sup>
K20	1359.53 ± 1,0	1008.55 ± 4,1 <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	90.70 ± 0,0	484.80 ± 0,9	13.20 ± 0,1	4.32 ± 0,1
K21	250.96 ± 0,5 <sup>a</sup>	1088.65 ± 7,7	ND <sup>a</sup>	48.40 ± 0,2	939.71 ± 3,8	12.38 ± 0,1	ND <sup>a</sup>
K23	149.38 ± 0,6 <sup>a</sup>	1039.46 ± 10,6	ND <sup>a</sup>	25.42 ± 0,2	520.96 ± 2,8	15.44 ± 0,1	2.70 ± 0,0
K24	58.28 ± 0,3 <sup>a</sup>	913.36 ± 6,3 <sup>a</sup>	3.98 ± 0,1	22.76 ± 0,1 <sup>a</sup>	267.17 ± 1,0	14.99 ± 0,1	2.29 ± 0,0 <sup>a</sup>
K25	1389.51 ± 1,7	1238.80 ± 6,8	5.05 ± 0,1	96.80 ± 0,1	180.71 ± 1,1 <sup>a</sup>	15.21 ± 0,2	ND <sup>a</sup>
K26	1686.43 ± 1,6	1074.17 ± 2,7	ND <sup>a</sup>	42.74 ± 0,2	190.19 ± 0,2 <sup>a</sup>	14.02 ± 0,1	4.72 ± 0,1
K28	77.77 ± 0,0 <sup>a</sup>	994.44 ± 2,6	ND <sup>a</sup>	24.31 ± 0,0 <sup>a</sup>	413.67 ± 0,4	14.77 ± 0,0	ND <sup>a</sup>
K29	1811.32 ± 1,8	1234.93 ± 2,5	ND <sup>a</sup>	116.45 ± 0,3	667.71 ± 1,3	13.72 ± 0,1	12.69 ± 0,2
K30	1208.16 ± 1,5	1069.64 ± 2,8	ND <sup>a</sup>	113.57 ± 0,4	589.55 ± 0,7	13.20 ± 0,2	10.26 ± 0,2
CNF	21.82 ± 0,0 <sup>a</sup>	699.39 ± 2,1 <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	21.65 ± 0,0 <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	7.09 ± 0,0 <sup>a</sup>	2.29 ± 0,0 <sup>a</sup>

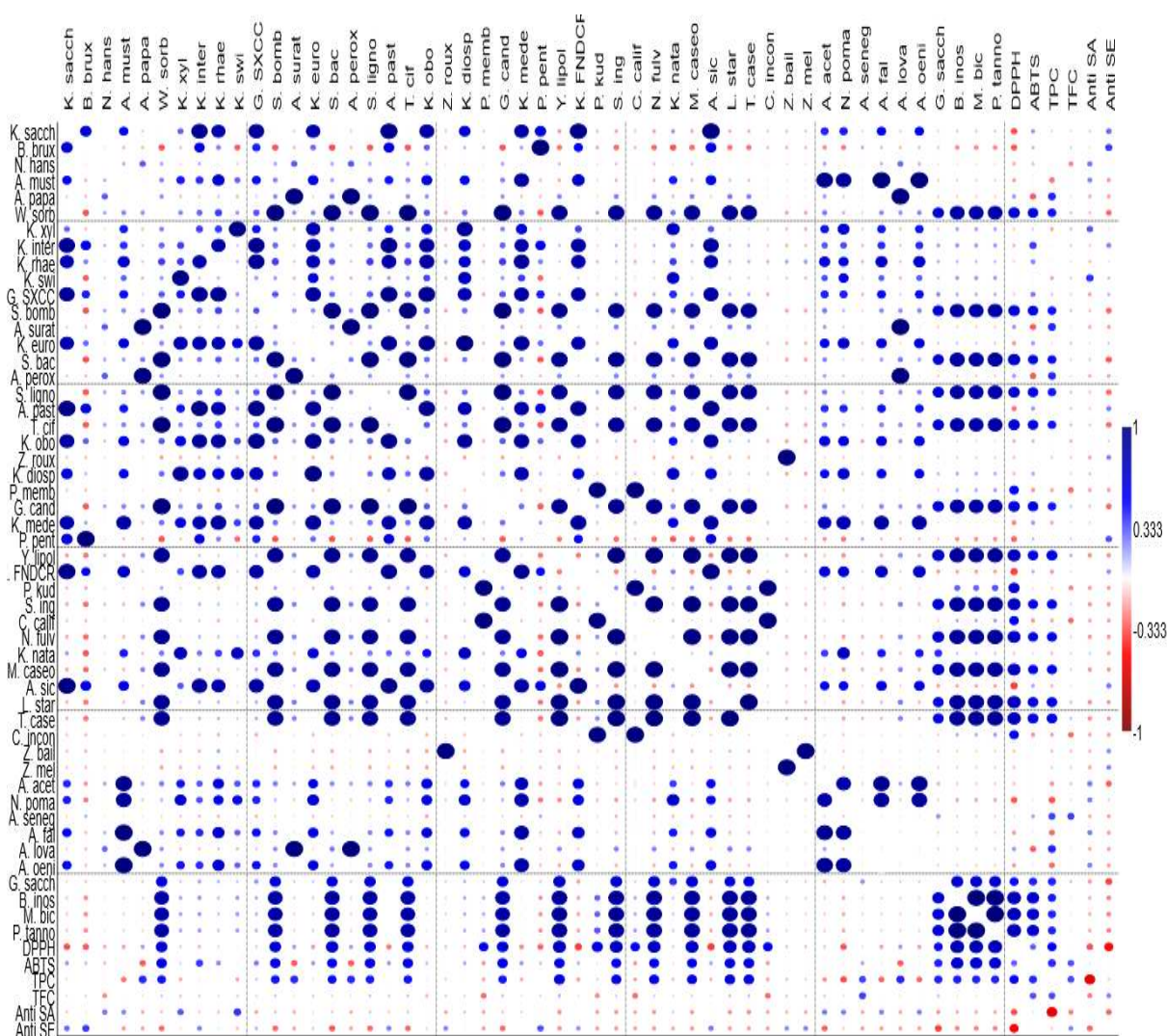
Continua

Amostra							Conclusão
	Ác. Butírico	Ác. Gálico	Ác. fólico	Ác. caféico	Rutina	Quercetina	Etanol
K02	43.58± 0,3 <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	256.39± 11.9	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
K05	135.29± 2,1	ND <sup>a</sup>	275.03± 5.5	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
K06	245.26± 4,0	ND <sup>a</sup>	241.11± 7.7	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
K08	43.70± 0,8 <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	238.94± 8.2	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
K10	302.24± 2,9	ND <sup>a</sup>	183.66± 8.5	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
K11	36.32± 0,3 <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	233.02± 3.0	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
K13	203.84± 1,4	ND <sup>a</sup>	191.66± 6.6	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
K15	29.74± 0,7 <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	152.73± 6.2	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
K16	172.40± 0,1	ND <sup>a</sup>	215.40± 3.1	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
K18	165.02± 0,6	ND <sup>a</sup>	159.33± 4.8	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
K20	143.68± 0,8	ND <sup>a</sup>	167.58± 1.7	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
K21	27.01± 0,5 <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	190.16± 3.4	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
K23	208.83± 0,8	ND <sup>a</sup>	141.87± 3.1	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
K24	148.00± 0,6	28.63± 0,3	114.43± 2.5 <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	277.90± 3,4
K25	118.15± 0,7	33.33± 0,3	152.23± 2.2	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
K26	64.81± 0,4	ND <sup>a</sup>	244.06± 1.2	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
K28	144.36± 0,3	ND <sup>a</sup>	154.11± 4.3	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	309.16± 0,1
K29	226.65± 0,6	ND <sup>a</sup>	227.08± 12.5	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	202.13± 1,8
K30	163.89± 0,3	ND <sup>a</sup>	173.91± 3.3	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	135.26± 0,3
CNF	37.91± 0,2 <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	87.45± 2.4 <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de ensaios em triplicata. Os sobrescritos representam dados com similaridade significativa ( $p < 0,05$ ) com o CNF pelo teste de Tukey, em ANOVA um critério para cada coluna. CNF: Chá não fermentado. ND: Não detectado.

Além dos diferentes perfis de diversidade e dominância de espécies, apresentados pelas comunidades das amostras de kombucha, as populações tendem a apresentar um perfil heterogêneo de indivíduos. Nesse estudo, apenas as amostras K11, K15 e K18 apresentaram menos de 20 espécies distintas; em relação às demais, o amplo conjunto de microrganismos revela boas perspectivas para incremento do teor de compostos relevantes para o perfil bioativo e *flavour* da bebida. Compreender o papel destes microrganismos, tal qual suas relações ecológicas na microbiota, forneceria *insights* interessantes para o desenvolvimento de bebidas inovadoras. A Figura 22 destaca a correlação entre as 50 espécies mais abundantes nas bebidas e o respectivo perfil bioativo.

Figura 22. Correlação entre as 50 espécies mais abundantes e o potencial bioativo de kombucha brasileiras.

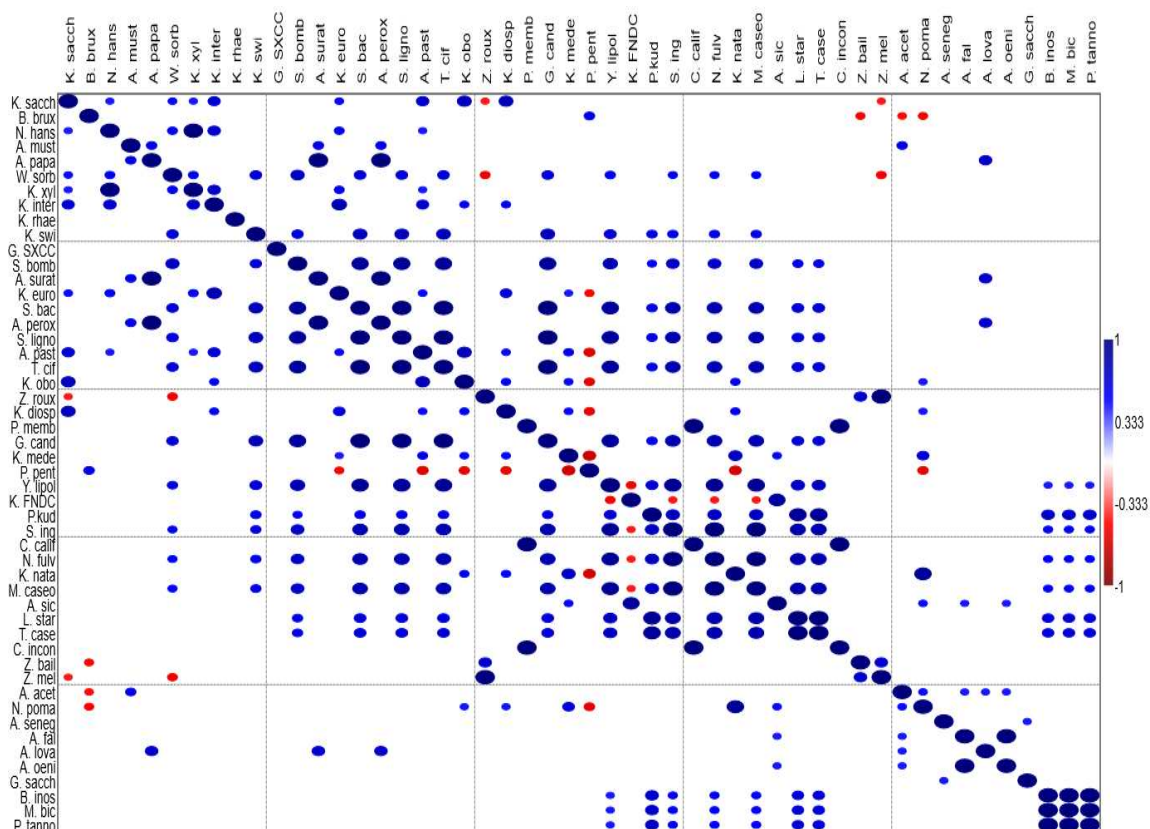


Correlação de Pearson entre as principais espécies e o perfil bioativo. DPPH: Redução do radical 1-difenil 2-picrilhidrazil. ABTS: Redução do radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico). TPC: Teor de compostos fenólicos totais. TFC: Teor de flavonoides totais. Anti SA: Atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*. Anti SE: Atividade antimicrobiana frente a *Salmonella enterica*.

Diversas interações ocorrem entre as diferentes populações no consórcio microbiano da kombucha (Figura 23). Nas dinâmicas populacionais, o crescimento de uma determinada espécie pode favorecer o crescimento de outras, seja por meio da disponibilização de nutrientes, modulando o ambiente ou produzindo compostos relevantes para a manutenção do seu metabolismo; da mesma forma, a interação pode impactar negativamente no desenvolvimento microbiano (Tran et al., 2020). No

geral, as leveduras apresentaram mais correlações positivas ( $p < 0,05$ ) em relação às bactérias.

Figura 23. Dinâmica de correlação ( $p < 0,05$ ) entre as 50 espécies mais abundantes que compõem o consórcio microbiano da kombucha



Considerando-se as espécies microbianas mais abundantes nas amostras de kombucha, *K. saccharivorans* e *B. bruxellensis*, compreender de que maneira elas interagem com os demais microrganismos pode revelar o papel da dinâmica populacional na qualidade da bebida. A presença de *K. saccharivorans* foi positivamente correlacionada ( $p < 0,05$ ) com outras espécies do gênero, tais como *K. xylinus*, *K. intermedius*, *K. europaeus*, *K. oboediens* e *K. diospyri*, bem como com as bactérias acéticas *N. hansenii*, *A. pasteurianus* e da levedura *W. sorbophila*; entretanto, relações negativas da bactéria com espécies de *Zygosaccharomyces* sp., como *Z. mellis* e *Z. rouxii*, foram detectadas. *Zygosaccharomyces* spp. estão relacionadas a fermentações com alto consumo de etanol em ambiente aeróbico, principalmente em limitação de carboidratos fermentáveis, além do acúmulo simultâneo de compostos de *flavour*, resultantes do lento crescimento da levedura

nessas condições, quando comparada a *Saccharomyces* sp. (Petruzzi et al., 2016; Sohrabvandi et al., 2009). Nesse estudo, a melhor correlação de *B. bruxellensis* ocorreu com a bactéria láctica *P. pentosaceus*; ambos são capazes de sobreviver em ambientes com altos níveis de etanol e ácidos orgânicos, baixa disponibilidade de oxigênio e limitações nutricionais (Branco, Diniz e Albergaria, 2022). Interações não simbióticas ocorreram entre *B. bruxellensis* e *N. pomaceti*, *A. aceti* e a levedura *Z. mellis*.

Nguyen et al. (2015), que desenvolveram uma co-cultura como *starter* de fermentação, descreveram que a simbiose entre *K. intermedius* e *B. bruxellensis* resultou em altos teores de ácido glicurônico após 7 dias de fermentação, maiores que os observados para kombucha tradicional; semelhante ao observado no presente estudo. Além disso, a eficiência energética na produção de etanol por *B. bruxellensis*, maior que a de *S. cerevisiae* em determinadas condições, também já foi demonstrada (Blomqvist et al. 2012), o que pode favorecer a fermentação de *K. intermedius*, que utiliza o etanol como fonte de energia e para produção de ácidos (May et al., 2019), e consequentemente contribui com a biossíntese do ácido glicurônico na bebida. Além disso, o acúmulo de ácido acético estimula o fluxo na via do glucuronato pela inibição por *feedback* do metabolismo da glicólise na bactéria (Freer, Dien e Matsuda, 2003; Yang et al., 2010). A produção do ácido glicurônico por *K. intermedius* ocorre sobretudo na fase estacionária, após cerca de 54 h de crescimento; otimizações das condições fermentativas poderiam, portanto, prolongar esse estágio, aumentando, consequentemente, a produção do composto (Nguyen et al. 2015).

Wang et al. (2020) avaliaram a fermentação de chá por uma comunidade microbiana padronizada composta por *A. pasteurianus*, *K. xylinus* e *Z. bailii*. Os autores demonstraram uma rápida redução no teor de açúcar após os dois primeiros dias de fermentação, que permanece até o décimo dia; altos teores de ácidos glicônico, glicurônico e acético foram produzidos pela microbiota avaliada, ainda, a presença de *A. pasteurianus* foi associada à produção de altas concentrações de ácido glicônico (9,6 mg/mL) e reduzida quantidade de ácido acético no produto final (0,6 mg/mL), o que poderia contribuir para a promoção da saúde e para uma maior aceitação pelos consumidores. Além disso, *A. pasteurianus* produziu maiores concentrações de compostos fenólicos totais e flavonoides, incrementando o potencial antioxidante da bebida (Wang et al., (2020).

A produção de compostos totais é significativamente maior na presença de *B. bruxellensis*, sobretudo de ácido gálico (Villarreal-Soto et al. 2020), cujo potencial antioxidante é o maior dentre eles (Badhani et al. 2015); a levedura é, ainda, associada à síntese de compostos fenólicos, como as catequinas (Villarreal-Soto et al. 2020). Estudos utilizando leveduras não-*Saccharomyces* (NSY) têm ganhado mais destaque na produção de bebidas com características direcionadas. Nesse contexto, a utilização de *B. bruxellensis*, *Torulaspora delbrueckii*, *Wickerhamomyces anomalus* e *Starmerella bacillaris* tem sido avaliada devido à sua contribuição para a complexidade sensorial dos produtos, principalmente decorrente da produção de compostos aromáticos, além de bioativos, garantindo um bom desempenho para o processo de fermentação bem como o desenvolvimento de atributos desejáveis (Ciani et al., 2020).

Enquanto a presença de BAA como *Acetobacter musti* e *Acetobacter papayae* foram positivamente relacionadas apenas a espécies do mesmo gênero, *N. Hansenii* apresentou correlação positiva com *Komagataeibacter* spp. e *Acetobacter* spp., além da levedura *W. sorbophila* (Figura 24). O teor de compostos bioativos (TPC e TFC) foi influenciado positivamente pela presença e abundância da bactéria acética *A. senegalensis*. Nenhuma espécie foi associada apenas à biossíntese de flavonoides, enquanto o TPC aumentou com a presença das mesmas espécies do perfil de compostos antioxidantes, bem como de *Acetobacter* spp., especialmente *A. papayae*, *Acetobacter surathaniensis*, *Acetobacter peroxydans* e *Acetobacter lovaniensis* (índices de correlação variando de 0,426 a 0,602).

