

Uzgoj kokulture kefirnih zrnaca i kombuche u crnom čaju

Trčak, Mihaela

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:000462>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Mihaela Trčak

6893/BT

UZGOJ KOKULTURE KEFIRNIH ZRNACA I *KOMBUCHE* U CRNOM ČAJU

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 2

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

Zagreb, 2017.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Sunčice Beluhan.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo,
Industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

UZGOJ KOKULTURE KEFIRNIH ZRNACA I KOMBUČE U CRNOM ČAJU

Mihaela Trčak, 6893/BT

Sažetak: *Kombucha* i kefir su tradicionalni fermentirani napitci dobiveni djelovanjem združenih kultura bakterija octene, mliječne kiseline i kvasaca. U ovom je radu proučavan uzgoj kokulture *kombuche* i kefirnih zrnaca na crnom čaju te je tijekom uzgoja praćena promjena pH vrijednosti, koncentracije etanola, octene, glukonske i mliječne kiseline u aerobnim uvjetima uzgoja tijekom 12 dana. Određen je i prinos bakterijske celuloze sintetizirane u kokulturi kefirnih zrnaca i *kombuche*. Međudjelovanje mikroorganizama u kokulturi može pozitivno i negativno djelovati na metaboličke funkcije, sintezu organskih spojeva i bakterijske celuloze. Sniženje pH vrijednosti je rezultat metaboličkih aktivnosti kvasaca i bakterija octene i mliječne kiseline. Debljina i prinos bakterijske celuloze su se povećavali tijekom fermentacije.

Ključne riječi: *kombucha*, kefir, kokultura, organske kiseline, bakterijska celuloza

Rad sadrži: 36 stranica, 13 slika, 1 tablica, 86 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: *Izv. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan*

Datum obrane: 8. rujna 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical engineering
Laboratory for Biochemical Engineering,
Industrial Microbiology, Malting and Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

CULTIVATION OF KEFIR GRAINS AND KOMBUCHA COCULTURE IN BLACK TEA

Mihaela Trčak, 6893/BT

Abstract: *Kombucha* and kefir are traditional fermented drinks produced by adding symbiotic cultures of acetic and lactic acid bacteria, and yeast to medium. This work studies cultivation of coculture kombucha and kefir grains in black tea in aerobic conditions over a period up to 12 days and observes changes in pH value, ethanol, acetic acid, gluconic acid and lactic acid concentration. Yield of bacterial cellulose in coculture of kombucha and kefir grains was also determined. Possible interactions of microorganisms in coculture can have positive or negative impact on metabolic functions, organic acid production and bacterial cellulose synthesis. Changes in pH were related to the symbiotic metabolic activities of yeasts and acetic or lactic acid bacteria. The thickness and yield of bacterial cellulose obtained increased with fermentation time.

Keywords: *Kombucha*, Kefir, Coculture, Organic acids, Bacterial cellulose

Thesis contains: 36 pages, 13 figures, 1 table, 86 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: *Sunčica Beluhan, PhD, Associate Professor*

Defence date: September 8th 2017

SADRŽAJ

1. UVOD	6
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. <i>Kombucha</i> napitak	3
2.2. Crni čaj i <i>kombucha</i>	6
2.3. Kefir	7
2.3.1. Kefirna zrnca	9
2.4. Kokultura	11
2.4.1. Interakcije između mikroorganizama u kokulturi	12
2.5. Biosinteza bakterijske celuloze	13
3. MATERIJALI I METODE	15
3.1. Uzgoj „majčinske“ kulture <i>kombuche</i>	16
3.2. Uzgoj kefirnih zrnaca	16
3.3. Hranjiva podloga	16
3.3.1. Vrsta čaja	16
3.3.2. Priprava kompleksne podloge (crni čaj)	16
3.4. Određivanje pH vrijednosti	17
3.5. Određivanje koncentracije octene kiseline	17
3.6. Određivanje koncentracije glukonske kiseline	17
3.7. Određivanje koncentracije mliječne kiseline	18
3.8. Određivanje alkohola kemijskom metodom	18
3.9. Izračunavanje mase i prinosa celulozne biomase kokulture	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. Promjena pH vrijednosti	20
4.2. Organske kiseline i etanol	21
4.3. Sinteza bakterijske celuloze	24
5. ZAKLJUČCI	27
6. LITERATURA	28

1. UVOD

Kombucha i kefir su tradicionalna fermentirana pića dobivena djelovanjem združenih kultura bakterija i kvasaca. *Kombucha* se dobiva fermentacijom zaslađenog čaja pomoću simbiotske zajednice bakterija i kvasaca koji formiraju „čajnu gljivu“ (Dufresne i Farnworth, 2000), a kefir fermentacijom mlijeka pomoću kefirnih zrnaca, združene kulture bakterija mliječne kiseline i kvasaca. Ovi tradicionalni proizvodi su se spravljali od davnina u cilju povećanja nutritivnih svojstava, produljenja roka trajanja i zbog zdravstvenih koristi koje redovna konzumacija fermentiranih proizvoda može imati na ljudsko zdravlje. Tradicionalna kućna proizvodnja kefira i *kombuche* s vremenom je postala zamijenjena industrijskom proizvodnjom zbog velikog interesa za te proizvode. Danas se oni mogu smatrati funkcionalnom hranom zbog svojih probiotičkih svojstava. Prema definiciji FAO/WHO, probiotici su živi mikroorganizmi koji kada se unose u dovoljnim količinama imaju pozitivan zdravstveni učinak na domaćina. Korisni učinci na zdravlje uključuju poboljšanje metaboličkih i fizioloških procesa kao i smanjenje rizika pojave mnogih bolesti (Saarela i sur., 2000; Hozapfel i Schillinger, 2002; Saxelin i sur., 2005; Shah, 2007). U novije vrijeme se sve više istražuju pozitivni učinci probiotika ne samo na gastrointestinalni sustav već i na imunitet i druge organske sustave i opće psihofizičko zdravlje čovjeka. Mikroorganizmi koji čine združenu zajednicu *kombuche* i kefirnih zrnaca međudjeluju i stvaraju povoljno okruženje za sintezu vitamina i spojeva koji imaju antioksidativno i antimikrobno djelovanje. Zajednička fermentacija pomoću *kombuche* i *Lactobacillus* spp. iz kefirnih zrnaca može poboljšati bioaktivna svojstva *kombuche*. Istraživanje koje su proveli Nguyen i sur. (2015) je pokazalo da sojevi *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus casei* izolirani iz kefirnih zrnaca poboljšavaju biološke aktivnosti *kombuche* kao što su sinteza glukuronske kiseline, antioksidativno i antibakterijsko djelovanje. U istraživanju su naglašene prednosti dodatka *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus casei* izolirane iz kefira u odnosu na druge *Lactobacillus* sp. vrste izolirane iz drugih izvora što potvrđuje prijašnje zaključke da te vrste bakterija mliječne kiseline poboljšavaju biološke funkcije *kombuche* (Nguyen i sur., 2015). Uzgoj kokultura ima mnoge prednosti u odnosu na uzgoj čistih kultura jer rezultira povećanim prinosom, mogućnošću korištenja jeftinijih supstrata i dobivanja specifičnih metaboličkih produkata. Unatoč mnogim prednostima, potrebno je provesti mnogo istraživanja kako bi se dobile neophodne informacije o međudjelovanju mikroorganizama u kokulturama jer ono ne mora nužno biti pozitivno. Te informacije su nužne za razvoj novih biotehnoloških procesa u kojima bi se mogli dobiti novi biotehnološki proizvodi, povećati prinos i kvaliteta postojećih proizvoda i smanjiti cijena bioprocasa.

Tijekom fermentacije provedene pomoću kokulture *kombuche* i kefirnih zrnaca u crnom čaju praćeni su i određivani sljedeći parametri:

- promjena pH vrijednosti
- promjena koncentracije etanola, octene, glukonske i mliječne kiseline u aerobnim uvjetima uzgoja tijekom 12 dana
- prinos bakterijske celuloze sintetizirane u kokulturi kefirnih zrnaca i *kombuche*

2. TEORIJSKI DIO

2.1. *Kombucha* napitak

„Čajna gljiva“ (*Medusomyces gisevii*) ili *kombucha* je najčešće ime za simbiotsku zajednicu bakterija octene kiseline (*Acetobacter xylium*, *Acetobacter xylinoides*, *Bacterium gluconicum*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*) i osmofilnih vrsta kvasaca (*Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces ludwigii*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Zygosaccharomyces bailli*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces lambicus*, *Brettanomyces custersii*, *Pichia membranaefaciens*, *Torulopsis* i *Candida*) koji se nalaze u debeloj želatinoznoj membrani koja se sintetizira u zaslađenom čaju (Jayabalan i sur., 2010). *Kombucha* potječe s područja Kine, a 414. godine doktor Kombu je „čajnu gljivu“ donio iz Koreje u Japan u cilju liječenja probavnih problema cara Inkyo. Otuda i podrijetlo imena *kombucha* („cha“ je japanski naziv za čaj). Postoji mnogo naziva za *kombuchu* kao što su „fungus japonicus“, „Haipao“, „theebier“, „Cainii grib“, „Mandžurijska gljiva“, „Cainii kvass“ i „Volgovska meduza“ jer se napitak tradicionalno spravljao u raznim dijelovima Rusije, Njemačke, Koreje, Japana, Kine i Indije. Mnogi ljudi *kombuchu* nazivaju i „čajna gljiva“ jer celulozni površinski sloj koji se formira tijekom fermentacije nalikuje klobuku gljive ili pak površini plijesni. Danas je *kombucha* popularno piće diljem svijeta, a interes za *kombucha* napitkom sve više raste jer ju mnogi ljudi smatraju funkcionalnom hranom i svjedoče o pozitivnim učincima koje redovna konzumacija tog napitka ima na ljudsko zdravlje.

Kombucha se dobiva fermentacijom zaslađenog čaja pomoću simbiotske zajednice bakterija i kvasaca koji formiraju „čajnu gljivu“ (Dufresne i Farnworth, 2000). Tijekom fermentacije se stvaraju dva sloja, plutajući celulozni površinski sloj u kojem su vezani mikroorganizmi i tekući sloj otopine čaja. Plutajući sloj se koristi kao starter kultura za fermentacijske procese. To je novoformirana *kombucha* koja nastaje iznad starog sloja *kombuche* (majčinska kultura) kojom je inokulirana otopina čaja. Debljina tog sloja se povećava s vremenom, a može biti veličine od nekoliko milimetara do nekoliko centimetara, slično celuloznom sloju koji se formira tijekom fermentacije octa (Jarrell i sur., 2000). Majčinska kultura ne mijenja svoj početni volumen i tone na dno otopine čaja, ispod novoformirane kulture-kćeri (Jayabalan i sur., 2014). Prije konzumacije se celulozni sloj odvaja, a tekući dio dobiva specifičan okus s naglašenom kiselošću. Za fermentaciju se najčešće koriste crni ili zeleni čaj (Hoon i sur., 2014) koji osigurava nutrijente (primjerice aminokiseline, vitamine i minerale) za *kombuchu* što doprinosi općem okusu pića. Nadalje, mikroorganizmi koriste šećer kao izvor energije i za formiranje celuloznog sloja.

Celulozni sloj za koji je pričvršćena kultura *kombuche* čini simbiotska zajednica bakterija i kvasaca, ali mikrobiološki sastav je promjenjiv i nedovoljno istražen, a može ovisiti i o izvoru inokuluma za fermentaciju čaja. Najkarakterističnije bakterije octene kiseline koje se pojavljuju u *kombucha* kulturi su *Komagataeibacter* (K.) *xylinus*, prije *A. xylinum* i *Gluconoacetobacter* (Ga.) *xylinus* (Jayabalan i sur., 2014; Sievers i sur., 1996). U *kombuchi* se mogu naći i druge vrste bakterija octene kiseline kao što su *Gluconacetobacter kombuchae* (*Komagataeibacter kombuchae*) (Dutta i Gachhui, 2007), *A. pasterianus* (Liu i sur., 1996; Yoshino i sur., 1996), *Komagataeibacter hansenii* (Dutta i Gachhui, 2007; Tan i sur., 2012), *A. aceti* (Liu i sur., 1996), *A. nitrogenifigens* (Dutta i Gachhui, 2006), *Ka. intermediens* (Boesch i sur., 1998), *Gluconacetobacter saccharivorans* (Wang i sur., 2014; Yang i sur., 2010), *Ga. sacchari*, *Acetobacter* spp., *Gluconobacter* spp. i *Gluconacetobacter* spp. (Hoon i sur., 2014; Marsh i sur., 2014). U *kombuchi* se može naći široki spektar vrsta kvasaca koji pripadaju rodu *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* i *Dekkera* (Jayabalan i sur., 2014; Marsh i sur., 2014).

Važnosti i aspekti simbiotske zajednice bakterija octene kiseline i kvasaca u *kombuchi* su proučavani u ovisnosti o iskorištenju supstrata i sinergističkom iskorištenju metaboličkih puteva svih vrsta koje se nalaze u mikrobnj zajednici. Kvasci pretvaraju saharozu u fruktozu i glukozu i proizvode etanol i ugljični dioksid (Reiss, 1994; Sievers i sur., 1996; Sreeramulu i sur., 2000). Bakterije octene kiseline pretvaraju glukozu u glukonsku kiselinu i fruktozu u octenu kiselinu (Dufresne i Farnworth, 2000). *Acetobacter xylinum* ima sposobnost sinteze plutajuće celulozne mreže koja pojačava povezanost između bakterija i kvasaca (Balentine i sur., 1997). Kofein i srodni ksantini iz čajne infuzije stimuliraju sintezu celuloznog sloja (Balentine i sur., 1997). Octena kiselina stimulira proizvodnju etanola kojeg sintetiziraju kvasci, a etanol može koristiti bakterijama octene kiseline za rast i sintezu octene kiseline (Liu i sur., 1996). I etanol i octena kiselina imaju antimikrobno djelovanje protiv patogenih bakterija i stoga osiguravaju zaštitu od kontaminacije „čajne gljive“ (Liu i sur., 1996).

Proces dobivanja *kombucha* napitka započinje infuzijom listova čaja kroz 5 do 10 minuta u kipućoj vodi u koju se dodaje saharoza u koncentraciji od 50 g/L. Listovi čaja se filtriraju, a otopina se prelije u steriliziranu tikvicu, hladi i inokulira kulturom *kombuche*, a zatim se otvor tikvice prekrije čistom gazom koja se pričvrsti za tikvicu. Inkubacija se vrši na sobnoj temperaturi (20°C do 30°C) tijekom perioda od jedan do osam tjedana (Dufresne i Farnworth, 2000). Tijekom fermentacije se stvara celulozni sloj na površini čaja, dolazi do pada pH vrijednosti, nastanka mjehurića ugljikovog dioksida i metabolita (octena kiselina, glukonska kiselina, glukuronska kiselina i etanol). Također je zabilježena prisutnost vitamina B skupine i folne kiseline čija je sinteza potaknuta procesom fermentacije (Roche, 1998).

navedeno u Dufresne i Farnworth, 2000). Sastav metabolita i njihova koncentracija ovise o izvoru „čajne gljive“, koncentraciji šećera i vremenskom periodu fermentacije (Dufresne i Farnworth, 2000). Nakon deset do četrnaest dana se površinski celulozni sloj odvaja, *kombucha* filtrira i pohranjuje u boce. *Kombucha* napitak ima kiseli okus, sličan jabukovači. Na početku fermentacije izražena je voćna aroma, a produljenjem vremena fermentacije okus postaje kiseliji, sličan octu. Vrijeme trajanja fermentacije je važno zbog okusa i arome ali i zbog sniženja pH vrijednosti do koje dolazi uslijed sinteze organskih kiselina jer preniska pH vrijednost može dovesti do ozbiljne metaboličke acidoze i gastrointestinalnih problema. Izvor dušika tijekom fermentacije *kombuche* su listovi čaja. Ipak, neke bakterije octene kiseline koje su izolirane iz *kombuche* kao što su *A. nitrogenifigens* i *K. kombuchae* mogu fiksirati dušik iz atmosfere (Dutta i Gachhui, 2006, 2007) i to može biti još jedna važna uloga bakterija octene kiseline u fermentaciji. Koncentracija vitamina B1, B2, B6, B12 i C se povećava tijekom fermentacije *kombuche* (Bauer-Petrovska i Petrushevska-Tozi, 2000; Jayabalan i sur., 2014; Malbaša i sur., 2011; Vitas i sur., 2013) kao i antioksidativna aktivnost i sastav fenola u čaju. Te promjene se mogu pripisati i enzimima koje proizvode bakterije i/ili kvasci koji su prisutni u *kombuchi* (Chu i Chen, 2006; Jayabalan i sur., 2014). *Kombucha* se konzumira stoljećima u mnogim zemljama, a danas sve više raste interes za taj napitak jer se smatra da ima mnoga svojstva koja mogu doprinijeti zdravlju i prevenirati bolesti. Osim toga, u novije vrijeme se istražuje i mogućnost uporabe biomase kulture *kombuche* kao proteinskog suplementa u stočnoj hrani i biosorbenta za uklanjanje metalnih zagađenja iz otpadnih voda te korištenja celuloznog sloja za liječenje kožnih oštećenja i opekotina. Iako su brojne zdravstvene koristi *kombucha* čaja potvrdili mnogi konzumenti, a na temelju njihovih iskustava i Ruska centralna onkološka istraživačka jedinica i Ruska akademija znanosti, nedostaje znanstvenih dokaza koji bi mogli potkrijepiti te tvrdnje. Potreban je znanstveniji pristup kako bi se razdvojile stvarne i indirektno koristi od neopravdanih tvrdnji (Dufresne i Farnworth, 2000).