Dentre as populações mais abundantes, as leveduras *W. sorbophila*, *S. bombicola*, *S. bacillaris*, *Sugiyamaella lignohabitans*, *Trichomonascus ciferrii*, *Geotrichum candidum*, *Y. lipolytica*, *P. kudriavzevii*, *Saprochaete ingens*, *Nadsonia fulvescens*, *Macrocooccus caseolyticus*, *Lipomyces starkeyi* e *Tortispora caseinolytica* apresentaram correlação positiva entre si. As sete últimas apresentaram, ainda, correlação com *Babjeviella inositovora*, *Metschnikowia bicuspidata* e *Pachysolen tannophilus*, também relacionadas entre si. Dentre estas, destaque para *Y. lipolytica*, cuja presença de genes que codificam lipases (LIP2, LIP7 e LIP8) e genes POX que codificam acil-CoA oxidases envolvidos em processos de  $\beta$ -oxidação (Fickers et al., 2005; Haddouche et al., 2010) a torna capaz de metabolizar substratos hidrofóbicos (como por exemplo ácidos graxos), sintetizando, por conseguinte, ácidos orgânicos derivados principalmente do ciclo do TCA e compostos aromáticos, os quais podem

estar presentes na bebida ou serem utilizados como substrato pela microbiota (Do, Theron e Fickers, 2019).

Essas interações ecológicas afetam diretamente o perfil de compostos bioativos e ácidos orgânicos da bebida. Para o perfil de atividade antioxidante, leveduras correspondem ao principal grupo associado a elevado potencial, com destaque para *W. sorbophila*, *S. bombicola*, *S. bacillaris*, *S. lignohabitans*, *Trichomonascus ciferrii*, *Geotrichum candidum*, *Y. lipolytica*, *Saprochaete ingens*, *Nadsonia fulvescens*, *Lipomyces starkeyi*, *Tortispora caseinolytica*, *Babjeviella inositovora*, *Metschnikowia bicuspidata* e *Pachysolen tannophilus*; já as bactérias *Macrococcus caseolyticus* e *Gluconacetobacter sacchari* parecem cumprir um papel relevante na manutenção deste potencial, com valores de correlação de Person entre 0,482 a 0,784. Além dessas espécies, *Pichia membranifaciens*, *P. kudriavzevii* e *Candida inconspicua* foram correlacionados apenas ao DPPH, enquanto *K. intermedius*, ao ensaio de ABTS. Interessante destacar que *P. kudriavzevii* é capaz de tolerar o estresse ácido provocado pela biossíntese e acúmulo de ácidos orgânicos no substrato fermentativo, assim como produzir elevadas concentrações de ácido láctico mesmo em reduzidos valores de pH (Park et al., 2018).

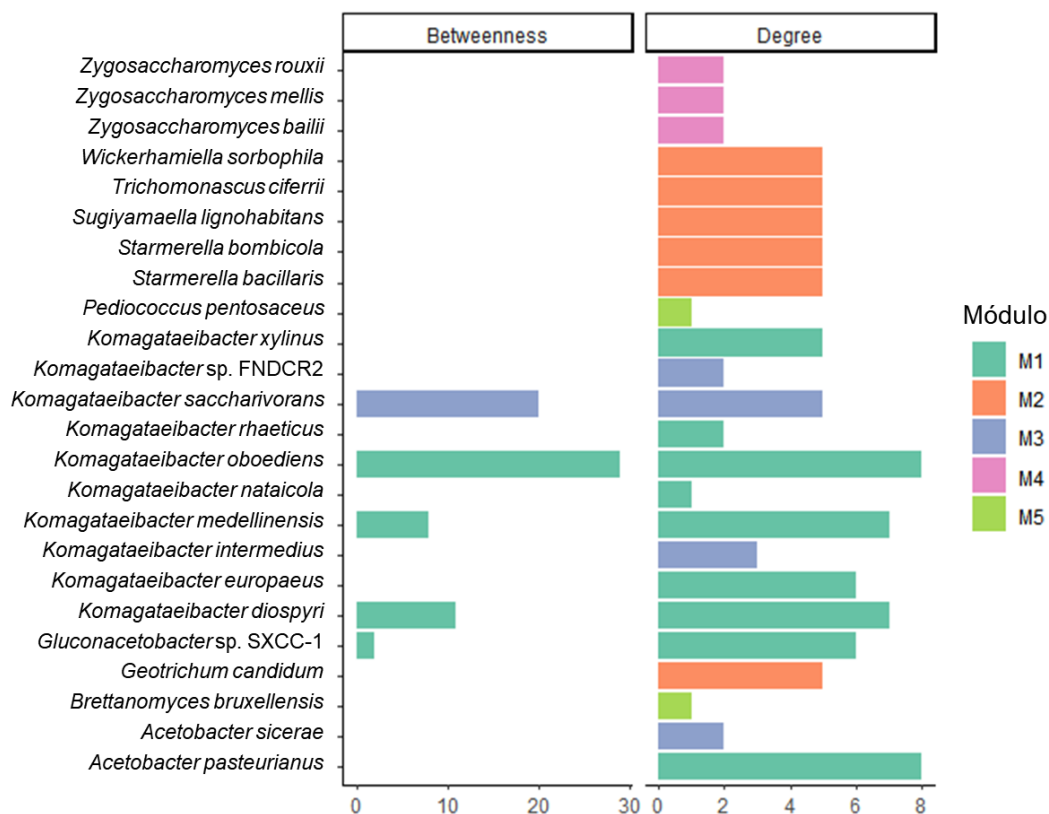
Variações no potencial antioxidante do chá fermentado estão relacionadas à diversidade microbiana do SCOBY. Chás preto fermentados por *S. cerevisiae* apresentaram maior atividade de redução dos radicais hidroxil e DPPH, bem como aumento no conteúdo de vitamina C e ácidos totais; o mesmo efeito não foi observado para o chá verde fermentado (Malbaša et al. 2011). Por outro lado, chás fermentados exclusivamente por *Zygosaccharomyces* sp. apresentaram capacidade antioxidante e teor de vitamina C reduzidos em comparação a chás fermentados por culturas mistas. Sugere-se que *Z. bailii*, quando em cultura simples, esteja envolvido em processos importantes para o sabor da bebida, por meio da liberação de compostos aromáticos (Murugesan, Angayarkanni, e Swaminathan, 2002).

A presença de *P. pentosaceus*, considerada uma das BAL mais abundante nas amostras de kombucha, foi relacionada positivamente apenas com *B. bruxellensis*, e negativamente com *Komagataeibacter* spp., como *K. europaeus*, *K. oboediens*, *K. diospyri*, *K. medellinensis*, *K. nataicola*, e, ainda, com *A. pasteurianus* e *N. pomaceti*. Apesar de presentes em baixas populações e não serem consideradas essenciais para o processo de fermentação da kombucha, BAL podem desempenhar

papéis relevantes no rendimento e produção de compostos de interesse (Nguyen et al. 2014; Anderson et al., 2023). Por exemplo, a presença de *Lactobacillus* sp. pode influenciar positivamente o crescimento de *Gluconacetobacter* sp. devido à diminuição rápida de pH do substrato, fornecendo vantagens competitivas à bactéria acética. Essa interação promove o aumento da produção de ácido-D-sacárico-1,4-lactona (DSL) por *Gluconacetobacter* sp. (Yang et al. 2010), indicando pela presença de ácido glicurônico, uma vez que ambos têm origem na via do glucuronato (Hoffmann, 2000). Além de promover o aumento da concentração de ácidos orgânicos, a presença de linhagens de BAL pode influenciar positivamente as atividades antioxidantes e antimicrobianas (Nguyen et al., 2014).

As redes de interações entre os componentes da microbiota da kombucha demonstraram um perfil de relação e dependência entre as espécies microbianas (Figura 24, Tabela 10). A partir desta análise de interações, cinco módulos principais puderem ser diferenciados, formados por espécies filogeneticamente relacionados ou não. O módulo 1 é formado pelo maior número de espécies de bactérias, sobretudo de *Komagataeibacter* sp., dentre elas *Komagataeibacter oboediens*, com o maior número de relações (n: 8) e elevado *betweenness* (n: 29); neste módulo ainda se destacam *Gluconacetobacter* sp. SXCC-1 e *A. pasteurianus*; o módulo 3 apresentou perfil semelhante, com as espécies *Komagataeibacter* sp. FNDCR2, *K. saccharivorans*, *K. intermedius* e *Acetobacter sicerae*.

Figura 24. Principais interações entre as espécies que compõem a rede na microbiota total de kombucha.



Os módulos 2 e 4 são compostos exclusivamente por leveduras, sendo o 2 apenas por *Zygosaccharomyces* spp., como *Z. bailii*, *Z. mellis* e *Z. rouxii*. *Zygosaccharomyces* spp. são altamente tolerantes a condições de estresse típicas do processo fermentativo da kombucha, como concentrações elevadas de ácidos orgânicos, especialmente láctico, ascórbico e acético (*Z. bailii*), bem como de açúcares (*Z. mellis* e *Z. rouxii*) (Kuanyshev et al., 2017; Solieri, 2021). Como estratégia para sobreviver em ambientes muito ácidos, *Z. bailii* co-consome ácido acético e glicose, uma vez que são capazes de produzir a enzima constitutiva acetil-CoA sintetase (*ZbACS2*), a qual não é reprimida pelo monossacarídeo (Rodrigues et al. 2012; Guerreiro et al., 2012). Além disso, linhagens de *Z. bailii* podem produzir álcoois, como o 2-feniletanol (2-PE), pelas vias Shikimate ou Ehrlich (Wang et al., 2019), exibindo alto potencial antimicrobiano contra bactérias gram-negativas e fungos filamentosos (Fraud et al., 2003; Solieri, 2021), o que pode estar relacionado à atividade antimicrobiana demonstrada neste estudo para *S. enterica*.

Importantes interações podem ocorrer entre diferentes espécies de *Zygosaccharomyces* spp., que favorecem seu desenvolvimento nas redes

microbianas. Culturas de *Z. bailii* podem ser utilizadas para corrigir pH em ambientes de fermentação, uma vez que são convencionalmente capazes de consumir ácido málico acumulado no meio (Vilela 2017). Por outro lado, *Z. rouxii* sintetiza este ácido orgânico em condições aeróbicas, sobretudo quando o ácido glutâmico está presente, atuando como precursor do  $\alpha$ -cetogluturato (Taing e Taing, 2007; Solieri, 2021). A produção de ácido málico ocorre principalmente através da via não oxidativa (carboxilação do piruvato a oxaloacetato, seguida da redução do oxaloacetato a malato), do ciclo do TCA e do ciclo do glioxilato, sendo favorecida em altas concentração de carboidratos e valores de pH ao redor de 5,0 (Radler 1993; Solieri, 2021).

Tabela 10. Dinâmica da rede de interações entre as principais espécies que compõem a microbiota total de kombucha

Espécie	<i>Degree</i>	<i>Betweenness</i>	Módulo
<i>Komagataeibacter oboediens</i>	8	29	M1
<i>Komagataeibacter saccharivorans</i>	5	20	M3
<i>Komagataeibacter diospyri</i>	7	11	M1
<i>Komagataeibacter medellinensis</i>	7	8	M1
<i>Gluconacetobacter</i> sp. SXCC-1	6	2	M1
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	8	0	M1
<i>Komagataeibacter europaeus</i>	6	0	M1
<i>Geotrichum candidum</i>	5	0	M2
<i>Komagataeibacter xylinus</i>	5	0	M1
<i>Starmerella bacillaris</i>	5	0	M2
<i>Starmerella bombicola</i>	5	0	M2
<i>Sugiyamaella lignohabitans</i>	5	0	M2
<i>Trichomonascus ciferrii</i>	5	0	M2
<i>Wickerhamiella sorbophila</i>	5	0	M2
<i>Komagataeibacter intermedius</i>	3	0	M3
<i>Acetobacter sicerae</i>	2	0	M3
<i>Komagataeibacter rhaeticus</i>	2	0	M1
<i>Komagataeibacter</i> sp. FND CR2	2	0	M3
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	2	0	M4
<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	2	0	M4
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	2	0	M4
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	1	0	M5
<i>Komagataeibacter nataicola</i>	1	0	M1
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1	0	M5

O módulo 5 é formado por *B. bruxellensis* e *P. pentosaceus*. Para além da fermentação de chá, a relação entre *Pediococcus* spp. e *B. bruxellensis*, foi anteriormente descrita; ambos foram utilizados em co-cultura para produção de bebidas com altas populações da BAL, favorecendo a produção de características sensoriais de interesse, bem como resultando em efeitos significativos na degradação

dos ácidos p-cumárico, caféico e ferúlico (Strickland et al., 2016). Na atividade antimicrobiana, os táxons *B. bruxellensis* e *P. pentosaceus* foram correlacionados positivamente ao efeito contra *S. enterica*, enquanto *K. xylinus* e *K. swingsii* contra *S. aureus*. Além da produção de ácidos orgânicos relacionados ao perfil antioxidante, linhagens de *B. bruxellensis* são capazes de produzir, acumular e posteriormente consumir altas concentrações de ácido acético em condições aeróbias, o que pode também favorecer a potencial atividade antimicrobiana da kombucha (Iattici et al., 2020).

Além do efeito dos ácidos orgânicos, *Lactobacillus* spp. e *Pediococcus* spp. podem inibir o crescimento de patógenos devido à produção de bacteriocinas e peróxidos (Fijan et al., 2019; Moradi et al., 2020). Junnarkar et al. (2019) demonstraram que patógenos como *Staphylococcus epidermidis* e *E. coli* podem ser sensíveis a produtos da fermentação produzidos por *Lactobacillus* spp. e *Pediococcus* spp., principalmente *P. acidilactici* e *P. pentosaceus*, consideradas espécies bacteriocinogênicas eficazes e seguras para aplicação em alimentos e bebidas (Pinto et al., 2020).

Assim como no presente estudo, correlações entre BAL e a atividade antimicrobiana já foram descritas. Linhagens de *Pediococcus* spp., como *P. acidilactici* e *P. pentosaceus*, foram associadas à atividade antimicrobiana contra *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholera*, *Pseudomonas* sp., *B. cereus* e *E. coli*; esse potencial foi relacionado principalmente à produção de ácido láctico (Adebayo-Tayo, Olomitutu e Adebami, 2021). Além destas, a presença de outras espécies de *Lactobacillus* sp., bem como *Lacticaseibacillus* sp. e *Lactiplantibacillus* sp. são comumente associadas a diferentes ácidos orgânicos e compostos bioativos, contribuindo para a atividade antioxidante da bebida (Duan et al., 2023).

Sendo um constituinte da microbiota core, *K. rhaeticus* foi detectado em todas as amostras de kombucha analisadas. Pesquisas revelam que esta espécie participa de uma das mais importantes interações entre bactérias e leveduras do consórcio microbiano da bebida, favorecendo o crescimento de *Z. bailii* (Arikan et al. 2020). Este processo acontece uma vez que *K. rhaeticus* possui genes que codificam para enzimas das vias completas para a biossíntese de vitaminas do grupo B, como B1, B7 e B12 (Jayabalan et al. 2014; Arikan et al. 2020). Essas vitaminas são requeridas para o crescimento de *Z. bailii* (Stratford e Capell, 2003); além disso, a acidificação do

ambiente decorrente da produção de ácido acético e glicônico inibe potenciais competidores da levedura (Dang et al. 2009). Sabe-se, ainda, que *Z. bailli* possui vias e genes importantes para suplementação nutricional de outros microrganismos, como gama-aminobutirato (GABA), que contribui para a tolerância ao estresse oxidativo em *S. cerevisiae* (Coleman et al. 2001). Além disso, a dominância de *S. cerevisiae* no inóculo favorece o aumento da atividade antioxidante do chá após a fermentação (Malbaša et al. 2011); entretanto, foram verificadas relações positivas entre o potencial antioxidante verificado nas kombuchas analisadas apenas para leveduras não-*Saccharomyces*.

Apesar de descritas como eficientes no aumento das atividades biológicas da kombucha, a presença de determinadas linhagens *S. cerevisiae* pode inibir o crescimento de microrganismos-chave para a qualidade da bebida (Branco, Diniz e Albergaria, 2022). Em nossas análises não foi identificada, em nenhuma amostra, a ocorrência simultânea de *S. cerevisiae* com *B. bruxellensis* ou BAL. Durante o processo metabólico, várias estirpes de *S. cerevisiae* – sobretudo isoladas de vinho - secretam peptídeos antimicrobianos (AMP) no decorrer da fermentação alcoólica, os quais apresentam atividade inibitória contra outras leveduras, como *B. bruxellensis*, e BAL (Branco, Diniz e Albergaria, 2022). Este fenômeno é altamente desejável em processos fermentativos voltados para a produção de etanol, uma vez que a proliferação de microrganismos contaminantes pode reduzir o rendimento devido ao consumo de açúcares e acúmulo de subprodutos como ácido lático e acético, afetando o metabolismo de *S. cerevisiae* (Abbott, Hynes e Ingledew, 2005; Lopes et al., 2016). Por outro lado, para a kombucha concentrações elevadas de álcool geralmente não são desejáveis; assim, a redução na produção de etanol por conta de interações entre os grupos microbianos não é, necessariamente, um problema.

Tão importante quando analisar as relações positivas, o impacto negativo da presença de algumas espécies na qualidade da kombucha merece destaque. Diferentes táxons foram negativamente correlacionados à atividade antioxidante; para DPPH, as espécies de bactérias acéticas *K. saccharivorans*, *Komagataeibacter* sp. FND2, *A. pasteurianus*, *A. siceræ*, *N. pomaceti*, bem como da BAL *P. pentosaceus* e da levedura *B. bruxellensis*, não favorecem o aumento da atividade antioxidante nas condições avaliadas; já para o ensaio de ABTS, apenas *Acetobacter* spp. foram verificadas como negativamente correlacionadas, com destaque para *A. papayæ*, *A.*

*suratthaniensis*, *A. peroxydans* e *A. lovaniensis*, apesar destas mesmas espécies serem positivamente correlacionadas ao TPC.