2.2. Crni čaj i *kombucha*

Najbolja hranjiva podloga za uzgoj *kombuche* je crni čaj zaslađen šećerom iako se može koristiti i zeleni čaj (Reiss, 1994). Crni čaj se proizvodi iz mladih, mekih izbojaka biljke *Camellia sinensis* (Slika 1) i najčešće je, uz vodu, konzumirano nealkoholno piće (Sajilata i sur., 2008). Kakvoća arome i okusa se mijenja s promjenama u geografskim i klimatskim uvjetima (Howard, 1978; Cloughley i sur. 1982; Takeo i Mahanta, 1983). Crni čaj se dobiva mrvljenjem uvelih listova čaja što omogućuje odvijanje oksidacije posredovane enzimima, što se često naziva i fermentacija, koja dovodi do stvaranja oligomera kao što je teaflavin i polimera tearubigina (Sajilata i sur., 2008). Čaj sadrži i polifenole katehine koji imaju snažna antioksidativna svojstva i smatraju se funkcionalnim sastojkom pića. Sastav katehina može ovisiti o geografskoj lokaciji, uvjetima uzgoja i načinu na koji su listovi procesirani prije sušenja (Sajilata i sur., 2008).



Slika 2. Prikaz svježih i oksidiranih osušenih listića crnog čaja
(<http://www.globalcompany.co.in/black-tea-leaves.htm>)

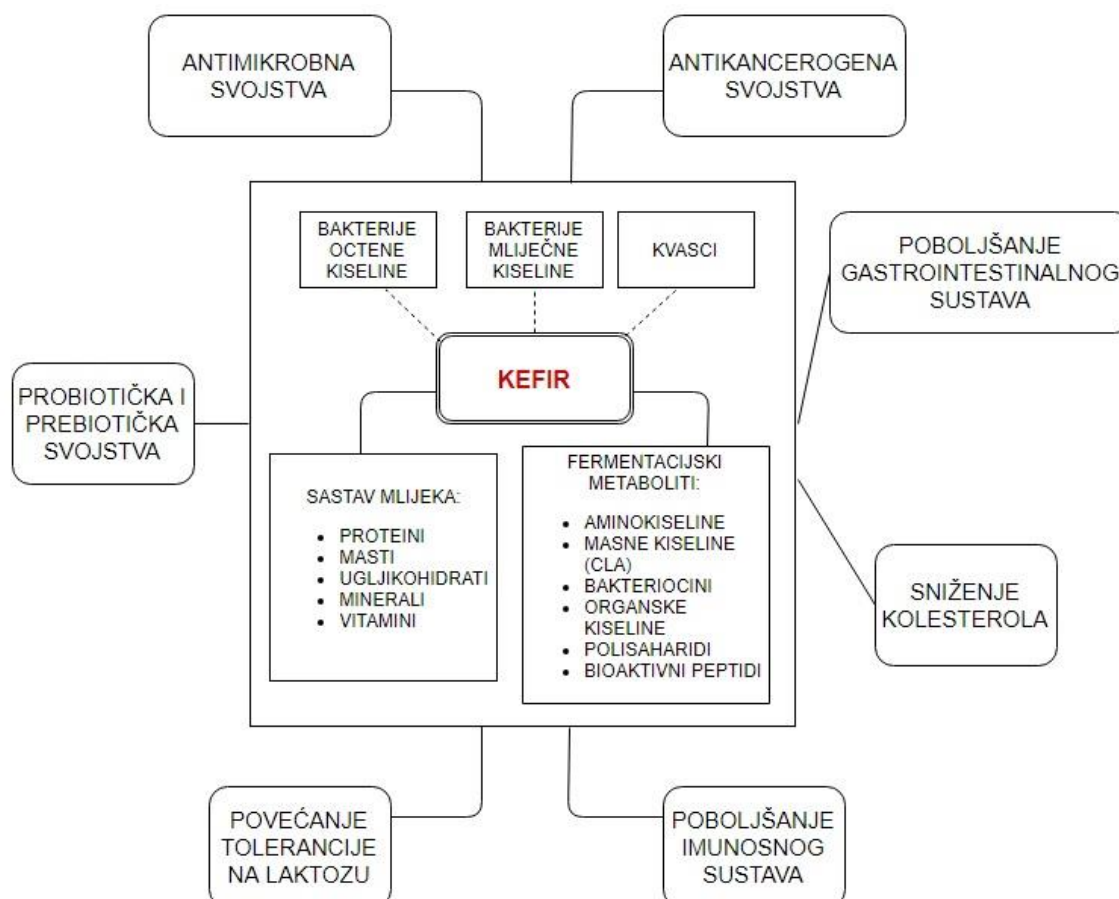
Dugotrajna konzumacija katehina iz čaja pozitivno djeluje na supresiju pretilosti uzrokovane prehranom tako što modulira metabolizam lipida (Crespy i Williamson, 2004). Epidemiološke studije pokazuju da polifenoli iz crnog i zelenog čaja imaju ulogu u zaštiti od kardiovaskularnih bolesti (Riemersma i sur., 2001). Redovita konzumacija čaja poboljšava metaboličke funkcije bakterija u intestinalnom traktu i važan je čimbenik promocije zdravlja (Weisburger, 2003). Tijekom fermentacije *kombuche* dolazi do biodegradacije katehina i drugih antioksidativnih spojeva zbog djelovanja enzima koje izlučuju kvasci i bakterije octene kiseline. *Kombucha* čaj ima veću antioksidacijsku aktivnost nego nefermentirani čaj, a razlog tomu je nastanak spojeva male molekulske težine i strukturnih modifikacija čajnih polifenola

koja se događa pomoću enzima koje proizvode bakterije i kvasci tijekom fermentacije (Jayabalan i sur., 2014). Ipak, mnoge zdravstvene koristi koje se pripisuju konzumaciji *kombuche* su slične zdravstvenim koristima konzumacije čaja. Problem predstavlja nedostatak dokaza i znanstvenih istraživanja koja bi objasnila kako proces fermentacije koju provodi *kombucha* kultura utječe na spojeve i svojstva čaja. Moguće je da su rezultati korisnih učinaka koji su objavljeni za *kombuchu* kao što su stimulacija imunskog sustava, probave i funkcije jetre ili poboljšanje općeg metabolizma zapravo zajedničke koristi vezane i uz čaj i/ili uz promjene koje se događaju uslijed fermentacije (Dufresne i Farnworth, 2000).

2.3. Kefir

Kefir je jedinstven fermentirani mliječni proizvod dobiven mliječno-kiselinskom i alkoholnom fermentacijom laktoze u mlijeku (Guzel-Seydim i sur., 2010). Tradicionalno se dobiva pomoću kefirnih zrnaca, združene kulture bakterija mliječne kiseline i kvasaca koji provode fermentaciju u mlijeku. Kefir je postao važna funkcionalna mliječna hrana zbog svojih zdravstvenih koristi koje uključuju smanjenje simptoma intolerancije na laktozu, stimulaciju imunskog sustava, smanjenje kolesterola i antimutagenih i antikancerogenih svojstava pa se zbog toga i broj istraživanja o kefiru u posljednje desetljeće povećao (Guzel-Seydim i sur., 2010).