Variações na abundância de espécies, mesmo que pertencentes ao mesmo gênero, podem resultar em diferenças significativas nos conteúdos de ácidos e polifenóis durante o processo fermentativo (De Filippis et al. 2018). A dominância de *K. saccharivorans* está associada a concentrações de ácido glicônico e ácido glicurônico mais elevadas em comparação à dominância de *K. xylinus* no consórcio microbiano da kombucha; por outro lado, altos teores de polifenóis são relatados quando *K. xylinus* é a espécie dominante. O controle da relação entre essas espécies pode ser obtido controlando-se a temperatura de fermentação, uma vez que *K. xylinus* prevalece a 20 °C, enquanto *K. saccharivorans*, a 30 °C (De Filippis et al. 2018). Nesta temperatura já foi relatada maior diversidade microbiana na película celulósica do SCOBY, o que pode favorecer a metabolização e, conseqüentemente, a biotransformação de polifenóis pela atividade enzimática microbiana (Jayabalan et al. 2007).

Em geral, os teores de compostos bioativos analisados foram influenciados negativamente pela presença de diferentes grupos de espécies; para o TPC, as espécies acéticas *N. pomaceti*, *Acetobacter musti*, *Acetobacter fallax* e *Acetobacter oeni* parecem não contribuir para a biossíntese; enquanto que para TFC, as leveduras *P. membranifaciens*, *Candida californica* e *C. inconspícua* tem o mesmo efeito. Para a atividade antimicrobiana, correlações negativas foram encontradas apenas frente à inibição de *S. enterica*, e essas mesmas espécies de leveduras foram relacionadas à produção de compostos antioxidantes, tais como, *W. sorbophila*, *S. bombicola*, *S. bacillaris*, *S. lignohabitans*, *T. ciferrii*, *G. candidum*, e ainda *G. sacchari* e *A. aceti*.

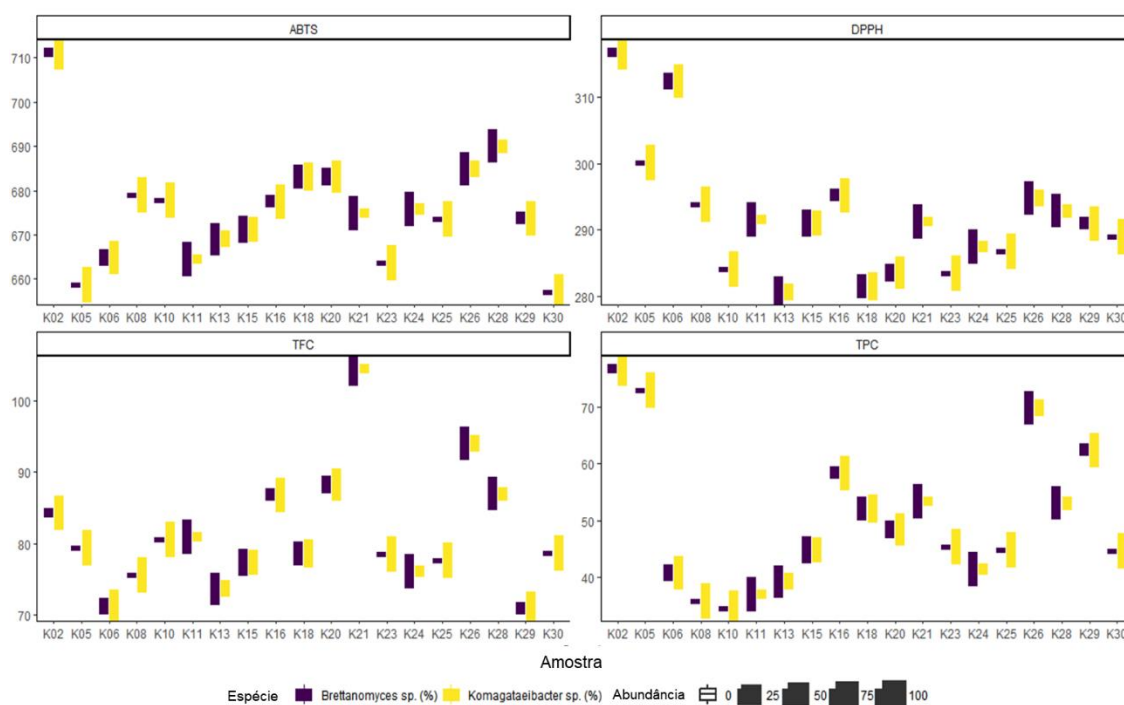
Para além das atividades supracitadas, o perfil biológico de chás obtidos com consórcios que possuem maior abundância relativa de *K. xylinus* nas fases sólida e líquida, bem como *S. pombe* na fase líquida, demonstraram maior atividade anti-inflamatória (de até 44,5%) em testes utilizando a enzima 15-lipoxigenase (15-LOX), bem como atividade antiproliferativa em células tumorais humanas (Villarreal-Soto et al. 2020). Segundo Malbaša et al. (2011), quanto mais filogeneticamente próximas são as espécies da microbiota da kombucha, menor a variação no perfil bioativo do chá, mesmo considerando-se inóculos de diferentes regiões geográficas. Isso ajuda, em parte, a elucidar o papel da dinâmica microbiana nas características funcionais da

kombucha, assim como um melhor controle da fermentação e da qualidade do produto final.

### 5.8 Relação entre *Komagataeibacter* sp. e *Brettanomyces* sp. e atividade antioxidante na kombucha

Dentre as populações mais abundantes, destacam-se *Komagataeibacter* spp. e *Brettanomyces* spp., como *K. diospyri*, *K. europaeus*, *K. intermedius*, *K. medellinensis*, *K. melaceti*, *K. nataicola*, *K. oboediens*, *K. rhaeticus*, *K. saccharivorans*, *Komagataeibacter* sp. FNDCR2, *Komagataeibacter* sp. FXV3, *K. swingsii*, *K. xylinus*, *B. bruxellensis*, *B. naardenensis* e *B. nanus*. Não foram observadas correlações bem definidas entre a proporção de *Komagataeibacter* sp. e *Brettanomyces* sp. e a atividade biológica das amostras analisadas, nem com a abundância relativa de cada espécie (Figura 25). Sugere-se, portanto, que, apesar de dominantes, algumas espécies com menor abundância relativa podem cumprir um papel relevante na manutenção do potencial bioativo da bebida, sendo imprescindíveis para o desenvolvimento das características funcionais características.

Figura 25. Relação entre os gêneros dominantes, *Komagataeibacter* sp. e *Brettanomyces* sp., e o perfil bioativos e antioxidantes da fermentação da kombucha.



A importância desses gêneros foi discutida anteriormente por Landis et al. (2022), que reconstruíram e modularam fermentações funcionais para o chá utilizando apenas *B. bruxellensis* e *K. rhaeticus* como cultura *starter*; além de serem capazes de produzir o biofilme celulósico, as co-culturas resultaram em baixos níveis de pH, revelando que essas espécies podem, mesmo na ausência dos demais táxons, desempenhar fermentação semelhante à observada para kombucha elaborada a partir de SCOBY. Esses dados podem auxiliar produtores comerciais da bebida a desenvolverem consórcios microbianos definidos para esse processo de fermentação.

A atividade da descarboxilase do ácido fenólico (PAD) em *B. bruxellensis*, enzima envolvida em uma das etapas da conversão de fenólicos ou ácidos hidroxicinâmicos (HCA) em fenóis voláteis relevantes para a qualidade sensorial de bebidas (Edlin et al., 1998; Harris et al., 2009), é fortemente influenciada por variações de pH e temperatura, com condições ótimas de 6 e 40 °C, respectivamente. Por outro lado, a presença de ácido p-cumárico como substrato no meio de crescimento aumenta sua atividade (Harris et al., 2009); cabe ressaltar, contudo, que estes valores são superiores aos geralmente utilizados nos processos fermentativos da bebida. Para além do *flavour*, os HCAs são considerados agentes antimicrobianos (Baranowski et al. 1980); sua produção em concentrações elevadas pode, portanto, resultar em efeitos positivos no controle de microrganismos competidores indesejáveis.

Apesar de não serem constituintes da microbiota *core*, elevadas abundâncias desses gêneros sugerem sua participação em redes metabólicas e produção de compostos que caracterizam a bebida, mas não são necessariamente indispensáveis para o processo fermentativo. Por exemplo, *Komagataeibacter* spp. são dominantes independentemente do substrato utilizado para a fermentação da kombucha (Anderson et al., 2023). Assim, esses gêneros também devem desempenhar papéis semelhantes aos relacionados à microbiota *core*.

## 5.9 Papel da composição de espécies exclusivas

Apenas as amostras K05, K06, K10, K16, K25 e K26 apresentaram espécies exclusivas em sua microbiota. Dentre elas, destaque para *Zygosaccharomyces* spp. e *Acetobacter* spp., com diferentes espécies nas amostras. A relação das

comunidades e as respectivas espécies exclusivas está apresentada na Tabela 11. Entre os gêneros mais comuns presentes em bebidas fermentadas, *Acetobacter* sp. é encontrado sobretudo em produtos com alto teor alcoólico, enquanto *Gluconobacter* spp. ocorrem em ambientes ricos em carboidratos (Raspor e Goranovic, 2008; Lynch et al., 2019). Em ambos, assim como para as demais BAA, observa-se um processo oxidativo por desidrogenases de membrana, considerado um “*overflow metabolism*” característico deste grupo. Este fenômeno é responsável pelo acúmulo de diversos subprodutos, incluindo ácidos orgânicos (Matsushita e Matsutani, 2016). Algumas espécies desses gêneros foram observadas exclusivamente em determinadas amostras, como K05 e K26.

Tabela 11. Espécies exclusivas identificadas nas amostras avaliadas.

Amostra	Espécies exclusivas
K05	<i>Acetobacter lovaniensis</i> , <i>Acetobacter vaccinii</i> , <i>Acetobacter lambici</i> , <i>Acetobacter orientalis</i> , <i>Acetobacter fabarum</i> , <i>Acetobacter garciniae</i> , <i>Acetobacter syzygii</i> , <i>Acetobacter conturbans</i> , <i>Gluconobacter azotocaptans</i>
K06	<i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Candida californica</i> , <i>Candida inconspicua</i> , <i>Pichia kluyveri</i> , <i>Lactobacillus</i> sp.
K10	<i>Acetobacter fallax</i> , <i>Acetobacter oeni</i> , <i>Acidomonas methanolica</i> , <i>Gluconobacter oxydans</i>
K16	<i>Microthyrium microscopicum</i> , <i>Yamadazyma tenuis</i> , <i>Schizosaccharomyces japonicus</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , <i>Galactomyces reessii</i> , <i>Ascobolus immersus</i> , <i>Protomyces lactucae-debilis</i> , <i>Candida intermedia</i>
K25	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> , <i>Zygosaccharomyces mellis</i> , <i>Zygosaccharomyces parabailii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Torulaspota globosa</i> , <i>Zygotorulaspota mrakii</i> , <i>Torulaspota delbrueckii</i> , <i>Torulaspota</i> sp. CBS 2947, <i>Lachancea fermentati</i> <i>Naumovozyma castellii</i> , <i>Vanderwaltozyma polyspora</i> , <i>Naumovozyma dairenensis</i> , <i>Nakaseomyces glabratus</i> , <i>Kazachstania africana</i> , <i>Zygosaccharomyces bisporus</i> , <i>Acetobacter pomorum</i> , <i>Tetrapispora blattae</i>

---

	<i>Kazachstania naganishii</i> , <i>Lachancea dasiensis</i>
K26	<i>Acetobacter senegalensis</i> , <i>Gluconobacter cerinus</i>

---

Dentre as principais espécies, *G. oxydans* foi identificado apenas em K10. Esta espécie tem sido associada a altos teores de ácido glicônico, cuja produção ocorre pela oxidação direta de D-glicose por duas glicose desidrogenases (GDHs), uma GDH citoplasmática dependente de NADP<sup>+</sup> e uma GDH dependente de pirroloquinolina quinona (PQQ) ligada à membrana; sabe-se, ainda, que esta última GDH possui rendimento 30 vezes maior que a GDH citosólica, cuja conversão ocorre principalmente no espaço periplasmático (Sainz et al. 2016). O ácido ascórbico (vitamina C) é produzido por estirpes de *Gluconobacter* sp., como *G. oxydans*, a partir da conversão oxidativa de D-sorbitol em L-sorbose através de duas enzimas ligadas à membrana, a glicerol desidrogenase dependente de PQQ e a sorbitol desidrogenase dependente de FAD<sup>+</sup> (Saichana et al. 2015). Esse metabólito (L-sorbose) está normalmente presente em níveis elevados na kombucha à base de chá preto (Kaewkod, Bovonsombut, e Tragoolpua, 2019).

*Pichia kluyveri* e *P. membranifaciens* foram identificadas apenas em K06. O papel de *P. kluyveri* na fermentação e produção do perfil aromático da kombucha foi analisado por Van Wyk et al. (2023). Os autores observaram acúmulo e produção mais rápida de ácido acético, além da biossíntese de ésteres de acetato, como acetato de isoamila e acetato de 2-fenetila, resultando em aumento significativo no sabor frutado da bebida; esses compostos são resultado da atividade de álcool acetiltransferases (Kiene et al., 2021). Além disso, foi relatado que *P. kluyveri* não foi capaz de crescer na ausência de monômeros de glicose e/ou frutose, necessitando da atividade invertásica de outras leveduras da microbiota; além disso, sua presença não impactou significativamente no teor de compostos fenólicos, apesar de afetar a concentração de ácido acético (Van Wyk et al., 2023).

*Pichia manshurica*, espécie filogeneticamente próxima de *P. membranifaciens* (97% de similaridade), é capaz de degradar ácido caféico pela ação da enzima termoestável cafeína desidrogenase, que possui, ainda, especificidade para teobromina e teofilina; por outro lado, íons metálicos inibiram a atividade da enzima, sobretudo Cu<sup>2+</sup> (Parvin et al., 2023); esse potencial pode impactar diretamente a

concentração desses compostos, e, conseqüentemente, nas propriedades funcionais da kombucha.

Características fisiológicas específicas permitem o crescimento de *Schizosaccharomyces* spp., como *Schizosaccharomyces pombe* e *Schizosaccharomyces japonicus*, encontradas apenas na amostra K16. *S. pombe* é altamente tolerante a ambientes com altas concentrações de etanol e ácidos orgânicos fracos como o ácido sórbico, inclusive em valores de pH reduzidos (Brysch-Herzberg et al., 2022). Além disso, essa espécie é capaz de utilizar o ácido málico como substrato (Delfini, Torreggiani e Ottina, 1983), impactando diretamente a concentração desse composto durante o processo fermentativo, bem como resultando em menores teores de ácidos voláteis e concentrações mais altas de açúcares residuais, o que confere menor acidez à bebida (He et al., 2021). Já para *S. japonicus*, destaca-se sua tolerância ao etanol (Brysch-Herzberg et al., 2022).

Curiosamente, *S. cerevisiae*, principal levedura utilizada na produção de bebidas fermentadas, foi observada apenas na amostra K25, e simultaneamente com outras diversas leveduras de ocorrência exclusiva. Segundo Yu et al. (2022) e Wang et al., (2022), o co-cultivo com *S. cerevisiae* e *S. pombe* aumentou o aroma frutado e floral atribuído à bebida produzida, assim como reduziu o sabor azedo e melhorou o gosto *umami*. Estes autores verificaram, ainda, a presença de ésteres, álcoois, terpenos, ácidos orgânicos, polifenóis e aminoácidos livres em concentrações significativas; dentre os compostos sintetizados, o acetato e etanol foram produzidos em vias relacionadas. Em consonância com estes resultados, Luo et al. (2023) avaliaram kombuchas produzidas a partir da co-fermentação de *S. cerevisiae* e *S. pombe*, resultando em maior pH, menor teor de ácido málico e altas concentrações de aminoácidos livres, refletindo positivamente na qualidade sensorial da bebida. Além disso, a presença de *S. pombe* beneficiou a fermentação alcoólica e aumentou a riqueza e diversidade de compostos voláteis relevantes, sobretudo compostos de aromas floral e frutado, como hexanoato de etila, caprilato de etila, enantato de etila, 1-heptanol e álcool feniletílico.

### 5.10 Eficiência na hidrólise da sacarose inicial e concentração de açúcar residual

Os açúcares residuais da fermentação foram quantificados nas diferentes amostras de kombucha (Tabela 12). Sacarose e xilose foram os açúcares majoritários em todas as amostras analisadas após 7 dias de fermentação (Figura 26). É esperado que a sacarose seja um dos principais açúcares da bebida fermentada, considerando-se que é utilizada na formulação da bebida; assim, resíduos não hidrolisados permanecem no produto. Comunidades microbianas distintas apresentam cinética de fermentação e sucessões metabólicas diferentes (Villarreal-Soto et al. 2020). Um maior consumo de açúcar e produção de etanol é atribuído a consórcios contendo *B. bruxellensis*, cujo consumo completo de açúcar já foi identificado em bebidas fermentadas durante 12 dias; além disso, a ocorrência de *S. pombe* garante uma melhor utilização da fonte de carbono, sem haver, no entanto, diferenças significativas nas concentrações de ácido acético dentre amostras.