Kefir se može smatrati funkcionalnom hranom zbog svojih probiotički svojstava. Prema definiciji FAO/WHO, probiotici su živi mikroorganizmi koji kada se unose u dovoljnim količinama imaju pozitivan zdravstveni učinak na domaćina. Korisni učinci na zdravlje uključuju poboljšanje metaboličkih i fizioloških procesa kao i smanjenje rizika pojave mnogih bolesti (Saarela i sur., 2000; Hozapfel i Schillinger, 2002; Saxelin i sur., 2005; Shah, 2007). Jedan od prvih znanstvenika koji je istraživao povezanost probiotika i zdravstvenih učinaka bio je ruski biolog Ilija Mečnikov, dobitnik Nobelove nagrade za medicinu 1908 godine. On je uočio da probiotici mogu imati pozitivan učinak na zdravlje probavnog sustava, ali i na poboljšanje imuniteta. Danas su njegove tvrdnje dokazane brojnim studijima i kontroliranim istraživanjima provedenim na ljudima. Osim toga, istražuju se i brojne druge zdravstvene koristi redovne konzumacije probiotika i fermentirane hrane na druge organske sustave.

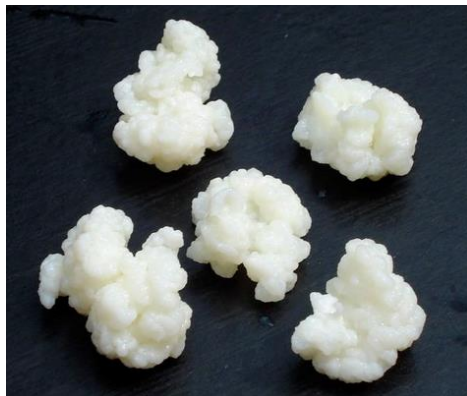


Slika 2. Shematski prikaz funkcionalnih svojstava kefir (Guzel-Seydim i sur., 2011)

Prijašnje studije su pokazale da fermentirani mliječni proizvodi mogu imati probiotičke učinke kao što su poboljšanje zdravlja probavnog sustava, smanjenje kolesterola u krvi, povećanje tolerancije na laktozu, poboljšanje funkcije imuniteta, regulacija simptoma sindroma iritabilnog crijeva i antikancerogena svojstva (Guzel-Seydim i sur., 2011). Kefir dobiven fermentacijom mlijeka pomoću kefirnih zrnaca sadrži prirodne probiotike (Kok-Tas, 2010). Bioaktivni peptidi i proteini iz fermentirane hrane također doprinose važnim zdravstvenim koristima kao što su stimulacija proliferacije limfocita, povećana produkcija imunoglobulina, smanjenje povišenog tlaka i povećana apsorpcija intestinalnog kalcija (Möller i sur., 2008). Nekoliko studija provedenih na životinjama je pokazalo da je konzumacija fermentiranog mlijeka inhibirala rast određenih tipova tumora (de Moreno de LeBlanc i sur., 2006).

2.3.1. Kefirna zrnca

Kefirna zrnca su prvi puta opisala plemena na sjeveru Kavkaza, planinskoj regiji u Rusiji (Seydim, 2001). Kefir se proizvodi fermentacijskom aktivnošću kefirnih zrnaca koja sadrže raznolik spektar svojstvenih bakterija mliječne kiseline i kvasaca u polisaharidnom matriksu polutvrdih granula (Tablica 1, Slika 3). Dodatkom kefirnih zrnaca u mlijeko i inkubacijom tijekom 22 h pri 25°C, mikroorganizmi u zrcima se nastavljaju umnažati u mlijeku i proizvoditi mliječnu kiselinu i druge spojeve koji daju okus što dovodi do fizikalno-kemijskih promjena mlijeka (Guzel-Seydim i sur., 2011). Dobiveni proizvod je kefir, blago pjenušavo, osvježavajuće fermentirano mliječno piće koje ima jedinstven okus zahvaljujući mješavini mliječne kiseline, ugljikovog dioksida, acetaldehida, acetoina, alkohola i drugih fermentacijskih produkata koji daju okus (Guzel-Seydim i sur., 2011). Slično kao kod *kombuche*, kefirna zrnca se nakon fermentacije mogu ponovo iskoristiti. Možda je to doprinijelo dugovječnoj proizvodnji *kombucha* napitka i kefira jer se fermentacija lako mogla provesti pomoću starter kultura koje su se prenosile iz generacije u generaciju.



Slika 3. Prikaz mliječnih kefirnih zrnaca (<http://www.naturaltherapyshop.com.au/kefir-10gr-live-organic-milk-kefir-grains/>)

Tablica 1. Mikroflora kefira i kefirnih zrnaca

Rod	Literatura
Lactobacillus	
<i>L. kefir</i>	Santos i sur., 2003; Mobili i sur., 2008
<i>L. kefiranofaciens</i>	Wang i sur., 2008; Vinderola i sur., 2007
<i>L. kefirgranum</i>	Takizawa i sur., 1994
<i>L. parakefir</i>	Takizawa i sur., 1994; Garrote i sur., 2001
<i>L. brevis</i>	Santos i sur., 2003; Mobili i sur., 2008
<i>L. plantarum</i>	Garrote i sur., 2001; Santos i sur., 2003
<i>L. helveticus</i>	Simova i sur., 2005; Valasaki i sur., 2007
<i>L. acidophilus</i>	Santos i sur., 2003; Angulo i sur., 1993
<i>L. delbrueckii</i>	Simova i sur., 2002; Santos i sur., 2003
<i>L. rhamnosus</i>	Angulo i sur., 1993
<i>L. casei</i>	Simova i sur., 2002
<i>L. paracasei</i>	Santos i sur., 2003
<i>L. fructivorans</i> , <i>L. hilgardii</i>	Yoshida i Toyoshima, 1994
<i>L. fermentum</i> , <i>L. viridescens</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. fermentum</i>	Angulo i sur., 1993
<i>L. mesenteroides</i> , <i>L. crispatus</i>	Garbers i sur., 2004
Lactococcus	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Simova i sur., 2002; Kojic i sur., 2007; Mainville i sur., 2005
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	Garrote i sur., 2001
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Mainville i sur., 2005
Streptococcus	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Yuksekdag i sur., 2004; Simova i sur., 2002
<i>S. cremoris</i> , <i>S. faecalis</i>	Ergüllü i Üçüncü, 1983
<i>S. durans</i>	Yuksekdag i sur., 2004
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Lin i sur., 1999; Garrote i sur., 2001
Bakterije octene kiseline	
<i>Acetobacter</i> sp.	Garrote i sur., 2001
<i>A. pasterianus</i>	Ottogalli i sur., 1973
<i>A. aceti</i>	Jayabalan i sur., 2010
Kvasci	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Angulo i sur., 1993; Rohm i sur., 1992
<i>S. delbruecki</i>	Rosi i Rossi, 1978; Engel i sur., 1986
<i>Candida kefir</i>	Marshall, 1993; Berruga i Sanjose, 1997
<i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Issatchenika orientalis</i> , <i>S. unisporus</i> , <i>S. exiguus</i> , <i>S. humaticus</i>	Latorre Garcia i sur., 2007
<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>S. turicensis</i> ,	Wang i sur., 2008
<i>Pichia fermentas</i>	
<i>Torulopsis holmii</i>	Iwasawa i sur., 1982
<i>C. holmii</i>	Angulo i sur., 1993; Engel i sur., 1986
<i>Torulospora delbrueckii</i> , <i>C. friedricchi</i> , <i>C. albicans</i>	Angulo i sur., 1993

2.4. Kokultura

Uzgoj kokultura ima mnoge prednosti u odnosu na uzgoj čistih kultura jer rezultira povećanim prinosom, većom mogućnosti kontrole kvalitete proizvoda i mogućnošću korištenja jeftinijih supstrata. Većina se biotehnoloških proizvoda kao što su kemikalije, organske kiseline, antibiotici, enzimi i biogorivo, dobiva pomoću čistih mikrobnih kultura jer sterilna kultivacija čistih kultura omogućuje jednostavnu kontrolu biotehnoloških procesa, smanjenje mogućnosti kontaminacije i povećanje prinosa. S druge strane, postoji mnogo primjera u kojima je uzgoj kokulture preferiran u odnosu na uzgoj jedne vrste mikroorganizama zbog potencijala sinergističkog iskorištenja metaboličkih puteva svih vrsta koje sudjeluju u kokulturi (Bader i sur., 2010).