Tabela 12. Quantificação de açúcares residuais (mM) em amostras de kombucha após 7 dias de fermentação

Amostra	Sacarose	Glicose	Frutose	Xilose	Arabinose
K02	584,99 ± 31	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	2003,26 ± 26,5	36,90 ± 1,9
K05	661,60 ± 2,2	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	1369,01 ± 4,0	37,30 ± 1,5
K06	722,06 ± 15,1 <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	1818,42 ± 8,2	73,20 ± 2,3
K08	559,16 ± 11,6	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	1530,94 ± 12,7	6,53 ± 0,0 <sup>a</sup>
K10	713,24 ± 5,0 <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	1277,63 ± 4,1	23,45 ± 0,9
K11	732,90 ± 10,6 <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	3029,24 ± 14,5	37,30 ± 1,6
K13	710,32 ± 28,6 <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	1555,78 ± 23,7	29,84 ± 1,7
K15	324,78 ± 12,4	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	1109,04 ± 16,8	ND <sup>a</sup>
K16	528,17 ± 5,5	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	1107,7 ± 4,67	48,56 ± 3,7
K18	496,24 ± 15,9	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	1370,81 ± 26,8	34,10 ± 3,0
K20	544,21 ± 1,7	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	1314,93 ± 4,7	20,18 ± 2,0
K21	527,93 ± 0,9	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	2291,55 ± 2,4	43,7 ± 3,06
K23	684,11 ± 12,0 <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	1433,69 ± 16,4	85,99 ± 3,4
K24	524,46 ± 7,4	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	952,57 ± 6,7	67,41 ± 1,6
K25	560,86 ± 4,6	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	1090,65 ± 7,3	75,00 ± 3,4
K26	493,78 ± 3,7	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	997,47 ± 8,0	66,68 ± 3,5
K28	631,67 ± 5,6	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	1338,97 ± 9,0	31,17 ± 3,3
K29	740,12 ± 0,9 <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	1866,05 ± 5,7	90,72 ± 1,0

Continua

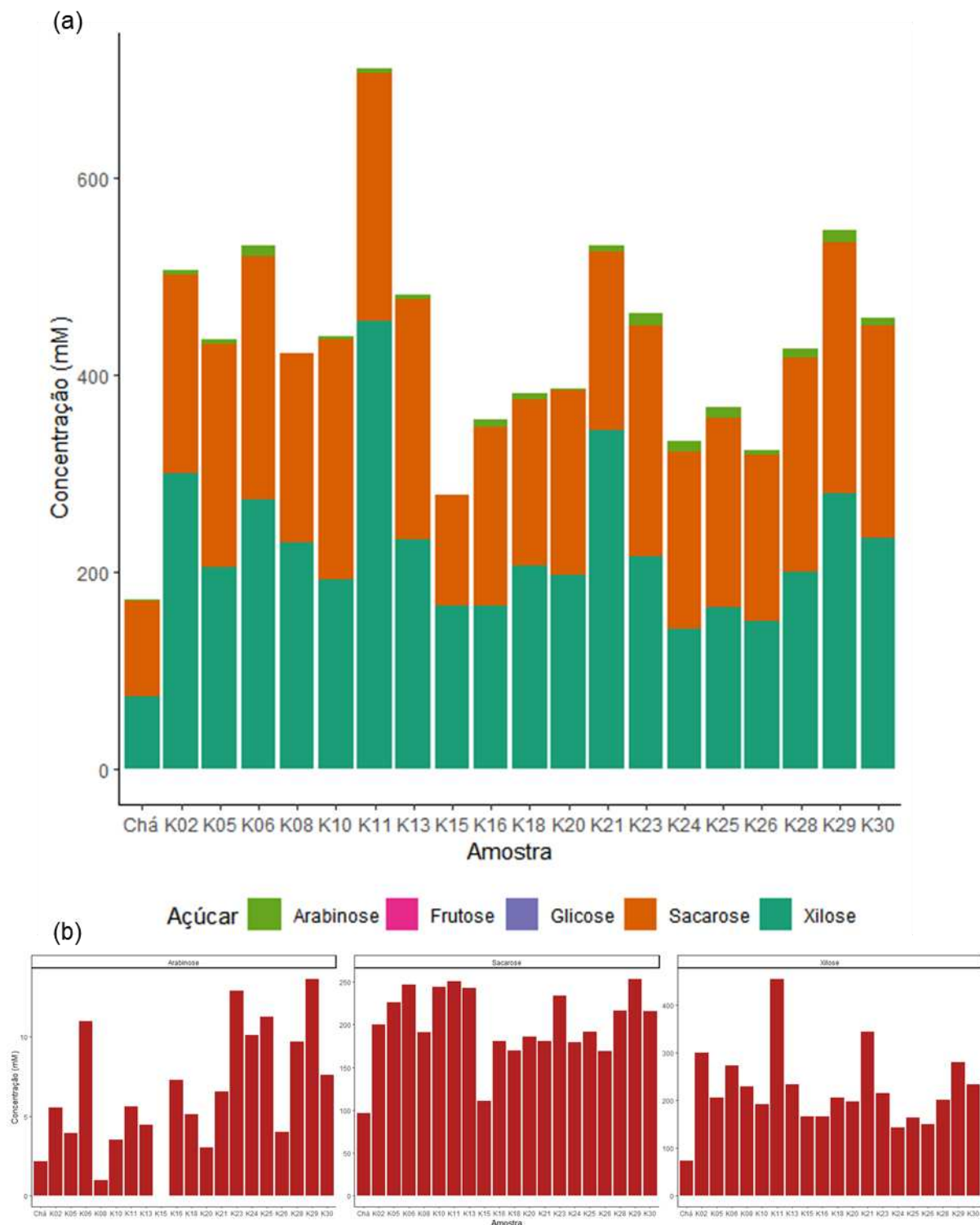
					Conclusão
K30	631,15 ± 0,8	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	1557,52 ± 3,0	30,51 ± 0,3
CNF	709,30 ± 0,4 <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	488,24 ± 11,4 <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de ensaios em triplicata. Os sobrescritos representam dados com similaridade significativa ( $p < 0,05$ ) com o CNF pelo teste de Tukey, em ANOVA um critério para cada coluna. CNF: Chá não fermentado. ND: Não detectado.

Glicose e frutose não foram detectadas nas amostras analisadas no presente estudo. A glicose é o principal açúcar utilizado na biossíntese de ácido glicurônico (Vina et al., 2013), e pode ter sido prontamente o substrato para produção desse ácido, uma vez que, todas as amostras apresentação altas concentrações.

Apesar das elevadas concentrações, principalmente em K11, xilose não foi utilizada como ingrediente. Esse monossacarídeo pode ser obtido a partir da hidrólise da xilana, um importante componente estrutural presente na parede celular de plantas (Biely, Singh e Puchart, 2016; Ye e Zhong, 2022), e/ou processos metabólicos que convertem o polissacarídeo em xilose livre por meio de enzimas específicas, como xilanases e arabinofuranosidases que clivam as ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas da estrutura heteropolimérica complexa em D -xilose e traços de L -arabinose (Bhardwaj, Kumar e Verma, 2019; Motta, Andrade e Santana, 2013).

Figura 26. Distribuição da concentração de açúcares residuais em amostras de kombucha após 7 dias de fermentação.



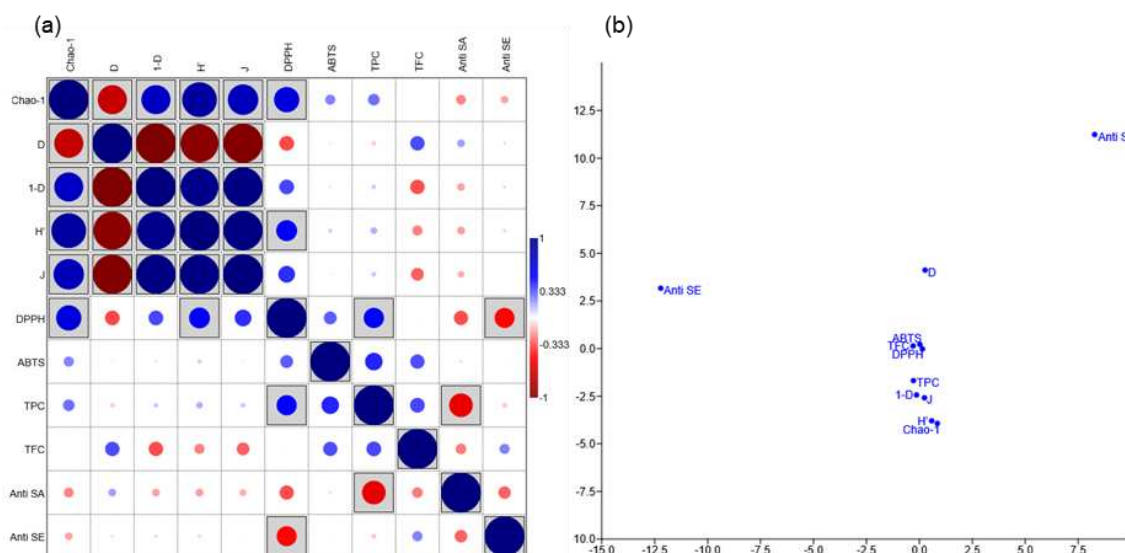
(a) Concentração total dos açúcares após fermentação. (b) Distribuição dos três principais açúcares residuais.

Os teores de açúcares residuais, tanto de xilose quanto de arabinose, podem ser derivados de atividades metabólicas no substrato utilizado para a produção do chá (*Camellia sinensis*), uma vez que, são constituintes abundantes (Gao et al., 2021). Importante destacar que alguns microrganismos, sobretudo leveduras, são capazes de converter xilose em produtos ou subprodutos de fermentação, como etanol, através da via das pentoses fosfato, onde a xilose é convertida em xilulose-5-fosfato, gerando produtos finais e intermediários, como por exemplo gliceraldeído-3-fosfato e ribulose-5-fosfato (Patiño et al., 2019; Ochoa-Chacón et al., 2021). Arabinose foi detectada na maioria das amostras avaliadas, entretanto, em pequenas concentrações. Em nenhuma das amostras foram detectadas glicose e frutose; dessa forma, é correto supor que todos estes monossacarídeos liberados pela hidrólise da sacarose adicionada tenham sido completamente metabolizados.

### **5.11 Influência da diversidade microbiana no perfil bioativo da bebida fermentada**

Existe uma correlação bem definida entre a composição e dinâmica da comunidade microbiana e a biossíntese de compostos com potencial bioativo (Villarreal-Soto et al., 2020; Branco, Diniz e Albergaria, 2022; Anderson et al., 2023; Duan et al., 2023; Van Wyk et al., 2023). No entanto, ainda são necessários estudos comparativos para melhor se compreender como variações na diversidade microbiana influenciam das propriedades benéficas da kombucha Kaashyap, Cohen e Mantri, (2021). Neste contexto, foi demonstrado que a diversidade da comunidade pode afetar diretamente no perfil bioativo na bebida fermentada (Figura 27).

Figura 27. Relação entre os índices e estimadores de diversidade microbiana e o perfil bioativo da bebida fermentada



Para as amostras avaliadas, apenas a atividade antioxidante (DPPH) foi significativamente influenciada pela diversidade ( $p < 0,005$ ) (índices de Chao-1 e Shannon H'). De forma geral, os ácidos orgânicos, dentre eles os que apresentam potencial antioxidante, são sintetizados por diferentes espécies de microrganismos, e a presença de variadas linhagens pode assegurar uma maior diversidade metabólica da microbiota fermentadora (Villarreal-Soto et al., 2020; Antolak, Piechota e Kucharska, 2021). Segundo Ju et al. (2022), a produção e o teor de compostos bioativos estão diretamente relacionados aos índices e estimadores de diversidade de uma comunidade microbiana, onde 1-D é correlacionado de forma positiva principalmente à biossíntese de alcaloides, antioxidantes relevantes (Sirin et al., 2023). Por outro lado, o aumento nos índices de Chao e H' resultou em efeito negativo na produção deste metabólito (Ju et al., 2022).

Ainda que em menor proporção, o potencial bioativo foi positivamente relacionado a diversidade microbiana, o aumento no índice de Simpson (1-D) e equitabilidade (J) com o DPPH, Chao-1 com ABTS e TPC, dominância (D) com TFC e Anti-SA. Negativamente, DPPH foi relacionado a D, TFC ao 1-D, H' e J, Anti-SA a todos os índices analisados, exceto com D. Para Mehta et al., (2016) e Shaaban, (2022), quanto maior o espectro de espécies, maiores as probabilidades de compostos bioativos e/ de interesse industrial serem produzidos em quantidades mais

elevadas; além disso, uma alta diversidade garante melhores interações entre as espécies componentes da microbiota da bebida (Mehta et al., 2016).

Apesar de relevante para a modulação das atividades biológicas, a presença de grupos ou linhagens específicas está mais intimamente relacionada à produção de metabólitos característicos (Gooch e Martirosyan, 2022; Zhang et al., 2023). Neste estudo, a atividade antimicrobiana, de forma geral, esteve menos relacionada aos índices e estimadores verificados. Considerando-se que este potencial está associado principalmente à presença de bactérias acéticas, espera-se que a presença e abundância desse grupo seja mais importante que uma riqueza geral. Diante dos dados apresentados, uma maior diversidade microbiana, sobretudo a nível de gênero, proporcionou maior variabilidade genética e metabólica, resultando em maiores chances de metabólitos com potencial biológico serem sintetizados, contribuindo, assim, para a elaboração de kombuchas com efeitos benéficos.

### **5.12 Microrganismos isolados de kombucha brasileiras**

O isolamento de microrganismos da fase líquida de kombucha brasileiras foi realizado após fermentação a 25 °C durante 3 e 7 dias; os resultados são mostrados na Tabela 13. Um total de 114 isolados foram obtidos, sendo 73 espécies de leveduras e 41 de bactérias. Apenas dois isolados, correspondentes a leveduras, não puderam ser classificados. De forma geral, as espécies encontradas têm sido descritas em fermentações de kombucha, sobretudo leveduras, principalmente dos gêneros *Brettanomyces*, *Pichia* e *Starmerella*, enquanto as bactérias se concentram em sua maioria no gênero *Komagataeibacter* sp.

Tabela 13. Anotação das sequências de bactérias e leveduras dos isolados da fase líquida de kombucha brasileiras após fermentação a 25 °C durante 3 e 7 dias.

Isolado	Identificação	Linhagem	Acesso	%
A6.3.1	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Brettanomyces bruxellensis CBS:5512	KY107615.1	97,04
A6.3.13	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Dekkera bruxellensis KBT161	HE964967.1	97,34
A6.3.15	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Brettanomyces bruxellensis CBS:5512	KY107615.1	99,05
A6.3.18	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Dekkera bruxellensis NCYC 3441	HF547277.1	98,52
A6.3.24	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Brettanomyces bruxellensis CBS:5512	KY107615.1	98,56
A6.3.25	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Brettanomyces bruxellensis CBS:5512	KY107615.1	98,58
A6.3.26	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Brettanomyces bruxellensis CBS:5512	KY107615.1	97,58
A6.3.27	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Brettanomyces bruxellensis CBS:5512	KY107615.1	97,69
A6.3.28	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Brettanomyces bruxellensis CBS:5512	KY107615.1	98,78
A6.3.29	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Dekkera bruxellensis KBT161	HE964967.1	97,83
Y2.7.2	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Brettanomyces bruxellensis CBS:5512	KY107615.1	98,56
Y2.7.4	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Brettanomyces bruxellensis CBS:5512	KY107615.1	98,21
Y2.7.8	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Brettanomyces bruxellensis YKR-3	MH930867.1	95,43
Y2.7.10	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Brettanomyces bruxellensis YKR-3	MH930867.1	97,34
Y2.7.12	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Brettanomyces bruxellensis CBS:5512	KY107615.1	98,11
Y2.7.14	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Brettanomyces bruxellensis CBS:5512	KY107615.1	96,09
Y2.7.15	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Brettanomyces bruxellensis CBS:5512	KY107615.1	95,82
Y2.7.16	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Brettanomyces bruxellensis CBS:5512	KY107615.1	99,39
Y2.7.5	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Brettanomyces bruxellensis CBS:5512	KY107615.1	98,34
Y2.7.21	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Dekkera bruxellensis NCYC 3441	HF547277.1	97,81
Y2.7.26	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Brettanomyces bruxellensis CBS:5512	KY107615.1	97,17
Y2.7.26(2)	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Brettanomyces bruxellensis CBS:5512	KY107615.1	98,10
A5.3.15	<i>Candida parapsilosis</i>	Candida parapsilosis CBS 604	MH545914.1	100
A5.3.12	<i>Candida parapsilosis</i>	Candida parapsilosis CBS 604	MH545914.1	99,84
A5.3.13	<i>Candida parapsilosis</i>	Candida parapsilosis CBS 604	MH545914.1	99,83

Continua

				Conclusão
A6.3.36	Não classificado	Não classificado	Não classificado	-
Y2.7.12(2)	Não classificado	Não classificado	Não classificado	-
A6.3.3	<i>Pichia kudriavzevii</i>	<i>Pichia kudriavzevii</i> CK6	MN710519.1	100
A6.3.8	<i>Pichia kudriavzevii</i>	<i>Pichia kudriavzevii</i> CK6	MN710519.1	99,57
Y6.7.28	<i>Pichia kudriavzevii</i>	<i>Pichia kudriavzevii</i> CK6	MN710519.1	98,23
Y6.7.28(2)	<i>Pichia kudriavzevii</i>	<i>Pichia kudriavzevii</i> CK6	MN710519.1	99,04
Y6.7.48	<i>Pichia kudriavzevii</i>	<i>Pichia kudriavzevii</i> CK6	MN710519.1	99,14
Y6.7.49	<i>Pichia kudriavzevii</i>	<i>Pichia kudriavzevii</i> CK6	MN710519.1	99,05
A6.3.2	<i>Pichia occidentalis</i>	<i>Pichia occidentalis</i> KOP7	KY849376.1	99,83
A6.3.5	<i>Pichia occidentalis</i>	<i>Pichia occidentalis</i> KOP7	KY849376.1	99,66
A6.3.6	<i>Pichia occidentalis</i>	<i>Pichia occidentalis</i> Vn251	MK332470.1	99,26
A6.3.9	<i>Pichia occidentalis</i>	<i>Pichia occidentalis</i> KOP7	KY849376.1	99,83
A6.3.10	<i>Pichia occidentalis</i>	<i>Pichia occidentalis</i> CBS:6890	KY108912.1	99,66
A6.3.19	<i>Pichia occidentalis</i>	<i>Pichia occidentalis</i> CBS:6890	KY108912.1	99,82
A6.3.22	<i>Pichia occidentalis</i>	<i>Pichia occidentalis</i> CBS:6890	KY108912.1	100
A6.3.30	<i>Pichia occidentalis</i>	<i>Pichia occidentalis</i> KOP7	KY849376.1	99,79
A6.3.35	<i>Pichia occidentalis</i>	<i>Pichia occidentalis</i> KOP7	KY849376.1	100
A6.3.16	<i>Pichia occidentalis</i>	<i>Pichia occidentalis</i> KOP7	KY849376.1	99,83
Y6.7.30	<i>Pichia occidentalis</i>	<i>Pichia occidentalis</i> VdF2-L107	MN904761.1	96,63
Y6.7.30(2)	<i>Pichia occidentalis</i>	<i>Pichia occidentalis</i> VdF2-L107	MN904761.1	99,60
Y6.7.36	<i>Pichia occidentalis</i>	<i>Pichia occidentalis</i> KOP7	KY849376.1	99,42
Y6.7.37	<i>Pichia occidentalis</i>	<i>Pichia occidentalis</i> KOP7	KY849376.1	98,71
Y6.7.38	<i>Pichia occidentalis</i>	<i>Pichia occidentalis</i> KOP7	KY849376.1	100
Y6.7.39	<i>Pichia occidentalis</i>	<i>Pichia occidentalis</i> KOP7	KY849376.1	99,28
Y6.7.40	<i>Pichia occidentalis</i>	<i>Pichia occidentalis</i> KOP7	KY849376.1	99,80
Y6.7.46	<i>Pichia occidentalis</i>	<i>Pichia occidentalis</i> KOP7	KY849376.1	99,80
Y6.7.47	<i>Pichia occidentalis</i>	<i>Pichia occidentalis</i> KOP7	KY849376.1	99,65
Y6.7.50	<i>Pichia occidentalis</i>	<i>Pichia occidentalis</i> Vn251	MK332470.1	99,42