Kokulture su prirodno prisutne svuda oko nas; u zemlji, komposnim hrpama, vodi, ljudskoj koži, gastrointestinalnom traktu i u prirodno fermentiranoj hrani. Kokulture različitog mikrobnog sastava se koriste i u različitim biotehnološkim procesima kao što su proizvodnja kefira i *kombuche*, kiselog tijesta, bioremedijacija, biološka obrada otpadnih voda i proizvodnja bioplina. U kokulturama su prisutne različite vrste mikroorganizama koje međudjeluju. Njihove interakcije mogu biti pozitivne i negativne s obzirom na metaboličke funkcije, rast i preživljenje pojedine vrste. Neki oblici mikrobnog međudjelovanja su kompeticija (svi članovi se natječu za hranu, prostori ili neki drugi čimbenik što rezultira time da svi članovi mješovite populacije imaju manji rast u usporedbi s pojedinačnim rastom), komensalizam (jedan član mješovite zajednice ima koristi od drugog, a drugi član nema ni štete ni koristi), amensalizam (jedna populacija djeluje na rast druge dok je sama inertna na djelovanje ostalih populacija), kometabolizam (mikrobno međudjelovanje u kojem organizam raste na jednom supstratu nakupljajući dovoljno enzima koji omogućuju razgradnju drugog „ciljanog“ supstrata pomoću druge vrste) i simbioza (obje vrste u mikrobnj zajednici imaju međusobne koristi). Simbioza i kometabolizam su najvažniji oblici mikrobnog međudjelovanja koji omogućuju sinergističko djelovanje različitih enzimskih sustava i metaboličkih puteva.

Simbioza različitih mikroorganizama može biti uzrokovana sinergijom različitih enzimskih sustava i metaboličkih puteva tih mikroorganizama (Yara i sur., 2006). Modifikacija neprerađenih sastojaka hrane tijekom proizvodnje pomoću kokulture rezultira poboljšanjem teksture, okusa, arome i mikrobnom stabilizacijom proizvoda (Schwenninger i Meile, 2004; Benkerroum i sur., 2005; Janssen i sur., 2006). Osim toga, mikroorganizmi u kokulturama često proizvode spojeve koji onemogućuju rast kontaminanata, a često mogu rasti na sekundarnim sirovinama (melasa, sirutka) koje su jeftinije od primarnih sirovina (glukoza, aminokiseline).

2.4.1. Interakcije između mikroorganizama u kokulturi

Stanice u hranjivoj podlozi međusobno komuniciraju izravnim stanica-stanica interakcijama (Meyer i Stahl, 2003) ili pomoću signalnih molekula u fermentacijskom mediju (Bader i sur., 2010). Interakcije između različitih mikroorganizama u kokulturi imaju ključnu ulogu u rastu mikrobnih vrsta i sintezi produkata (Meyer i Stahl, 2003). To vrijedi i za sintezu primarnih i sekundarnih metabolita (Keller i Surette, 2006). Aktivacija mikrobnih promotora u kokulturi koji nisu aktivirani u čistim kulturama indicira potencijal sinteze novih supstanci koje mogu biti od industrijske važnosti (Moller i sur., 1998).

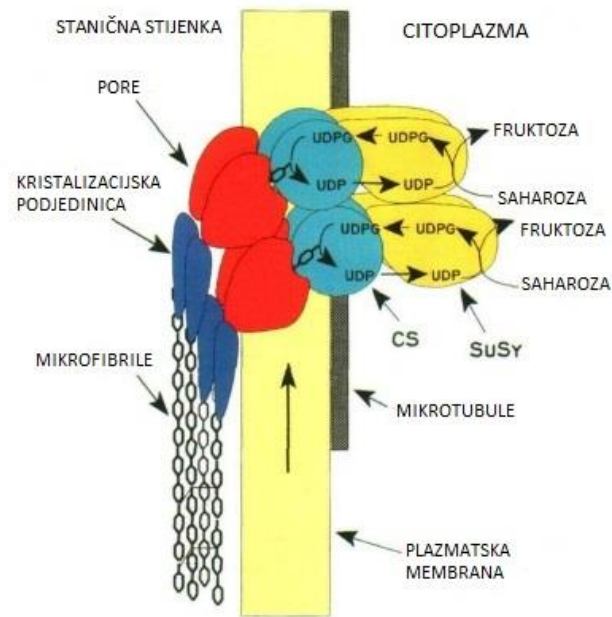
Postoje mnogi primjeri u kojima je rast neke od vrsta u kokulturi inhibiran djelovanjem drugih vrsta no isto tako može biti i aktiviran. Sodini i sur. (2000) su uočili povećanje brzine rasta stanica tijekom kokultivacije različitih vrsta bakterija mliječne kiseline uslijed razmjene faktora rasta. Povećanje brzine rasta je moguće jer enzimska aktivnost jedne vrste omogućuje opskrbu druge vrste supstratom (Qian i sur., 2006). Smanjenje broja supstanci koje sintetizira jedna vrsta u kokulturi, a inhibiraju rast uočili su Cheirsilp i sur. (2003) i to je dovelo do poboljšanja rasta druge kulture u kokulturi.

Kontrolirana kultivacija kokultura omogućuju sinergističko iskorištenje metaboličkih puteva mikroorganizama u industrijskim i reproducibilnim uvjetima. Ipak, za dobivanje željenog produkta potrebno je znati kako se mikroorganizmi ponašaju u kokulturi i optimalne vrijednosti parametara biotehnološkog procesa. Parametri se moraju optimizirati tako da se omogući iskorištenje željenih metaboličkih puteva svih vrsta u kokulturi kako bi se omogućio razvoj i kontrola fermentacijskih procesa u cilju dobivanja željenog produkta (Bader i sur., 2010).

Svi čimbenici uzgoja kokulture moraju se uzeti u obzir. Interakcije u kokulturi mogu biti poželjne za dobivanje nekog produkta, ali mikroorganizmi se mogu natjecati za hranu ili sintetizirati toksične spojeve i inhibitore i tako negativno djelovati na rast drugih kultura ili sintezu proizvoda. U kokulturi su interakcije između mikroorganizama kompleksne i teško je predvidjeti kako će prisutnost jedne vrste djelovati na drugu vrstu, njen rast, sintezu primarnih i sekundarnih produkata, korištenje određenih metaboličkih puteva i potencijalnu biotransformaciju produkata. Zato je potrebno provesti istraživanja kojima bi se utvrdilo mikrobno međudjelovanje u kokulturi i kako ono utječe na biosintezu i metabolizam pojedine vrste. Te informacije su neophodne za razvoj novih biotehnoloških procesa koji bi mogli biti jeftiniji jer postoji mogućnost korištenja jeftinijih sirovina, biokonverzije supstrata u produkt u jednom stupnju, povećanja prinosa i razvoja novih procesa i proizvoda.

2.5. Biosinteza bakterijske celuloze

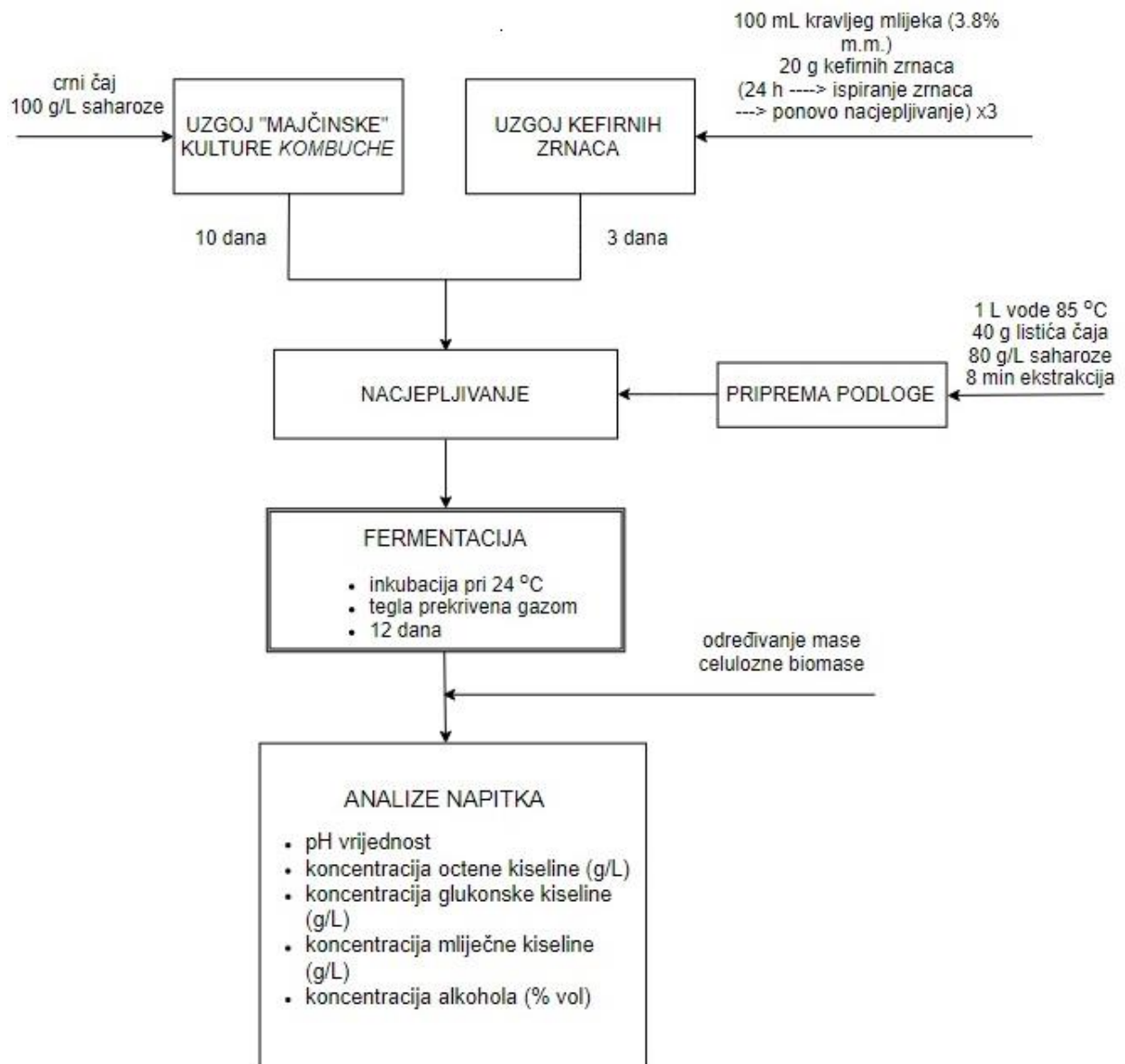
Biosinteza bakterijske celuloze je proces reguliran mnogobrojnim enzimima i regulacijskim proteinima. Iako mehanizam polimerizacije glukoze u celulozu kod bakterija nije potpuno poznat, mehanizam sinteze uridin-difosfoglukoze (UDPG) je dobro objašnjen. Biosinteza celuloze uključuje proizvodnju UDPG, koji je prekursor u sintezi celuloze, a zatim polimerizaciju glukoze β -1,4-glikozidnim vezama u celulozni lanac. Biosinteza celuloze u bakterijama je katalizirana celuloza sintazom. To je tipični membranski protein molekularne mase 400-500 kDa koji je vezan za citoplazmatsku membranu. Celuloza sintaza sadrži specifične aminokiseline i glukotransferaze u globularnoj regiji (Brown i Saxena, 2000). Sintaza bakterijske celuloze događa se između vanjske i plazmine membrane pomoću celuloza-sintetizirajućeg kompleksa vezanog za pore na površini bakterija. Pri tome nastaju tanke trake celuloze, prosječnog promjera od 10-20 do 30-40 Å, koje se nadograđuju jedna na drugu u horizontalnoj ravnini. Individualni celulozni lanci izlaze iz stanice, što uzrokuje pojavu vlaknaste strukture od mnogobrojnih celuloznih vlakana na površini stanice. Stvaranje tih lanaca uzrokuje nastajanje mikrofibrila (Slika 4). Bakterijska celuloza ima izvanredna mehanička svojstva jer je izgrađena od tankih vlakana koje formiraju mrežu jednolike strukture, imaju dobru kemijsku stabilnost, a kada se sabiju imaju planarnu orijentaciju (Torres i sur., 2012). Osim što se može koristiti za izradu papira i ambalaže zbog svojih mehaničkih svojstava, može se koristiti kao filtracijska membrana zbog svoje strukture i mikroporoznosti, u kozmetici kao maska za lice i gel za umivanje, u obradi otpadnih voda i kao biosorbent u bioremedijaciji, u biomedicini za tkivno inženjerstvo, regeneraciju tkiva i organa i zacjeljivanje rana zbog dobre biokompatibilnosti i kao funkcionalna hrana zbog visokog udjela vlakna i nutrijenata i male kalorijske vrijednosti. Ipak, potrebno je provesti istraživanja kako bi se poboljšala svojstva celuloze s obzirom na namjenu, povećala produktivnost zbog ekonomske isplativosti proizvodnje i našla rješenja na moguće probleme prilikom biosinteze. Veliki problem za industrijsku adaptaciju *A. xylinum* je nakupljanje otpadnih i štetnih metaboličkih nusproizvoda (Keshk, 2014), a to je možda moguće izbjeći uzgojem *A. xylinum* u kokulturi s drugim mikroorganizmima koji bi te metaboličke nusproizvode mogli iskoristiti i transformirati ih u neškodljive ili čak poželjne proizvode.



Slika4. Biosinteza celuloze s bakterijom *A. xylosum*. CS celuloza sintaza, UDPG uridin difosfoglukoza, G6PDH glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (Tal i sur., 1998)

3. MATERIJALI I METODE

Cjelokupni tijek istraživanja



Slika 5. Tijek cjelokupnog istraživanja

3.1. Uzgoj „majčinske“ kulture *kombuche*

Starter kultura *kombuche* je pripravljena zajedno s „majčinskom tekućinom“ u crnom čaju uz dodatak 100 g/L saharoze. Uzgoj je trajao 10 dana u aseptičnim uvjetima na sobnoj temperaturi.

3.2. Uzgoj kefirnih zrnaca

Starter kultura kefirnih zrnaca je pripravljena zajedno s „majčinskom hranjivom podlogom“ u kravljem mlijeku. Aktivacija kefirnih zrnaca provedena je pri sobnoj temperaturi (24°C). 20 g kefirnih zrnaca je dodano u 100 mL kravljeg mlijeka (3.8 % m.m.), a nakon 24 sata uzgoja zrnca su isprana sterilnom destiliranom vodom i ponovno naciepljena u 100 mL mlijeka. Ovaj je postupak proveden tri puta prije naciepljivanja u crni čaj.

3.3. Hranjiva podloga

3.3.1. Vrsta čaja

Uzgojena kefirna zrnca (4 % tež/vol) i *kombucha* (4 % tež/vol) naciepljena su u infuziju crnog čaja (Caylon tea, *Camellia sinensis*) proizvođača AHMAD TEA, London. Zemlja podrijetla: UK

Sastojci: 100 % list crnog čaja

3.3.2. Priprava kompleksne podloge (crni čaj)

Infuzija biljnog čaja je pripravljena dodatkom 40 g listića čaja u 1 L vode zagrijane na 85 °C u koju je dodano 80 g/L saharoze (bijeli konzumni šećer). Nakon ekstrakcije koja je trajala 8 minuta (naputak proizvođača je 5-8 minuta), čaj je ohlađen na sobnu temperaturu i filtrirani su čajni listići. Bistri filtrat je prelivenu sterilnu staklenu teglu s 1500 mL korisnog volumena. Naciepljeni uzorak svježeg uzgojenim kefirnim zrcima i *kombucha* kulturom inkubiran je pri 24°C (sobna temperatura) tijekom 12 dana, a supernatant je uporabljen za daljnja određivanja.

3.4. Određivanje pH vrijednosti

Odmah nakon nacjepljivanja, te tijekom i na kraju fermentacije, infuziji crnog čaja određivana je pH vrijednost pomoću pH metra Hanna Industrial model HI 98103.