Continua

				Conclusão
Y6.7.18	<i>Pichia occidentalis</i>	Pichia occidentalis KOP7	KY849376.1	99,83
Y6.7.14	<i>Pichia occidentalis</i>	Pichia occidentalis KOP7	KY849376.1	99,65
Y6.7.15	<i>Pichia occidentalis</i>	Pichia occidentalis KOP7	KY849376.1	99,32
Y6.7.16	<i>Pichia occidentalis</i>	Pichia occidentalis KOP7	KY849376.1	100
Y6.7.19	<i>Pichia occidentalis</i>	Pichia occidentalis KOP7	KY849376.1	99,49
Y6.7.26	<i>Pichia occidentalis</i>	Pichia occidentalis KOP7	KY849376.1	99,83
A6.3.12	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Rhodotorula mucilaginosa MCZ46	MT001281.1	99,83
A6.3.4	<i>Starmerella davenportii</i>	Starmerella davenportii TISTR 6041	OR064128.1	100
A6.3.7	<i>Starmerella davenportii</i>	Starmerella davenportii CBS:10294	KY106408.1	99,22
A6.3.11	<i>Starmerella davenportii</i>	Starmerella davenportii CBS:10294	KY106408.1	99,42
A6.3.23	<i>Starmerella davenportii</i>	Starmerella davenportii CBS:10294	KY106408.1	99,42
A6.3.31	<i>Starmerella davenportii</i>	Starmerella davenportii CBS:10294	KY106408.1	99,58
Y6.7.6	<i>Starmerella davenportii</i>	Starmerella davenportii TISTR 6041	OR064128.1	99,80
Y6.7.5	<i>Starmerella davenportii</i>	Starmerella davenportii CBS:10294	KY106408.1	99,61
Y6.7.45	<i>Starmerella davenportii</i>	Starmerella davenportii CBS:10294	KY106408.1	99,04
Y23.7.25	<i>Starmerella davenportii</i>	Starmerella davenportii CBS:10294	KY106408.1	99,61
Y23.7.21	<i>Starmerella davenportii</i>	Starmerella davenportii CBS:10294	KY106408.1	99,42
Y16.7.17	<i>Starmerella davenportii</i>	Starmerella davenportii CBS:10294	KY106408.1	99,61
Y16.7.18	<i>Starmerella davenportii</i>	Starmerella davenportii CBS:10294	KY106408.1	99,61
Y23.7.18	<i>Starmerella davenportii</i>	Starmerella davenportii CBS:10294	KY106408.1	99,42
L2.3.2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Bacillus amyloliquefaciens AS-97s93	OR899842.1	99,80
L2.3.1	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacillus subtilis IICE-7	MK367805.1	99,80
L8.3.2	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacillus subtilis XeM5	MW559261.1	98,03
L8.7.1	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacillus subtilis KBP.AS.133	MF927552.1	98,70
Y16.7.3	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>	Brachybacterium paraconglomeratum RS026-2	OP379311.1	99,50
Y16.7.3(2)	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>	Brachybacterium paraconglomeratum RS026-2	MK993466.1	99,69
Y16.7.13	<i>Brevibacterium antarcticum</i>	Brevibacterium antarcticum HL37	KU904406.1	98,80
Y16.7.13(2)	<i>Brevibacterium antarcticum</i>	Brevibacterium antarcticum HL37	KU904406.1	98,69

Continua

				Conclusão
Y16.7.13(3)	<i>Brevibacterium antarcticum</i>	Brevibacterium antarcticum HL37	KU904406.1	98,39
Y16.7.2	<i>Brevibacterium linens</i>	Brevibacterium linens 1MF	DQ361016.1	98,80
A2.7.12	<i>Brevibacterium ravensturgense</i>	Brevibacterium ravensturgense 5401308	NR_116479.1	99,90
A23.7.1	<i>Heyndrickxia coagulans</i>	Heyndrickxia coagulans 1-1	MT525228.1	98,12
A2.7.20	<i>Komagataeibacter europaeus</i>	Komagataeibacter europaeus HWW133	MH424888.1	98,89
A2.7.8	<i>Komagataeibacter intermedius</i>	Komagataeibacter intermedius ENS 15a	MT094082.1	99,90
A2.7.10	<i>Komagataeibacter intermedius</i>	Komagataeibacter intermedius ENS 15a	MT094082.1	100
A5.7.1	<i>Komagataeibacter rhaeticus</i>	Komagataeibacter rhaeticus ENS 9a1a	CP050139.1	99,89
A18.3.41	<i>Komagataeibacter saccharivorans</i>	Komagataeibacter saccharivorans JH1	CP036404.1	99,89
A18.3.35	<i>Komagataeibacter saccharivorans</i>	Komagataeibacter saccharivorans JH1	CP036404.1	99,89
A18.3.14	<i>Komagataeibacter saccharivorans</i>	Komagataeibacter saccharivorans JH1	CP036404.1	99,79
A18.3.12	<i>Komagataeibacter saccharivorans</i>	Komagataeibacter saccharivorans JH1	CP036404.1	99,89
A18.3.11	<i>Komagataeibacter saccharivorans</i>	Komagataeibacter saccharivorans JH1	CP036404.1	99,89
A18.3.10	<i>Komagataeibacter saccharivorans</i>	Komagataeibacter saccharivorans JH1	CP036404.1	99,90
A18.3.3	<i>Komagataeibacter saccharivorans</i>	Komagataeibacter saccharivorans JH1	CP036404.1	99,90
A2.3.1	<i>Komagataeibacter xylinus</i>	Komagataeibacter xylinus CGMCC 17276	CP041348.1	98,53
A2.3.5	<i>Komagataeibacter xylinus</i>	Komagataeibacter xylinus CGMCC 17276	CP041348.1	100
A2.3.6	<i>Komagataeibacter xylinus</i>	Komagataeibacter xylinus CGMCC 17276	CP041348.1	100
A2.7.22	<i>Komagataeibacter xylinus</i>	Komagataeibacter xylinus B2-1	MK714036.1	100
A18.3.13	<i>Moraxella osloensis</i>	Moraxella osloensis 1910ICU268	MT225644.1	99,39
A8.7.6	<i>Moraxella osloensis</i>	Moraxella osloensis PK1-22.2	MN428159.1	99,70
A18.3.33	<i>Novacetimonas hansenii</i>	Novacetimonas hansenii BYF-04-3	OQ457664.1	100
A2.7.6	<i>Paenibacillus provencensis</i>	Paenibacillus provencensis C3L11B	OP935862.1	98,82
A8.7.2	<i>Sphingomonas molluscorum</i>	Sphingomonas molluscorum EP2	MG778708.1	99,15
A8.7.5	<i>Staphylococcus capitis</i>	Staphylococcus capitis FDAARGOS_753	CP053957.1	99,90
A8.7.7	<i>Staphylococcus capitis</i>	Staphylococcus capitis L78	MT415700.1	95,98
A16.3.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Staphylococcus epidermidis TMPC 10534	OL798040.1	99,41
A6.3.17	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Staphylococcus epidermidis TMPC 10534	OL798040.1	99,41

Continua

				Conclusão
A8.7.3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Staphylococcus epidermidis MKH24	OR186655.1	97,66
L8.3.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Staphylococcus epidermidis 061612A-3	OR648343.1	99,90
Y2.7.18(2)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Staphylococcus epidermidis TMPC 10534	OL798040.1	99,90
Y2.7.18	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	Staphylococcus lugdunensis 509	MT573106.1	99,61
A2.7.1	<i>Staphylococcus warneri</i>	Staphylococcus warneri WB224	CP053477.1	99,51

?: Porcentagem de similaridade

*Pichia* foi o principal gênero de leveduras isolado (n = 32), com destaque para as espécies *P. kudriavzevii* (n = 6) e *P. occidentalis* (n = 26), isolados tanto após o 3º, quanto o 7º dia de fermentação (todos da amostra K06); estas foram similares às linhagens *P. kudriavzevii* CK6 (99-100 %) e *P. occidentalis* KOP7 (98 – 100%). *Pichia kudriavzevii* é uma levedura amplamente distribuída em ambientes e ocorre frequentemente em bebidas tradicionalmente fermentados em diferentes partes do mundo (Chu et al., 2023), apresentando alta tolerância a condições de baixo pH, etanol e estresse hiperosmótico, condições importantes para aplicações industriais (Mukherjee et al., 2017). Esta espécie já foi descrita, inclusive, como comercialmente promissora para produção de ácido succínico (Li et al., 2021a). Segundo Li et al. (2021b), a co-fermentação de *P. kudriavzevii* e BAL resultam em bebidas fermentadas com maiores concentrações dos ácidos glicônico e láctico, além de estimular o potencial antioxidante.

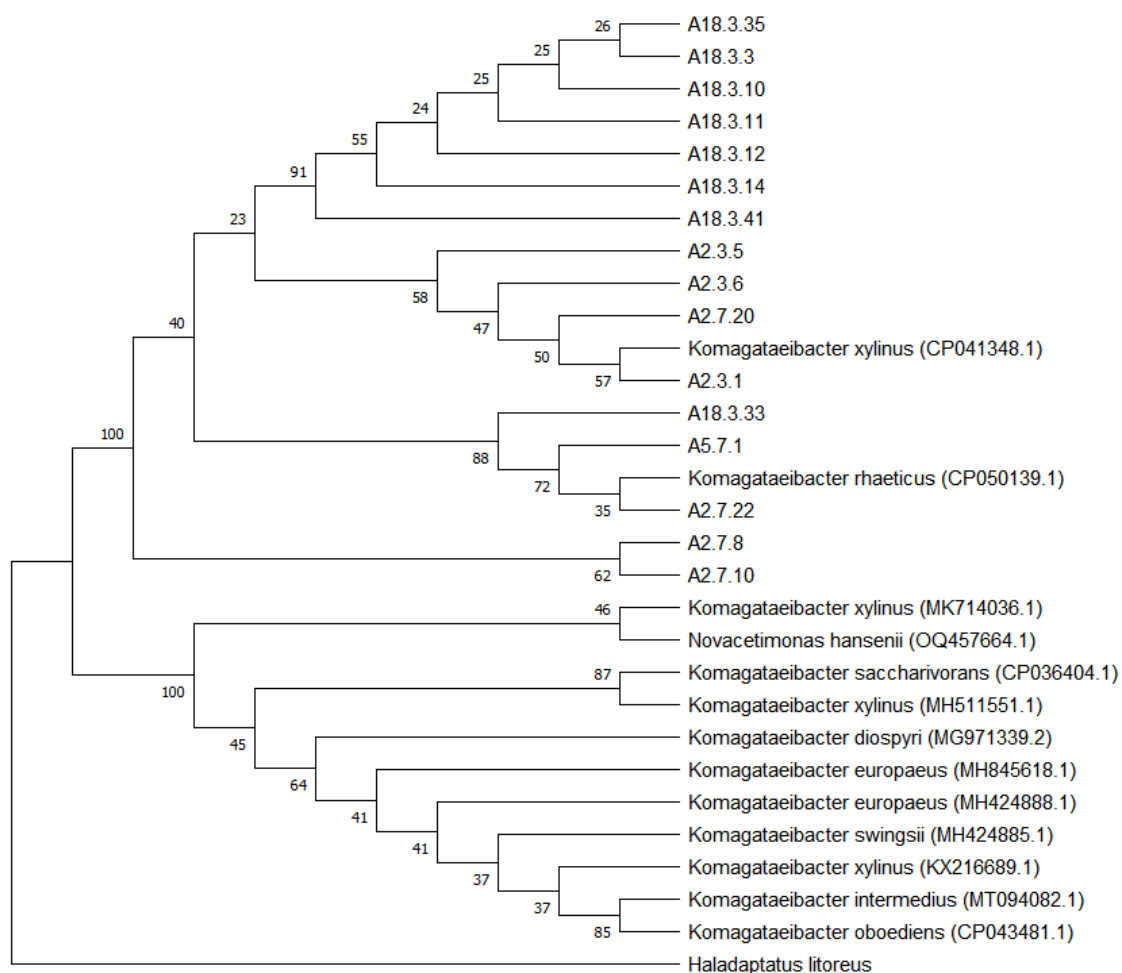
O segundo gênero mais comum foi *Brettanomyces*, com destaque para *B. bruxellensis* (n = 20), isolados exclusivamente nas amostras K06 (3º dia) e K02 (7º dia), ambas similares a *B. bruxellensis* CBS (97-99 %). Esta espécie tem sido frequentemente descrita e isolada em fermentações de kombucha (Suhre et al., 2021) e compõe um grupo de espécies de leveduras produtoras de ácido, sendo, portanto, adaptadas a um ambiente com baixo pH, podendo, inclusive, produzir ácido acético e ésteres de ácido acético, os quais contribuem para o sabor da bebida (Teoh, Heard e Cox, 2004). Ademais, a capacidade da levedura em metabolizar uma variedade de fontes de carbono e nitrogênio contribui para sua colonização em ambientes já fermentados que possuem baixo teor de nutrientes disponíveis (Harrouard et al., 2023).

*Starmerella* sp. também foi um isolado frequente, com destaque para a espécie *Starmerella davenportii* (n = 11). Além disso, foram encontradas linhagens de *Candida parapsilosis* e *R. mucilaginosa*. *Starmerella davenportii* foi isolada nas amostras K06 no 3º e 7º dia, e em K16 e K23, ambos no 7º dia; tais linhagens foram similares a *S. davenportii* CBS 10294. Segundo Tu et al. (2020), essa espécie tem capacidade de fermentar diversos açúcares, preferencialmente frutose, sendo capaz de crescer em ambientes com até 60% do açúcar e condições de baixíssimo pH (1,5). Os referidos autores destacam, ainda, a biossíntese de ácidos orgânicos, como o ácido pirúvico,  $\alpha$ -cetoglutarico, succínico e oxálico durante todo o processo produção

de kombucha em chá preto, além de atividades antioxidantes e antimicrobianas significativas.

Para as bactérias, foram isoladas espécies do gênero *Komagataeibacter* ( $n = 15$ ), com *K. europaeus* ( $n = 1$ ), *K. intermedius* ( $n = 2$ ), *K. rhaeticus* ( $n = 1$ ), *K. saccharivorans* ( $n = 7$ ) e *K. xylinus* ( $n = 4$ ), bem como de *Novacetimonas hansenii*. Essas sequências foram semelhantes principalmente a *K. saccharivorans* JH1 (> 99 %). Todos os isolados foram filogeneticamente identificados, baseados em inserções e deleções de bases, mostrando-se mais próximos a linhagens de *K. rhaeticus* e *K. xylinus* quando comparadas a estirpes de bactérias acéticas (Figura 28). Além disso, foram obtidos isolados de bactérias não acéticas.

Figura 28 Árvore filogenética baseada na sequência 26S rDNA dos isolados e sequências padrões de espécies de bactérias do ácido acético frequentemente isoladas em kombucha.



*Komagataeibacter* sp. foi o gênero predominante também nas análises metagenômicas independentes de cultivo, já descritas anteriormente nesse estudo. De forma geral, todas as espécies do gênero são capazes de oxidar parcialmente de forma eficiente o etanol em ácido acético (Matsushita et al., 2016), o que favorece a produção de bebidas fermentadas devido à síntese de ácidos orgânicos típicos do processo, além de reduzido teor alcóolico. As espécies aqui discutidas apresentam potencial de aplicação industrial, tanto no setor de alimentos quanto de compostos de interesse para o mercado. Mais estudos são necessários, contudo, para se caracterizar fisiologicamente cada uma dessas estirpes, a fim de elucidar potenciais usos e principais gargalos de produção.

## 6. CONCLUSÕES

A composição heterogênea e alta diversidade microbiana foi observada pela primeira vez na fermentação de kombuchas produzidas em diferentes regiões brasileiras, em condições de fermentação padronizadas. Além disso, revelaram-se seus respectivos perfis de compostos bioativos e atividades biológicas (antioxidante e antimicrobiana). O potencial antioxidante mostrou-se variável, com melhores atividades identificadas principalmente após o 7º dia de fermentação. Por outro lado, a atividade antimicrobiana foi favorecida em fermentações mais prolongadas.

Foi observada uma comunidade bacteriana bem estabelecida de BAA, sobretudo de membros da família Acetobacteriaceae, composta principalmente por *Komagaeibacter* spp. Para leveduras, *B. bruxellensis* foi considerada como parte de uma microbiota predominante. A composição da comunidade microbiana dentre as regiões estudadas diferiu significativamente, bem como dentre as amostras de uma mesma região. Os resultados aqui demonstrados podem contribuir para uma melhor compreensão acerca da composição do microbioma, revelando novos *insights* sobre o papel da dinâmica populacional na qualidade da kombucha, bem como para a biossíntese de compostos relacionados aos benefícios do consumo da bebida.

Além disso, verificou-se a presença de diversos ácidos orgânicos resultantes da fermentação ou intermediários de reações metabólicas, com destaque para os ácidos acético, glirurônico e succínico, bem como compostos fenólicos, como ácido fólico. Apesar de não terem sido observadas relações diretas entre a proporção dos grupos majoritários e o perfil bioativo da bebida, maior número de espécies de leveduras foi associado às atividades biológicas, sobretudo ao potencial antioxidante. Foram observadas correlações positivas tanto entre espécies de leveduras entre si, quanto com diferentes espécies de bactérias, assim como interações não simbióticas em ambos os grupos. As redes de interações puderam ser agrupadas em cinco módulos distintos, tendo *K. oboediens* como principal conectivo entre eles.