3.5. Određivanje koncentracije octene kiseline

U Erlenmeyer tikvicu od 200 mL stavljeno je 1 mL uzorka fermentiranog crnog čaja, 20 mL vode i dodano nekoliko kapi fenolftaleina. Ovako pripremljeni uzorak je titriran otopinom 0.1 M NaOH do prve pojave ljubičaste boje. Koncentracija octene kiseline (mg/mL) izračunata je prema jednadžbi:

$$\chi(\text{CH}_3\text{COOH}) = V(\text{NaOH}) \cdot f(\text{NaOH}) \cdot V(\text{podloge}) \cdot 6 \quad (1)$$

gdje je:

$V(\text{NaOH})$ = utrošeni volumen 0.1 M NaOH (mL)

$f(\text{NaOH})$ = faktor 0.1 M NaOH (1.000)

V_{uzorka} = volumen uzorka (1 mL)

3.6. Određivanje koncentracije glukonske kiseline

U Erlenmeyer tikvicu od 200 mL stavljeno je 5 mL uzorka i dodano nekoliko kapi fenolftaleina. Ovako pripremljeni uzorak je titriran otopinom 0.1 M NaOH do prve pojave ljubičaste boje. Masena koncentracija glukonske kiseline (mg/mL) izračunata je prema jednadžbi:

$$\chi(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_7) = (V(\text{NaOH}) \cdot M(\text{NaOH}) \cdot 1.97) / V_{\text{uzorka}} \quad (2)$$

gdje je:

$V(\text{NaOH})$ = utrošeni volumen 0.1 M NaOH (mL)

$M(\text{NaOH})$ = molaritet NaOH (0.1 M)

V_{uzorka} = volumen uzorka (mL)

3.7. Određivanje koncentracije mliječne kiseline

U Erlenmeyer tikvicu od 200 mL stavljeno je 25 mL uzorka fermentiranog crnog čaja i dodano je nekoliko kapi fenolftaleina. Ovako pripremljeni uzorak je titriran otopinom 0.1 M NaOH do prve pojave ljubičaste boje. Svaki mL 0.1 M NaOH ekvivalentan je 90.08 mg mliječne kiseline. Masena koncentracija mliječne kiseline (mg/mL) izračunata je prema jednadžbi:

$$\gamma(\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}) = (V(\text{NaOH}) \cdot M(\text{NaOH}) \cdot 90,08) / V_{\text{uzorka}} \quad (3)$$

gdje je:

$V(\text{NaOH})$ = utrošeni volumen 0.1 M NaOH (mL)

$M(\text{NaOH})$ = molaritet NaOH (0.1 M)

V_{uzorka} = volumen uzorka (mL)

3.8. Određivanje alkohola kemijskom metodom

Udio alkohola u fermentiranim uzorcima fermentiranog crnog čaja tijekom previranja šećera do etanola i biooksidacije etanola do octene kiseline je određivan kemijskom metodom koja se zasniva na oksidaciji alkohola s kalijevim bikromatom ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) u kiselom okolišu.

Postupak:

U odmjernu tikvicu od 50 mL je stavljeno 5 mL uzorka čaja koji je razrijeđen s demineraliziranom vodom do 50 mL (odnos čaja i vode je 1:10). Uzorak je prebačen u tikvicu kruškastog oblika od 50 mL i neutraliziran s 0.1 M NaOH.

U Erlenmeyer tikvicu od 100 mL, u koju će se hvatati destilat, stavljeno je 10 mL otopine kalijevog bikromata i 5 mL koncentrirane H_2SO_4 . Destilat se preko hladila i lule uvodi u otopinu kalijevog bikromata u Erlenmeyer tikvicu od 100 mL, koja mora biti u rashlađenoj vodi. Destilacija mora biti polagana i postupna i traje dok se sadržaj u tikvici za destilaciju ne smanji na približno 3 mL (za to vrijeme je alkohol predestilirao). Po završetku destilacije lula je isprana s nekoliko mlazova destilirane vode u istu Erlenmeyer tikvicu u koju je uzorak predestilirao. Sadržaj tikvice je promućkan, začepljen gumenim čepom i ostavljen stajati 5 minuta radi potpune oksidacije alkohola. Zatim je sadržaj kvantitativno prebačen u Erlenmeyer tikvicu od 500 mL uz ispiranje, dodano mu je oko 200 mL destilirane vode radi

razrjeđenja i 10 mL 20%-tne otopine KI (radi određivanja preostale količine kalijevog bikromata) i ostavljeno začepljeno 5 minuta.

Nakon 5 minuta, uzorci su titrirani s 0.1 M otopinom natrijevog tiosulfata ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), pri čemu dolazi do oksidoredukcije između joda i natrijevog tiosulfata, u kojoj se jod reducira, a tiosulfat oksidira. Kad je boja postala svjetlija, dodano je 5 mL 1%-tne otopine škroba i titrirano do pojave tirkizno-zelene boje.

Koncentracija (vol %) alkohola je izračunata prema jednadžbi:

$$\text{alkohol (vol \%)} = \left(10 - \frac{a}{6.9}\right) \cdot 2 \quad (4)$$

a = utrošak 0.1 M otopine $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (mL)

3.9. Izračunavanje mase i prinosa celulozne biomase kokulture

Nakon 12 dana fermentacije, izmjerena je masa celulozne biomase (g) prema sljedećoj formuli:

$$m_{cb} \text{ (g)} = m_{bt} - (m_{ikz} + m_{ik}) \quad (5)$$

gdje je:

m_{cb} = masa celulozne biomase (g)

m_{bt} = masa biomase nakon uzgoja (g)

m_{ikz} = masa inokuluma kefirnih zrnaca (g)

m_{ik} = masa inokuluma *kombuche* (g)

Prinos celulozne biomase (Y_{cb}) je izračunat je prema formuli:

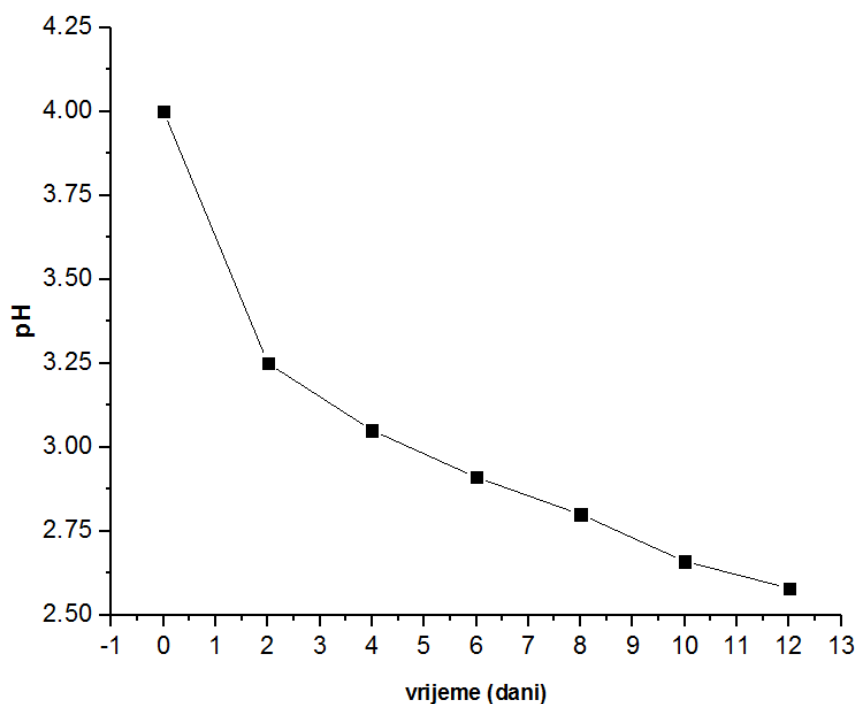
$$Y_{cb} \text{ (\%)} = \left(\gamma \text{ biomase nakon fermentacije} / \gamma \text{ saharoze na početku procesa}\right) \cdot 100 \quad (6)$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu je proučavana fermentacija crnog čaja s kokulturom kefirnih zrnaca i *kombuche*. Tijekom 12 dana aerobne fermentacije na sobnoj temperaturi, praćeni su različiti parametri: promjene pH vrijednosti fermentiranog čaja, koncentracije octene, glukonske i mliječne kiseline, etanola i kinetika nastajanja bakterijske celuloze (Slike 6-10).