Por fim, as interações ecológicas entre os microrganismos que compõem a comunidade afetaram diretamente no perfil de compostos bioativos e ácidos orgânicos da kombucha. As espécies mais abundantes, *K. saccharivorans* e *B. bruxellensis*, apresentaram correlações diretas com diversos microrganismos que favorecem o potencial bioativo da bebida, tais como *Komagataeibacter* spp., *W. sorbophila* e *P. pentosaceus*. A presença de *A. senegalensis* estimulou a produção de compostos

fenólicos (TPC) e flavonoides totais (TFC). Os resultados aqui apresentados demonstram o papel de diversos microrganismos na biossíntese de compostos bioativos e atividade biológica durante a fermentação da kombucha, que podem auxiliar na modulação de culturas sintéticas como *starter* para produção da bebida.

## REFERÊNCIAS

- ABACI, Nurten; DENIZ, Fatma Sezer Senol; ORHAN, Ilkay Erdogan. Kombucha—An ancient fermented beverage with desired bioactivities: A narrowed review. **Food chemistry: X**, v. 14, p. 100302, 2022.
- ABBOTT, D. A.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Growth rates of Dekkera/Brettanomyces yeasts hinder their ability to compete with Saccharomyces cerevisiae in batch corn mash fermentations. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 66, p. 641-647, 2005.
- ADEBAYO-TAYO, Bukola Christianah; OLOMITUTU, Francis Oluwabunmi; ADEBAMI, Gboyega Ebenezer. Production and evaluation of probioticated mango juice using Pediococcus pentosaceus and Pediococcus acidilactici during storage at different temperature. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 6, p. 100202, 2021.
- AHMED, R. F., HIKAL, M. S., ABOU-TALEB, K. A. Biological, chemical and antioxidant activities of different types Kombucha. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 65, n. 1, p. 35-41, 2020.
- AKARCA, Gökhan. Determination of potential antimicrobial activities of some local berries fruits in kombucha tea production. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 64, p. e21210023, 2022.
- AKRAM, Muhammad. Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 68, n. 3, p. 475-478, 2014.
- ALIPIEVA, K., KORKINA, L., ORHAN, I. E., GEORGIEV, M.I. Verbascoside—A review of its occurrence, (bio) synthesis and pharmacological significance. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 6, p. 1065-1076, 2014.
- AL-MOHAMMADI, Abdul-Raouf et al. Chemical constitution and antimicrobial activity of kombucha fermented beverage. **Molecules**, v. 26, n. 16, p. 5026, 2021.
- AMARASINGHE, Hashani; WEERAKKODY, Nimsha S.; WAISUNDARA, Viduranga Y. Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha “Tea Fungus” during extended periods of fermentation. **Food science & nutrition**, v. 6, n. 3, p. 659-665, 2018.
- ANDERSON, Robert F. et al. Green tea catechins partially protect DNA from ·OH radical-induced strand breaks and base damage through fast chemical repair of DNA radicals. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 8, p. 1189-1193, 2001.
- ANDRESON, Maret et al. Characterisation of chemical, microbial and sensory profiles of commercial kombuchas. **International Journal of Food Microbiology**, v. 373, p. 109715, 2022.
- ANSARI, Fereshteh et al. Health-promoting properties of Saccharomyces cerevisiae var. boulardii as a probiotic; characteristics, isolation, and applications in dairy

products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 63, n. 4, p. 457-485, 2023.

ANTOLAK, H., PIECHOTA, D., KUCHARSKA, A. Kombucha tea—A double power of bioactive compounds from tea and symbiotic culture of bacteria and yeasts (SCOBY). **Antioxidants**, v. 10, n. 10, p. 1541, 2021.

ANTONE, Unigunde et al. Propionic acid fermentation—study of substrates, strains, and antimicrobial properties. **Fermentation**, v. 9, n. 1, p. 26, 2022.

ARIKAN, M.; MITCHELL, A. L.; FINN, R. D.; GÜREL, F. Microbial composition of Kombucha determined using amplicon sequencing and shotgun metagenomics. **Journal of food science**, v. 85, n. 2, p. 455-464, 2020. doi: 10.1111/1750-3841.14992.

AYED, L., ABID, S. B., HAMDİ, M. Development of a beverage from red grape juice fermented with the Kombucha consortium. **Annals of microbiology**, v. 67, n. 1, p. 111-121, 2017.

BADHANI, B., SHARMA, N., KAKKAR, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **Rsc Advances**, v. 5, n. 35, p. 27540-27557, 2015.

BARANOWSKI, J. D. et al. Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* by naturally occurring hydroxycinnamates. **Journal of Food Science**, v. 45, n. 3, p. 592-594, 1980.

BARBOSA, C. D., BAQUETA, M. R., SANTOS, W. C. R., GOMES, D., ALVARENGA, V. O., TEIXEIRA, P., LACERDA, I. C. Data fusion of UPLC data, NIR spectra and physicochemical parameters with chemometrics as an alternative to evaluating kombucha fermentation. **LWT**, v. 133, p. 109875, 2020.

BARBOSA, Cosme Damião et al. Evaluation of antibacterial activity of black and green tea kombucha. **Scientia Plena**, v. 18, n. 9, 2022.

BARRY, Michael J. et al. Folic acid supplementation to prevent neural tube defects: US Preventive Services Task Force reaffirmation recommendation statement. **Jama**, v. 330, n. 5, p. 454-459, 2023.

BARTON, W., COTTER, P. D. Fermented-food metagenomics reveals substrate-associated differences in taxonomy and health-associated and antibiotic resistance determinants. **MSystems**, v. 5, n. 6, p. e00522-20, 2020.

BASCHALI, A., TSAKALIDOU, E., KYRIACOU, A., KARAVASILOGLOU, N., MATALAS, A. L. Traditional low-alcoholic and non-alcoholic fermented beverages consumed in European countries: A neglected food group. **Nutrition Research Reviews**, v. 30, n. 1, p. 1-24, 2017.

BATISTA, Patrícia et al. Kombucha: perceptions and future prospects. **Foods**, v. 11, n. 13, p. 1977, 2022.

BATTIKH, H., CHAIEB, K., BAKHROUF, A., AMMAR, E. Antibacterial and antifungal activities of black and green kombucha teas. **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, n. 2, p. 231-236, 2013.

BELLASSOUED, Khaled et al. Protective effect of kombucha on rats fed a hypercholesterolemic diet is mediated by its antioxidant activity. **Pharmaceutical biology**, v. 53, n. 11, p. 1699-1709, 2015.

BELLUT, Konstantin et al. Application of non-Saccharomyces yeasts isolated from kombucha in the production of alcohol-free beer. **Fermentation**, v. 4, n. 3, p. 66, 2018.

BHARDWAJ, Nisha; KUMAR, Bikash; VERMA, Pradeep. A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 6, n. 1, p. 1-36, 2019.

BHATTACHARYA, D. et al. Antibacterial activity of polyphenolic fraction of Kombucha against *Vibrio cholerae*: Targeting cell membrane. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 145-152, 2018.

BIELY, Peter; SINGH, Suren; PUCHART, Vladimír. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: state of the art. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p. 1260-1274, 2016.

BLOMQVIST, Johanna et al. Physiological requirements for growth and competitiveness of *Dekkera bruxellensis* under oxygen-limited or anaerobic conditions. **Yeast**, v. 29, n. 7, p. 265-274, 2012.

BORTOLOMEDI, Bruna Milena; PAGLARINI, Camila Souza; BROD, Fábio Cristiano Angonesi. Bioactive compounds in kombucha: A review of substrate effect and fermentation conditions. **Food Chemistry**, v. 385, p. 132719, 2022.

BRANCO, Patrícia; DINIZ, Mário; ALBERGARIA, Helena. Evaluation of the biocontrol potential of a commercial yeast starter against fuel-ethanol fermentation contaminants. **Fermentation**, v. 8, n. 5, p. 233, 2022.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. MAPA, Instrução Normativa Nº 41, de 17 de Setembro de 2019. 2019. Disponível em: <https://abkom.org.br/wp-content/uploads/2021/05/INSTRUCAO-NORMATIVA-No-41-DE-17-DE-SETEMBRO-DE-2019-INSTRUCAO-NORMATIVA-No-41-DE-17-DE-SETEMBRO-DE-2019-DOU-Imprensa-Nacional.pdf>. Acesso em 29 Jan 2024.

BRYSCH-HERZBERG, Michael et al. Insights into the ecology of *Schizosaccharomyces* species in natural and artificial habitats. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 115, n. 5, p. 661-695, 2022.

CARDOSO, Rodrigo Rezende et al. Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. **Food research international**, v. 128, p. 108782, 2020.

CARDOSO, Silvana Ballmann et al. Avaliação física, química e antimicrobiana da Kombucha Probiótico (*Medusomyces gisevii* lindau) e análise comparativa com outros probióticos comercializados no Brasil. **Nutrição Brasil**, v. 17, n. 1, p. 2-8, 2018.

CASARIN, Anna Luisa Ferro; RASERA, Gabriela Boscarol; DE CASTRO, Ruann Janser Soares. Combined biotransformation processes affect the antioxidant, antidiabetic and protease inhibitory properties of lentils. **Process Biochemistry**, v. 102, p. 250-260, 2021.

CAVALCANTI, Iracema FA. **Tempo e clima no Brasil**. Oficina de textos, 2016.

ÇELIK DOĞAN, Cansu et al. Detection of the Microbial Composition of Some Commercial Fermented Liquid Products via Metagenomic Analysis. **Foods**, v. 12, n. 19, p. 3538, 2023.

CHAKRAVORTY, S., BHATTACHARYA, S., CHATZINOTAS, A., CHAKRABORTY, W., BHATTACHARYA, D., GACHHUI, R. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. **International journal of food microbiology**, v. 220, p. 63-72, 2016.

CHANG, Alan L. et al. Phosphodiesterase A1, a regulator of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*, is a heme-based sensor. **Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 3420-3426, 2001.

CHU, S. C., CHEN, C. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. **Food Chemistry**, v. 98, n. 3, p. 502-507, 2006.

CHU, Yunfei et al. Advances in the application of the non-conventional yeast *Pichia kudriavzevii* in food and biotechnology industries. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 2, p. 170, 2023.

CIANI, Maurizio et al. Footprint of nonconventional yeasts and their contribution in alcoholic fermentations. In: **Biotechnological progress and beverage consumption**. Academic Press, 2020. p. 435-465.

COELHO, R. M. D., DE ALMEIDA, A. L., DO AMARAL, R. Q. G., DA MOTA, R. N., DE SOUSA, P. H. M. Kombucha: Review. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 22, p. 100272, 2020.

COLEMAN, S. T.; FANG, T. K.; ROVINSKY, S. A.; TURANO, F. J.; MOYE-ROWLEY, W. S. Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 1, p. 244–250. 2001. doi: 10.1074/jbc.M007103200.

COTON, M. et al. Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 5, 2017.

DANG, T. D. T., VERMEULEN, A., RAGAERT, P., DEVLIEGHERE, F. A peculiar stimulatory effect of acetic and lactic acid on growth and fermentative metabolism of *Zygosaccharomyces bailii*. **Food Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 320-327, 2009.

DARTORA, Bruna et al. Understanding the effect of fermentation time on physicochemical characteristics, sensory attributes, and volatile compounds in green tea kombucha. **Food Research International**, v. 174, p. 113569, 2023

DE FILIPPIS, F., TROISE, A. D., VITAGLIONE, P., ERCOLINI, D. Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. **Food microbiology**, v. 73, p. 11-16, 2018.

DE MIRANDA, Jeniffer Ferreira et al. Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. **Journal of Food Science**, v. 87, n. 2, p. 503-527, 2022.

DE NORONHA, Marcel Cardoso et al. Black tea kombucha: Physicochemical, microbiological and comprehensive phenolic profile changes during fermentation, and antimalarial activity. **Food Chemistry**, v. 384, p. 132515, 2022.

DELFINI, C.; TORREGGIANI, M. R.; OTTINA, R. Fermentazioni maloalcoliche spontanee di *Schizosaccharomyces* nei mosti di uva a maturazione precoce del Nord Italia. **Vignevini**, v. 10, 1983.

DERIBEW, F.; ENDALE, M.; MELAKU, Y. Antibacterial and antioxidant phenylpropanoid derivative from the leaves of plantago lanceolate. **Nat Prod Chem Res**, v. 6, n. 315, p. 2, 2018.

DIMIDI, Eirini et al. Fermented foods: definitions and characteristics, impact on the gut microbiota and effects on gastrointestinal health and disease. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1806, 2019.

DO, Diem T. Hoang; THERON, Chrispian W.; FICKERS, Patrick. Organic wastes as feedstocks for non-conventional yeast-based bioprocesses. **Microorganisms**, v. 7, n. 8, p. 229, 2019.

DUAN, Wenhui et al. Improving flavor, bioactivity, and changing metabolic profiles of goji juice by selected lactic acid bacteria fermentation. **Food Chemistry**, v. 408, p. 135155, 2023.

DUEÑAS, M.; HERNÁNDEZ, T.; ESTRELLA, I. J. F. C. Changes in the content of bioactive polyphenolic compounds of lentils by the action of exogenous enzymes. Effect on their antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 90-97, 2007.

EDLIN, Duncan AN et al. Purification and characterization of hydroxycinnamate decarboxylase from *Brettanomyces anomalus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 4, p. 232-239, 1998.

ERSKINE, Ezgi et al. Effects of fermentation process on the antioxidant capacity of fruit byproducts. **ACS omega**, v. 8, n. 5, p. 4543-4553, 2023.

FABRICIO, Mariana Fensterseifer et al. Effect of freeze-dried kombucha culture on microbial composition and assessment of metabolic dynamics during fermentation. **Food Microbiology**, v. 101, p. 103889, 2022.

FICKERS, Patrick et al. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. **FEMS yeast research**, v. 5, n. 6-7, p. 527-543, 2005.

FIJAN, Sabina et al. Efficacy of using probiotics with antagonistic activity against pathogens of wound infections: an integrative review of literature. **BioMed research international**, v. 2019, 2019.

FRAUD, S. et al. Aromatic alcohols and their effect on Gram-negative bacteria, cocci and mycobacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 6, p. 1435-1436, 2003.

FREER, S. N.; DIEN, Bruce; MATSUDA, S. Production of acetic acid by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts under conditions of constant pH. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 101-105, 2003.

GAGGIÀ, F., BAFFONI, L., GALIANO, M., NIELSEN, D. S., JAKOBSEN, R. R., CASTRO-MEJÍA, J. L., DI GIOIA, D. Kombucha beverage from green, black and rooibos teas: a comparative study looking at microbiology, chemistry and antioxidant activity. **Nutrients**, v. 11, n. 1, p. 1, 2019.

GAO, Yuefang et al. Tea polysaccharides from *Camellia sinensis*: chemical analysis, structural characterization, and inhibition of HeLa cells activity. **International Journal of Polymer Analysis and Characterization**, v. 26, n. 3, p. 240-252, 2021.

GLOBAL MARKET INSIGHTS. **Kombucha Market Revenue to Reach over \$5 billion by 2025**: Global Market Insights, Inc., 2019. Disponível em: <http://www.globenewswire.com/news-release/2019/11/06/1941900/0/en/Kombucha-Market-revenue-to-reach-over-5-billion-by-2025-Global-Market-Insights-Inc.html>.

GÓES-NETO, Aristóteles et al. Shotgun metagenomic analysis of kombucha mutualistic community exposed to mars-like environment outside the international space station. **Environmental Microbiology**, v. 23, n. 7, p. 3727-3742, 2021.

GOMES, R. J., DE FATIMA BORGES, M., DE FREITAS ROSA, M., CASTRO-GÓMEZ, R. J. H., SPINOSA, W. A. Acetic acid bacteria in the food industry: systematics, characteristics and applications. **Food technology and biotechnology**, v. 56, n. 2, p. 139, 2018.

GOOCH, Cassandra; MARTIROSYAN, Danik. Where tradition meets science: microbial diversity and bioactive compounds in Armenian fermented milk products. **Bioactive Molecules and Pharmaceuticals**, v. 1, n. 9, p. 1-17, 2022.

GUERREIRO, Joana F.; MIRA, Nuno P.; SÁ-CORREIA, Isabel. Adaptive response to acetic acid in the highly resistant yeast species *Zygosaccharomyces bailii* revealed by quantitative proteomics. **Proteomics**, v. 12, n. 14, p. 2303-2318, 2012.

GULLO, Maria et al. Exploring K2G30 genome: a high bacterial cellulose producing strain in glucose and mannitol based media. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 434280, 2019.

GUPTE, Yash et al. Characterization of nanocellulose production by strains of *Komagataeibacter* sp. isolated from organic waste and Kombucha. **Carbohydrate polymers**, v. 266, p. 118176, 2021.

HADDOUCHE, Ramdane et al. Roles of multiple acyl-CoA oxidases in the routing of carbon flow towards  $\beta$ -oxidation and polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Yarrowia lipolytica*. **FEMS yeast research**, v. 10, n. 7, p. 917-927, 2010.

HAMMER, Øyvind; HARPER, David AT. Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia electronica**, v. 4, n. 1, p. 1, 2001.

HARRIS, Victoria et al. Survey of enzyme activity responsible for phenolic off-flavour production by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, p. 1117-1127, 2009.

HARRISON, Keisha; CURTIN, Chris. Microbial composition of SCOBY starter cultures used by commercial kombucha brewers in North America. **Microorganisms**, v. 9, n. 5, p. 1060, 2021.

HARROUARD, Jules et al. *Brettanomyces bruxellensis*: overview of the genetic and phenotypic diversity of an anthropized yeast. **Molecular Ecology**, v. 32, n. 10, p. 2374-2395, 2023.

HASLAM, E. Thoughts on thearubigins. **Phytochemistry**, v. 64, n. 1, p. 61-73, 2003.

HE, Wenjia et al. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* strains on chemical composition and sensory quality of ciders made from Finnish apple cultivars. **Food Chemistry**, v. 345, p. 128833, 2021.

HOFFMANN, N. **The Ubiquitous Co-Enzyme UDPGlucuronic Acid Detoxifying Agent in Kombucha Tea**. 2000. Disponível em: [www.bluemarble.de/Norbert/kombucha/Glucuron/body\\_glucuron.htm](http://www.bluemarble.de/Norbert/kombucha/Glucuron/body_glucuron.htm).4

HOOI, Suet Li et al. The microbial composition and functional roles of different kombucha products in Singapore. **CyTA-Journal of Food**, v. 21, n. 1, p. 269-274, 2023.

HOU, Jie et al. Antimicrobial potential of kombucha against foodborne pathogens: a review. **Quality Assurance and Safety of Crops & Foods**, v. 13, n. 3, p. 53-61, 2021.

HRNJEZ, D., VAŠTAG, Ž., MILANOVIĆ, S., VUKIĆ, V., ILIČIĆ, M., POPOVIĆ, L., KANURIĆ, K. The biological activity of fermented dairy products obtained by kombucha and conventional starter cultures during storage. **Journal of Functional Foods**, v. 10, p. 336-345, 2014.

IATTICI, Fabrizio; CATALLO, Martina; SOLIERI, Lisa. Designing new yeasts for craft brewing: When natural biodiversity meets biotechnology. **Beverages**, v. 6, n. 1, p. 3, 2020.

IÇEN, Hayrunisa et al. Microbiology and antimicrobial effects of kombucha, a short overview. **Food Bioscience**, v. 56, p. 103270, 2023.

IVANIŠOVÁ, E. et al. Kombucha tea beverage: Microbiological characteristic, antioxidant activity, and phytochemical composition. **Acta Alimentaria**, v. 48, n. 3, p. 324-331, 2019.

IVANIŠOVÁ, E., MEŇHARTOVÁ, K., TEREŇTJEVA, M., HARANGOZO, L., KÁNTOR, A., KAČÁNIOVÁ, M. The evaluation of chemical, antioxidant, antimicrobial and sensory properties of kombucha tea beverage. **Journal of food science and technology**, v. 57, n. 5, p. 1840-1846, 2020.

JAFARI, Reyhaneh et al. Isolation, molecular and phylogenetic identification of microorganisms from Kombucha solution and evaluation of their viability using flow cytometry. **Food Science and Technology**, v. 42, p. e63220, 2021.

JAFARI, Reyhaneh et al. Kombucha microbial starter with enhanced production of antioxidant compounds and invertase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 29, p. 101789, 2020.

JAKUBCZYK, Karolina et al. Chemical profile and antioxidant activity of the kombucha beverage derived from white, green, black and red tea. **Antioxidants**, v. 9, n. 5, p. 447, 2020.

JANA, Minarovičová; ADRIANA, Véghová; EVA, Kaclíková. Evaluation of DNA extraction methods for culture-independent real-time PCR-based detection of *Listeria monocytogenes* in cheese. **Food Analytical Methods**, v. 13, n. 3, p. 667-677, 2020.

JAYABALAN, Rasu et al. A review on kombucha tea—microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 13, n. 4, p. 538-550, 2014.

JAYABALAN, R.; WAISUNDARA, Viduranga Y. Kombucha as a functional beverage. In: **Functional and medicinal beverages**. Academic Press, 2019. p. 413-446.

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

JIANG, Wei et al. Metabolic engineering strategies to enable microbial utilization of C1 feedstocks. **Nature Chemical Biology**, v. 17, n. 8, p. 845-855, 2021.

- JU, Mingxiu et al. Correlation in endophytic fungi community diversity and bioactive compounds of *Sophora alopecuroides*. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 955647, 2022.
- JUNG, Y., KIM, I., MANNAA, M., KIM, J., WANG, S., PARK, I., SEO, Y. S. Effect of Kombucha on gut-microbiota in mouse having non-alcoholic fatty liver disease. **Food science and biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 261-267, 2019.
- JUNNARKAR, Manisha et al. Probiotic potential of lactic acid bacteria from fresh vegetables: Application in food preservation. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 57, p. 825-838, 2019.
- KAASHYAP, Mayank; COHEN, Marc; MANTRI, Nitin. Microbial diversity and characteristics of kombucha as revealed by metagenomic and physicochemical analysis. **Nutrients**, v. 13, n. 12, p. 4446, 2021.
- KABIRI, N.; SETORKI, M. Protective effect of Kombucha tea on brain damage induced by transient cerebral ischemia and reperfusion in rat. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 11, n. 3, p. 675-683, 2016.
- KAEWKOD, T., BOVONSOMBUT, S., TRAGOOLPUA, Y. Efficacy of kombucha obtained from green, oolong, and black teas on inhibition of pathogenic bacteria, antioxidation, and toxicity on colorectal cancer cell line. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, p. 700, 2019.
- KAHRAMAN-ILIKKAN, Özge. Microbiome composition of kombucha tea from Türkiye using high-throughput sequencing. **Journal of Food Science and Technology**, v. 60, n. 6, p. 1826-1833, 2023.
- KAPP, J. M.; SUMNER, W. Kombucha: A systematic review of the empirical evidence of human health benefit. **Annals of epidemiology**, v. 30, p. 66-70, 2019.
- KIENE, Florian et al. Construction and analysis of a yeast for the simultaneous release and esterification of the varietal thiol 3-sulfanylhexas-1-ol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 40, p. 11919-11925, 2021.
- KILMANOĞLU, Hilal; YIGIT CINAR, Aycan; DURAK, Muhammed Zeki. Effect of Reformed Microbial Consortia for Kombucha Beverage on Biochemical, Sensory and Flavor Quality. **Muhammed Zeki, Effect of Reformed Microbial Consortia for Kombucha Beverage on Biochemical, Sensory and Flavor Quality**.
- KIM, Hayeong et al. Enhancement of the phenolic compounds and antioxidant activities of Kombucha prepared using specific bacterial and yeast. **Food Bioscience**, v. 56, p. 103431, 2023.
- KIM, Juyoung; ADHIKARI, Koushik. Current trends in kombucha: Marketing perspectives and the need for improved sensory research. **Beverages**, v. 6, n. 1, p. 15, 2020.

KIM, Y., GOODNER, K. L., PARK, J. D., CHOI, J., TALCOTT, S. T. Changes in antioxidant phytochemicals and volatile composition of *Camellia sinensis* by oxidation during tea fermentation. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1331-1342, 2011.

KITWETCHAROEN, Haruthairat et al. Kombucha healthy drink—recent advances in production, chemical composition and health benefits. **Fermentation**, v. 9, n. 1, p. 48, 2023.

KRYSENKO, Sergii; WOHLLEBEN, Wolfgang. Polyamine and ethanolamine metabolism in bacteria as an important component of nitrogen assimilation for survival and pathogenicity. **Medical Sciences**, v. 10, n. 3, p. 40, 2022.

KUANYSHEV, Nurzhan et al. The spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*: Foe or friend? **Yeast**, v. 34, n. 9, p. 359-370, 2017.

LA CHINA, Salvatore et al. Kombucha tea as a reservoir of cellulose producing bacteria: Assessing diversity among *Komagataeibacter* isolates. **Applied Sciences**, v. 11, n. 4, p. 1595, 2021.

LANDIS, Elizabeth A. et al. Microbial diversity and interaction specificity in kombucha tea fermentations. **Msystems**, v. 7, n. 3, p. e00157-22, 2022.

LANDIS, Elizabeth A. et al. The diversity and function of sourdough starter microbiomes. **Elife**, v. 10, p. e61644, 2021.

LAVEFVE, Laura; MARASINI, Daya; CARBONERO, Franck. Microbial ecology of fermented vegetables and non-alcoholic drinks and current knowledge on their impact on human health. **Advances in food and nutrition research**, v. 87, p. 147-185, 2019.

LEAL, Jessica Martínez et al. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. **CyTA-Journal of Food**, v. 16, n. 1, p. 390-399, 2018.

LEE, Imchang et al. Metagenome-Assembled genome sequences obtained from a reactivated kombucha microbial community exposed to a mars-like environment outside the international space station. **Microbiology Resource Announcements**, v. 10, n. 36, p. 10.1128/mra.00549-21, 2021.

LEE, Kyu Ri et al. Kombucha fermentation using commercial kombucha pellicle and culture broth as starter. **Food Science and Technology**, v. 42, p. e70020, 2021.

LEECH, Chong et al. Promising advancement in fermentative succinic acid production by yeast hosts. **Journal of hazardous materials**, v. 401, p. 123414, 2021.

LI, Ruyi et al. Enhancing the proportion of gluconic acid with a microbial community reconstruction method to improve the taste quality of Kombucha. **LWT**, v. 155, p. 112937, 2022.

LI, Shiqi et al. Effect of sequential fermentation with four non-Saccharomyces and Saccharomyces cerevisiae on nutritional characteristics and flavor profiles of kiwi wines. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 109, p. 104480, 2022.

LI, Siying et al. Effect of fermentation time on physiochemical properties of kombucha produced from different teas and fruits: Comparative study. **Journal of Food Quality**, v. 2022, p. 1-10, 2022.

LI, Yan et al. Brewing of glucuronic acid-enriched apple cider with enhanced antioxidant activities through the co-fermentation of yeast (Saccharomyces cerevisiae and Pichia kudriavzevii) and bacteria (Lactobacillus plantarum). **Food Science and Biotechnology**, v. 30, p. 555-564, 2021.

LINDER, Tomas. A genomic survey of nitrogen assimilation pathways in budding yeasts (sub-phylum Saccharomycotina). **Yeast**, v. 36, n. 5, p. 259-273, 2019.

LIU, C. H., HSU, W. H., LEE, F. L., LIAO, C. C. The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation. **Food microbiology**, v. 13, n. 6, p. 407-415, 1996.

LOBO, R. O.; DIAS, F. O.; SHENOY, C. K. Kombucha for healthy living: evaluation of antioxidant potential and bioactive compounds. **International Food Research Journal**, v. 24, n. 2, 2017.

LOPES, Mario Lucio et al. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **brazilian journal of microbiology**, v. 47, p. 64-76, 2016.

LORENZO, José Manuel; MUNEKATA, Paulo Eduardo Sichetti. Phenolic compounds of green tea: Health benefits and technological application in food. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 8, p. 709-719, 2016.

LUO, Xiaoqin et al. Discovering the effect of co-fermentation involving Saccharomyces cerevisiae and Schizosaccharomyces pombe on the sensory quality improvement of mandarin wine based on metabolites and transcriptomic profiles. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 103, n. 15, p. 7932-7940, 2023.

LYNCH, Kieran M. et al. Physiology of acetic acid bacteria and their role in vinegar and fermented beverages. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 3, p. 587-625, 2019.

MA, Emily Z.; KHACHEMOUNE, Amor. Flavonoids and their therapeutic applications in skin diseases. **Archives of dermatological research**, v. 315, n. 3, p. 321-331, 2023.

MALARZ, Janusz; YUDINA, Yulia V.; STOJAKOWSKA, Anna. Hairy root cultures as a source of phenolic antioxidants: simple phenolics, phenolic acids, phenylethanoids, and hydroxycinnamates. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 8, p. 6920, 2023.

MALBAŠA, R. V., LONČAR, E. S., VITAS, J. S., & ČANADANOVIĆ-BRUNET, J. M. Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1727–1731, 2011.

MARIANI, Cristina et al. Flavonoid characterization and in vitro antioxidant activity of *Aconitum anthora* L. (Ranunculaceae). **Phytochemistry**, v. 69, n. 5, p. 1220-1226, 2008.

MARSH, Alan J. et al. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. **Food microbiology**, v. 38, p. 171-178, 2014.

MARTIN, J. G. P., ROCHA, A. R. F. S., VENTURIM, B. C.; DUQUE-RODRÍGUEZ, A D. **Bebidas não alcóolicas fermentadas**. In: MARTIN, J. G. P., & DE DEA LINDNER, J. (org.). Microbiologia de alimentos fermentados. São Paulo: Editora Blucher, 2022.

MARTÍNEZ-LEAL, Jessica; PONCE-GARCÍA, Nestor; ESCALANTE-ABURTO, Anayansi. Recent evidence of the beneficial effects associated with glucuronic acid contained in kombucha beverages. **Current nutrition reports**, v. 9, p. 163-170, 2020.

MATSUSHITA, Kazunobu et al. Acetic acid bacteria. **Ecology and physiology. Japan: Springer**, 2016.

MAY, A. N., MEDINA, J., ALCOCK, J., MALEY, C., AKTIPIS, A. Kombucha as a model system for multispecies microbial cooperation: theoretical promise, methodological challenges and new solutions ‘in solution’. **bioRxiv**, p. 214478, 2017.

MAY, Alexander et al. Kombucha: A novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem. **PeerJ**, v. 7, p. e7565, 2019.

MEHTA, C. M. et al. Microbial diversity and bioactive substances in disease suppressive composts from India. **Compost Science & Utilization**, v. 24, n. 2, p. 105-116, 2016.

MENG, Yuecheng et al. Microbial interactions and dynamic changes of volatile flavor compounds during the fermentation of traditional kombucha. **Food Chemistry**, v. 430, p. 137060, 2024.

MERICO, Annamaria et al. Aerobic sugar metabolism in the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 3, p. 277-283, 2003.

MIZUTA, A. G., DE MENEZES, J. L., DUTRA, T. V., FERREIRA, T. V., CASTRO, J. C., DA SILVA, C. A. J., DE ABREU FILHO, B. A. Evaluation of antimicrobial activity of green tea kombucha at two fermentation time points against *Alicyclobacillus* spp. **LWT**, v. 130, p. 109641, 2020.

MOAZZEN, Amir et al. Structure-antiradical activity relationships of 25 natural antioxidant phenolic compounds from different classes. **Heliyon**, v. 8, n. 9, 2022.

MOENS, Frédéric; LEFEBER, Timothy; DE VUYST, Luc. Oxidation of metabolites highlights the microbial interactions and role of *Acetobacter pasteurianus* during cocoa bean fermentation. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 6, p. 1848-1857, 2014.

MONACO, E. 7 Easy ways to know if your kombucha is authentic (and why it matters). **Organic Authority**, 2019. Disponível em: <https://www.organicauthority.com/energetic-health/7-easy-ways-to-know-if-your-kombucha-is-authentic?fbclid=IwAR1H-sowA6aisY9JonL62lvrp9Pv34eLppzj1hmwvVJkvIb>.

MORADI, Mehran et al. Postbiotics produced by lactic acid bacteria: The next frontier in food safety. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 19, n. 6, p. 3390-3415, 2020.

MORALES, D. Biological activities of kombucha beverages: The need of clinical evidence. **Trends in Food Science & Technology**, v. 105, p. 323-333, 2020.

MOTAFEGHI, Farzaneh et al. Kombucha mushroom extract: anticancer, antioxidant, and antimicrobial properties. **Applied In Vitro Toxicology**, v. 9, n. 3, p. 90-103, 2023.

MOTTA, F. L.; ANDRADE, C. C. P.; SANTANA, M. H. A. A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications. **Sustainable degradation of lignocellulosic biomass-techniques, applications and commercialization**, v. 1, p. 251-276, 2013.

MUHALDIN, B. J., OSMAN, F. A., MUHAMAD, R., CHE WAN SAPAWI, C. W. N. S., ANZIAN, A., VOON, W. W. Y., HUSSIN, A. S. Effects of sugar sources and fermentation time on the properties of tea fungus (kombucha) beverage. **International Food Research Journal**, v. 26, n. 2, 2019.

MUKHERJEE, Vaskar et al. Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation. **Biotechnology for biofuels**, v. 10, p. 1-19, 2017.

MURUGESAN, G. S.; ANGAYARKANNI, J.; SWAMINATHAN, K. Effect of tea fungal enzymes on the quality of black tea. **Food chemistry**, v. 79, n. 4, p. 411-417, 2002.

NEFFE-SKOCIŃSKA, K.; SIOŃEK, B.; ŚCIBISZ, I.; KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA, D. Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. *CyTA - Journal of Food*, v. 15, n. 4, p. 601–607. 2017. doi: 10.1080/19476337.2017.13215.

NGUYEN, N. K., DONG, N. T. N., NGUYEN, H. T., LE, P. H. Lactic acid bacteria: promising supplements for enhancing the biological activities of kombucha. **Springerplus**, v. 4, n. 1, p. 1-6, 2015.

NGUYEN, Nguyen K. et al. Evaluation of the glucuronic acid production and other biological activities of fermented sweeten-black tea by kombucha layer and the co-culture with different *Lactobacillus* sp. strains. **Ijmer**, v. 4, p. 12-17, 2014.

NGUYEN, N. K., NGUYEN, P. B., NGUYEN, H. T., LE, P. H. Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid. **LWT-Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1149-1155, 2015.

NIETO-PENALVER, Carlos G. et al. Gluconic acid produced by *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 possesses antimicrobial properties. **Research in microbiology**, v. 165, n. 7, p. 549-558, 2014.

NORONHA, Marcel Cardoso et al. Black tea kombucha: Physicochemical, microbiological and comprehensive phenolic profile changes during fermentation, and antimalarial activity. **Food Chemistry**, v. 384, p. 132515, 2022.

NOVAIS, Giuliano Tostes; MACHADO, Lilian Aline. Os climas do Brasil: segundo a classificação climática de Novais. **Revista Brasileira de Climatologia**, v. 32, p. 1-39, 2023.

NYIEW, Ke-Ying; KWONG, Phek Jin; YOW, Yoon-Yen. An overview of antimicrobial properties of kombucha. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 21, n. 2, p. 1024-1053, 2022.

OCHOA-CHACÓN, Alfayuset et al. Xylose metabolism in bioethanol production: *Saccharomyces cerevisiae* vs non-*Saccharomyces* yeasts. **BioEnergy Research**, p. 1-19, 2021.

OJO, Abidemi Oluranti; DE SMIDT, Olga. Microbial Composition, Bioactive Compounds, Potential Benefits and Risks Associated with Kombucha: A Concise Review. **Fermentation**, v. 9, n. 5, p. 472, 2023.

OLIVEIRA, Jordan Teixeira et al. Green tea and kombucha characterization: Phenolic composition, antioxidant capacity and enzymatic inhibition potential. **Food Chemistry**, v. 408, p. 135206, 2023.

OWEN, Oliver E.; KALHAN, Satish C.; HANSON, Richard W. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 34, p. 30409-30412, 2002.

ÖZYURT, Hazal. Changes in the content of total polyphenols and the antioxidant activity of different beverages obtained by Kombucha 'tea fungus'. **International Journal of Agriculture Environment and Food Sciences**, v. 4, n. 3, p. 255-261, 2020.

PARK, Hyun Joo et al. Low-pH production of d-lactic acid using newly isolated acid tolerant yeast *Pichia kudriavzevii* NG7. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, n. 9, p. 2232-2242, 2018.

PARVIN, R. et al. Production, purification and characterization of a novel thermostable caffeine dehydrogenase from *Pichia manshurica* strain CD1 isolated from kombucha tea. **Microbiology**, v. 92, n. 2, p. 230-241, 2023.

PATIÑO, Margareth Andrea et al. D-Xylose consumption by nonrecombinant *Saccharomyces cerevisiae*: a review. **Yeast**, v. 36, n. 9, p. 541-556, 2019.

PEI, J., JIN, W., ABD EL-ATY, A. M., BARANENKO, D. A., GOU, X., ZHANG, H., YUE, T. Isolation, purification, and structural identification of a new bacteriocin made by *Lactobacillus plantarum* found in conventional kombucha. **Food Control**, v. 110, p. 106923, 2020.

PETRUZZI, Leonardo et al. Brewer's yeast in controlled and uncontrolled fermentations, with a focus on novel, nonconventional, and superior strains. **Food reviews international**, v. 32, n. 4, p. 341-363, 2016.

PINTO, Ana et al. Screening of bacteriocinogenic lactic acid bacteria and their characterization as potential probiotics. **Microorganisms**, v. 8, n. 3, p. 393, 2020.

PRADHAN, Susanta et al. Metagenomic and physicochemical analysis of Kombucha beverage produced from tea waste. **Journal of Food Science and Technology**, v. 60, n. 3, p. 1088-1096, 2023.

RADLER, Ferdinand. Yeasts-metabolism of organic acids. **Wine microbiology and biotechnology**, 1993.

RALSER, Markus et al. Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. **Journal of biology**, v. 6, p. 1-18, 2007.

RAMACHANDRAN, S.; FONTANILLE, P.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. Gluconic acid: Properties, applications and microbial production. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 185–195, 2006.

RASPOR, Peter; GORANOVIČ, Dušan. Biotechnological applications of acetic acid bacteria. **Critical reviews in biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 101-124, 2008.

REVA, O. N.; ZAETS, I. E.; OVCHARENKO, L. P.; KUKHARENKO, O. E.; SHPYLOVA, S. P.; PODOLICH, O. V.; DE VERA, J. P.; KOZYROVSKA, N. O. Metabarcoding of the kombucha microbial community grown in different microenvironments. **AMB Express**, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2015. doi: 10.1186/s13568-015-0124-5.

REYES-FLORES, Samanta; PEREIRA, Taísa Sabrina Silva; RAMÍREZ-RODRIGUES, Milena Maria. Optimization of Hempseed-Added Kombucha for Increasing the Antioxidant Capacity, Protein Concentration, and Total Phenolic Content. **Beverages**, v. 9, n. 2, p. 50, 2023.

RODRIGUES, Fernando et al. The fate of acetic acid during glucose co-metabolism by the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52402, 2012.

SAICHANA, Natsaran et al. Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological applications. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 6, p. 1260-1271, 2015.

SAINZ F., NAVARRO D., MATEO E., TORIJA M. J., MAS A. Comparison of d-gluconic acid production in selected strains of acetic acid bacteria. **International journal of food microbiology**, v. 222, p. 40-47, 2016.

SANTANA DE CARVALHO, Daniel et al. The space-exposed kombucha microbial community member *Komagataeibacter oboediens* showed only minor changes in its genome after reactivation on Earth. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 782175, 2022.

SANTOS, Renato Augusto Corrêa et al. Draft genome sequence of *Komagataeibacter rhaeticus* strain AF1, a high producer of cellulose, isolated from Kombucha tea. **Genome announcements**, v. 2, n. 4, p. 10.1128/genomea.00731-14, 2014.

SANWAL, Nikita et al. Kombucha fermentation: Recent trends in process dynamics, functional bioactivities, toxicity management, and potential applications. **Food Chemistry Advances**, v. 3, p. 100421, 2023.

SAVARY, Océane et al. Tailor-made microbial consortium for Kombucha fermentation: Microbiota-induced biochemical changes and biofilm formation. **Food Research International**, v. 147, p. 110549, 2021.

SEMJONOV, Pavels et al. Cellulose synthesis by *Komagataeibacter rhaeticus* strain P 1463 isolated from Kombucha. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, p. 1003-1012, 2017.

SHAABAN, Khaled A. Marine microbial diversity as source of bioactive compounds. **Marine Drugs**, v. 20, n. 5, p. 304, 2022.

SHI, Chao et al. Antimicrobial activity of syringic acid against *Cronobacter sakazakii* and its effect on cell membrane. **Food chemistry**, v. 197, p. 100-106, 2016.

SHI, Linghong et al. Extraction and characterization of phenolic compounds and their potential antioxidant activities. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 54, p. 81112-81129, 2022.

SINGH, Prashant et al. High-resolution melting real-time PCR assays for detection of *Escherichia coli* O26 and O111 strains possessing Shiga toxin genes. **LWT**, v. 131, p. 109785, 2020.

SIRIN, Seda; DOLANBAY, Serap Nigdelioglu; ASLIM, Belma. Role of plant derived alkaloids as antioxidant agents for neurodegenerative diseases. **Health Sciences Review**, v. 6, p. 100071, 2023.

- SKNEPNEK, Aleksandra et al. Fermentation characteristics of novel *Coriolus versicolor* and *Lentinus edodes* kombucha beverages and immunomodulatory potential of their polysaccharide extracts. **Food Chemistry**, v. 342, p. 128344, 2021.
- SOHRABVANDI, Sarah et al. Application of *Saccharomyces rouxii* for the production of non-alcoholic beer. **Food science and biotechnology**, v. 18, n. 5, p. 1132-1137, 2009.
- Solieri, L. (2021). The revenge of *Zygosaccharomyces* yeasts in food biotechnology and applied microbiology. *World journal of microbiology and biotechnology*, 37(6), 96.
- SOUZA LIBERAL, A. T. et al. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 2, p. 538-547, 2007.
- STRATFORD, M., CAPELL, C. J. Soft drinks: Microbiology. In CABALLERO, B., FINGLAS, P, TOLDRA, F. (eds.), **Encyclopedia of food sciences and nutrition**. 2nd ed., New York: Academic Press, 2003. p. 5358–5366.
- STRICKLAND, Matthew T. et al. Impact of *Pediococcus* spp. on Pinot noir wine quality and growth of *Brettanomyces*. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 67, n. 2, p. 188-198, 2016.
- SU, Jingqian et al. Application of Kombucha Fermentation Broth for Antibacterial, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Processes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 18, p. 13984, 2023.
- SUBBIAHDOSS, Guruprakash; OSMEN, Sarah; REIMHULT, Erik. Cellulosic biofilm formation of *Komagataeibacter* in kombucha at oil-water interfaces. **Biofilm**, v. 4, p. 100071, 2022.
- SUHRE, Tais et al. Microbial community and physicochemical characterization of kombuchas produced and marketed in Brazil. **Journal of food science and nutrition research. Houston. Vol. 4, no. 4 (Dec. 2021), p. 302-316**, 2021.
- SUTHERLAND, Brad A.; RAHMAN, Rosanna MA; APPLETON, Ian. Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 17, n. 5, p. 291-306, 2006.
- TAHEUR, F. B., MANSOUR, C., JEDDOU, K. B., MACHREKI, Y., KOUIDHI, B., ABDULHAKIM, J. A., CHAIEB, K. Aflatoxin B1 degradation by microorganisms isolated from Kombucha culture. **Toxicon**, v. 179, p. 76-83, 2020.
- TAING, Ok; TAING, Kazuya. Production of malic and succinic acids by sugar-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. **European Food Research and Technology**, v. 224, p. 343-347, 2007.

TAJKARIMI, Mehrdad; IBRAHIM, Salam A. Antimicrobial activity of ascorbic acid alone or in combination with lactic acid on *Escherichia coli* O157: H7 in laboratory medium and carrot juice. **Food Control**, v. 22, n. 6, p. 801-804, 2011.

TANTICHARAKUNSIRI, Wanlapa et al. Characteristics and upregulation of antioxidant enzymes of kitchen mint and oolong tea kombucha beverages. **Journal of Food Biochemistry**, v. 45, n. 1, p. e13574, 2021.

TEOH A. L, HEARD G., COX J. Yeast ecology of Kombucha fermentation. **International journal of food microbiology**, v. 95, n. 2, p. 119-126, 2004.

TESSEMA, Fekade Beshah et al. Antioxidant activity of flavonoids and phenolic acids from *Dodonaea angustifolia* flower: HPLC profile and PASS prediction. **Journal of Chemistry**, v. 2023, 2023.

TOMAR, Oktay. Determination of some quality properties and antimicrobial activities of kombucha tea prepared with different berries. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 47, n. 2, p. 252-262, 2023.

TORÁN-PEREG, Paula et al. Microbiological and sensory characterization of kombucha SCOBY for culinary applications. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 23, p. 100314, 2021.

TOZZI, Maria G. et al. Pentose phosphates in nucleoside interconversion and catabolism. **The FEBS journal**, v. 273, n. 6, p. 1089-1101, 2006.

TRAN, Thierry et al. Microbial dynamics between yeasts and acetic acid bacteria in kombucha: Impacts on the chemical composition of the beverage. **Foods**, v. 9, n. 7, p. 963, 2020.

TRAN, Thierry et al. Microbiological and technological parameters impacting the chemical composition and sensory quality of kombucha. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 4, p. 2050-2070, 2020.

TRAN, Thierry et al. Microbial dynamics between yeasts and acetic acid bacteria in kombucha: Impacts on the chemical composition of the beverage. **Foods**, v. 9, n. 7, p. 963, 2020.

TREVIÑO-GARZA, M. Z., GUERRERO-MEDINA, A. S., GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, R. A., GARCÍA-GÓMEZ, C., GUZMÁN-VELASCO, A., BÁEZ-GONZÁLEZ, J. G., MÁRQUEZ-REYES, J. M. Production of Microbial Cellulose Films from Green Tea (*Camellia Sinensis*) Kombucha with Various Carbon Sources. **Coatings**, v. 10, n. 11, p. 1132, 2020.

TU, Chuanhai et al. Isolation and identification of *Starmerella davenportii* strain Do18 and its application in black tea beverage fermentation. **Food science and human wellness**, v. 9, n. 4, p. 355-362, 2020.

- TU, C., TANG, S., AZI, F., HU, W., DONG, M. Use of kombucha consortium to transform soy whey into a novel functional beverage. **Journal of Functional Foods**, v. 52, p. 81-89, 2019.
- UȚOIU, Elena et al. Bee collected pollen with enhanced health benefits, produced by fermentation with a Kombucha Consortium. **Nutrients**, v. 10, n. 10, p. 1365, 2018.
- VAN WYK, Niël et al. The influence of *Pichia kluyveri* addition on the aroma profile of a kombucha tea fermentation. **Foods**, v. 12, n. 10, p. 1938, 2023.
- VÁZQUEZ-CABRAL, Blanca Denis et al. Oak kombucha protects against oxidative stress and inflammatory processes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 272, p. 1-9, 2017.
- VENTURIM, B. C. **Produção de kombucha a partir de diferentes inóculos brasileiros**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2022. 65 f.
- VIJAYARAGHAVAN, R. et al. Subacute (90 days) oral toxicity studies of Kombucha tea. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 13, n. 4, p. 293-299, 2000.
- VILELA, Alice. Biological demalication and deacetification of musts and wines: can wine yeasts make the wine taste better?. **Fermentation**, v. 3, n. 4, p. 51, 2017.
- VILLARREAL-SOTO, S. A.; BEAUFORT, S.; BOUAJILA, J.; SOUCHARD, J. P.; TAILLANDIER, P. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 3, p. 580–588, 2018.
- VILLARREAL-SOTO, S. A.; BOUAJILA, J.; PACE, M.; LEECH, J.; COTTER, P. D.; SOUCHARD, J. P.; TAILLANDIER, P.; BEAUFORT, S. Metabolome-microbiome signatures in the fermented beverage, Kombucha. **International Journal of Food Microbiology**, v. 333, p. 108778, 2020.
- VINA, I. et al. Glucuronic acid containing fermented functional beverages produced by natural yeasts and bacteria associations. **Int. J. Res. Rev. Appl**, v. 14, p. 17-25, 2013.
- VITAS, Jasmina S. et al. Chemical composition and biological activity of novel types of kombucha beverages with yarrow. **Journal of Functional Foods**, v. 44, p. 95-102, 2018.
- VITAS, J., VUKMANOVIĆ, S., ČAKAREVIĆ, J., POPOVIĆ, L., MALBAŠA, R. Kombucha fermentation of six medicinal herbs: Chemical profile and biological activity. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly**, v. 26, n. 2, p. 157-170, 2020.
- VOHRA, B. M., FAZRY, S., SAIRI, F., BABUL-AIRIANAH, O. Effects of medium variation and fermentation time on the antioxidant and antimicrobial properties of Kombucha. **Malaysian Journal of Fundamental & Applied Sciences**, v. 15, n. 2-1, p. 298-302, 2019.

VOIDAROU, Chrysa et al. Fermentative foods: Microbiology, biochemistry, potential human health benefits and public health issues. **Foods**, v. 10, n. 1, p. 69, 2020.

VUKMANOVIĆ, Stefan et al. Certain production variables and antimicrobial activity of novel winery effluent based kombucha. **LWT**, v. 154, p. 112726, 2022.

WANG, Nuoya et al. Revealing the co-fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* on the quality of cider based on the metabolomic and transcriptomic analysis. **LWT**, v. 168, p. 113943, 2022.

WANG, S., ZHANG, L., QI, L., LIANG, H., LIN, X., LI, S., JI, C. Effect of synthetic microbial community on nutraceutical and sensory qualities of kombucha. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 55, n. 10, p. 3327-3333, 2020.

WANG, Xiaotong et al. Chemical profile and antioxidant capacity of kombucha tea by the pure cultured kombucha. **LWT**, v. 168, p. 113931, 2022.

WANG, Y., JI, B., WU, W., WANG, R., YANG, Z., ZHANG, D., TIAN, W. Hepatoprotective effects of kombucha tea: identification of functional strains and quantification of functional components. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 2, p. 265-272, 2014.

WANG, Yuqin et al. Advances in 2-phenylethanol production from engineered microorganisms. **Biotechnology advances**, v. 37, n. 3, p. 403-409, 2019.

WATAWANA, Mindani I. et al. Health, wellness, and safety aspects of the consumption of kombucha. **Journal of Chemistry**, v. 2015, 2015.

WU, Si-Xia et al. Preparation, antioxidant activities and bioactive components of kombucha beverages from golden-flower tea (*Camellia petelotii*) and honeysuckle-flower tea (*Lonicera japonica*). **Foods**, v. 12, n. 16, p. 3010, 2023.

XIONG, Ruo-Gu et al. Antioxidant Activities, Phenolic Compounds, and Sensory Acceptability of Kombucha-Fermented Beverages from Bamboo Leaf and Mulberry Leaf. **Antioxidants**, v. 12, n. 8, p. 1573, 2023.

XU, Dong-Ping et al. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 1, p. 96, 2017.

XU, Yi-Fan et al. Nucleotide degradation and ribose salvage in yeast. **Molecular systems biology**, v. 9, n. 1, p. 665, 2013.

YAMADA, Yuzo et al. Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae). **The Journal of general and applied microbiology**, v. 58, n. 5, p. 397-404, 2012.

YANG, Jieping et al. Microbial and chemical profiles of commercial kombucha products. **Nutrients**, v. 14, n. 3, p. 670, 2022.

YANG, Z., ZHOU, F., JI, B., LI, B., LUO, Y., YANG, L., LI, T. Symbiosis between microorganisms from kombucha and kefir: potential significance to the enhancement of kombucha function. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 160, n. 2, p. 446-455, 2010.

YAO, Lingyun et al. Revealing the influence of microbiota on the flavor of kombucha during natural fermentation process by metagenomic and GC-MS analysis. **Food Research International**, v. 169, p. 112909, 2023.

YE, Zheng-Hua; ZHONG, Ruiqin. Outstanding questions on xylan biosynthesis. **Plant Science**, v. 325, p. 111476, 2022.

YU, Wenyue et al. Insight into the characteristics of cider fermented by single and co-culture with *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* based on metabolomic and transcriptomic approaches. **LWT**, v. 163, p. 113538, 2022.

YUAN, Lei et al. Metagenomic analysis reveals microbial community and functional capacity in Kombucha. **Quality Assurance and Safety of Crops & Foods**, v. 14, n. 3, p. 1-8, 2022.

ZHANG, Jing et al. Exploration of microbial community diversity and bioactive substances during fermentation of mulberry Jiaosu, an edible naturally fermented mulberry product. **Fermentation**, v. 9, n. 10, p. 910, 2023.

ZHANG, Yunzhen et al. The positive correlation of antioxidant activity and prebiotic effect about oat phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 402, p. 134231, 2023.

ZHAO, Z. J., SUI, Y. C., WU, H. W., ZHOU, C. B., HU, X. C., ZHANG, J. FLAVOUR chemical dynamics during fermentation of kombucha tea. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, p. 732-741, 2018.

ZHOU, Dan-Dan et al. Fermentation with tea residues enhances antioxidant activities and polyphenol contents in kombucha beverages. **Antioxidants**, v. 11, n. 1, p. 155, 2022.

ZIEMLEWSKA, Aleksandra et al. Effect of fermentation time on the content of bioactive compounds with cosmetic and dermatological properties in Kombucha Yerba Mate extracts. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 18792, 2021.

ZUBAIDAH, E., AFGANI, C. A., KALSUM, U., SRIANTA, I., BLANC, P. J. Comparison of in vivo antidiabetes activity of snake fruit Kombucha, black tea Kombucha and metformin. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 465-469, 2019.

ZUBAIDAH, Elok et al. Potential of snake fruit (*Salacca zalacca* (Gaerth.) Voss) for the development of a beverage through fermentation with the Kombucha consortium. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 13, p. 198-203, 2018.