4.1. Promjena pH vrijednosti

Optimalna pH vrijednost za rast kvasaca iz roda *Saccharomyces* je od 4,3 do 4,8, bakterija iz roda *Acetobacter* između 5,4 i 6,3, a bakterija iz roda *Lactobacillus* od 4,4 do 6,7. Rast se odvija i pri nižim pH vrijednostima, od 4,0 do 4,5, no minimalni rast je zabilježen pri pH 7,0 do 8,0 (Bergey i Holt, 1994). Rezultati dobiveni ovim istraživanjem ukazuju da su bakterije octene i mliječne kiseline iz kokulture kefirnih zrnaca i *kombuche* sposobne rasti, proizvoditi organske kiseline i bakterijsku celulozu čak i pri pH vrijednostima nižim od 2,7 (Slika 6).



Slika 6. Promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije crnog čaja s kokulturom kefirnih zrnaca i *kombuche*

Optimalne pH vrijednosti za rast bakterija i proizvodnju bakterijske celuloze ovise o rodovima ili vrstama bakterija i te se vrijednosti kreću između 4 i 7. Prema Son i suradnicima (2001), najbolji rezultati su dobiveni pri pH 6,5. U industrijskoj proizvodnji bakterijske celuloze za biomedicinske primjene (Biofill i Gengiflex), pH mora biti održavan na niskim vrijednostima, između 4 i 4,5, kako bi se izbjegle moguće kontaminacije podloge tijekom uzgoja (Jonas i Farah, 1998). Također je važno napomenuti da se pH vrijednost tijekom uzgoja može sniziti zbog nakupljanja sekundarnih metabolita, uglavnom organskih kiselina (octena, glukonska, mliječna), koje nastaju kao rezultat potrošnje izvora ugljika ili dušika. Zbog toga je u industrijskoj proizvodnji bakterijske celuloze izrazito važno održavanje pH podloge na vrijednosti na kojoj se postiže maksimalni prinos bakterijske celuloze, uz minimalnu mogućnost kontaminacije.

Pad pH vrijednosti započinje fermentacijom i sintezom organskih kiselina, ali nastajanje organskih kiselina nije jedini razlog smanjenja pH vrijednosti kefir. Postoji pH gradijent između kefirnih zrnaca i fermentacijske podloge. Kefirna zrnca su prirodno kisela, te se njihovom inokulacijom smanjuje pH vrijednost hranjive podloge.

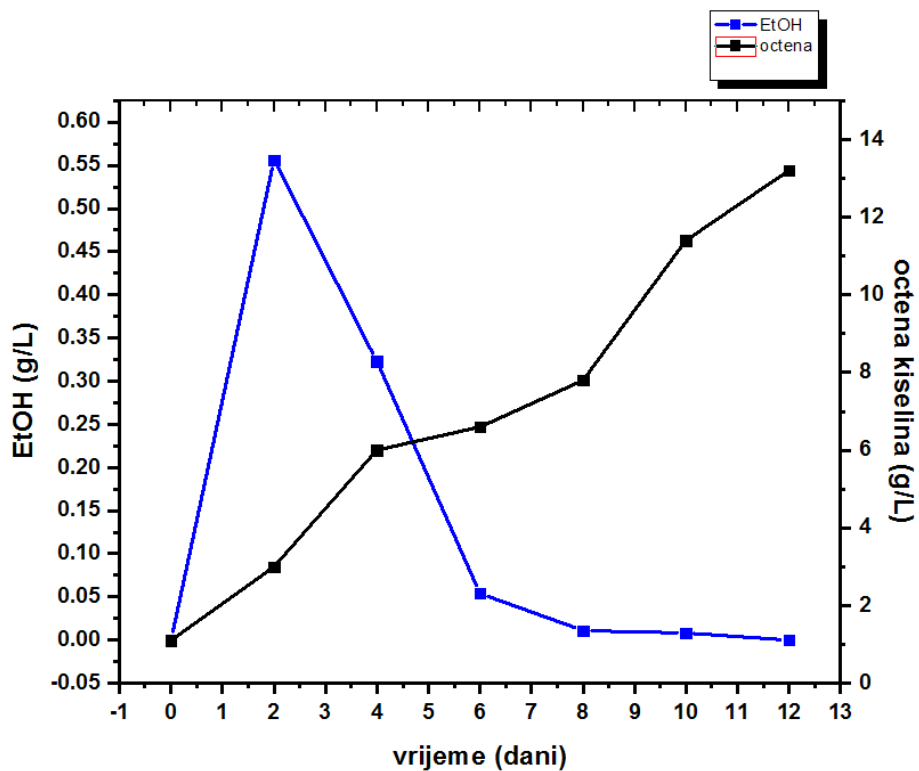
4.2. Organske kiseline i etanol

Tijekom fermentacije kefir i *kombuche* pH vrijednost bilo koje podloge se snižava zbog nastajanja organskih kiselina (Mikkelsen i sur., 2009). Kao posljedica povećanja koncentracije octene, glukonske i mliječne kiseline u fermentacijskoj podlozi, pH vrijednost se najčešće snižava s početne vrijednosti 5 na 3 tijekom 14 dana fermentacije (Chen i Liu, 2000; Sreeramulu i sur., 2000).

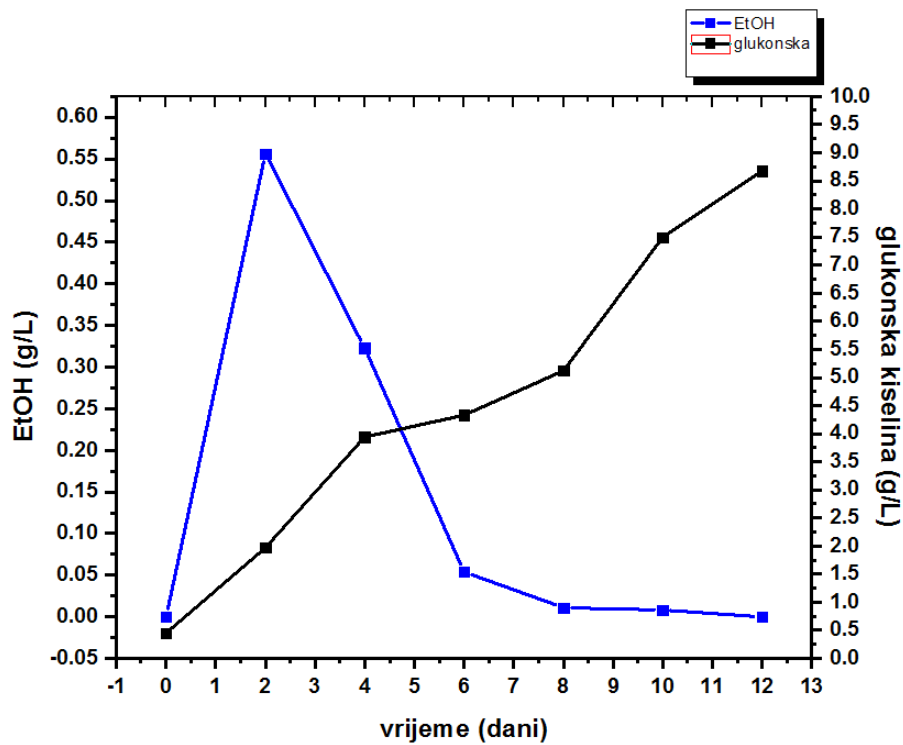
Koncentracije octene i glukonske kiseline izmjerene su u približnim vrijednostima (Slike 7 i 8). Ovisno o tome želi li se proizvoditi fermentirani *kombucha* napitak s kefirnim zrcima ili bakterijska celuloza, učinak početne koncentracije izvora ugljika u podlozi je izrazito važan jer nastajanje glukonske kiseline kao sporednog proizvoda rezultira snižavanjem pH hranjive podloge, a samim tim smanjenjem brzine i produktivnost sinteze bakterijske celuloze (Masaoka i sur., 1993).

Uzorci naciepljenih kefirnih zrnaca i *kombuche* uzgojeni su na tradicionalni način, pri čemu nije bio određivan mikrobiološki sastav uzoraka. Upravo zato određeno odstupanje između dobivenih rezultata u ovom radu i objavljenih u literaturi može biti posljedica različitosti mikroflore koja je dio ekološkog izvorišta naciepljenih kultura.

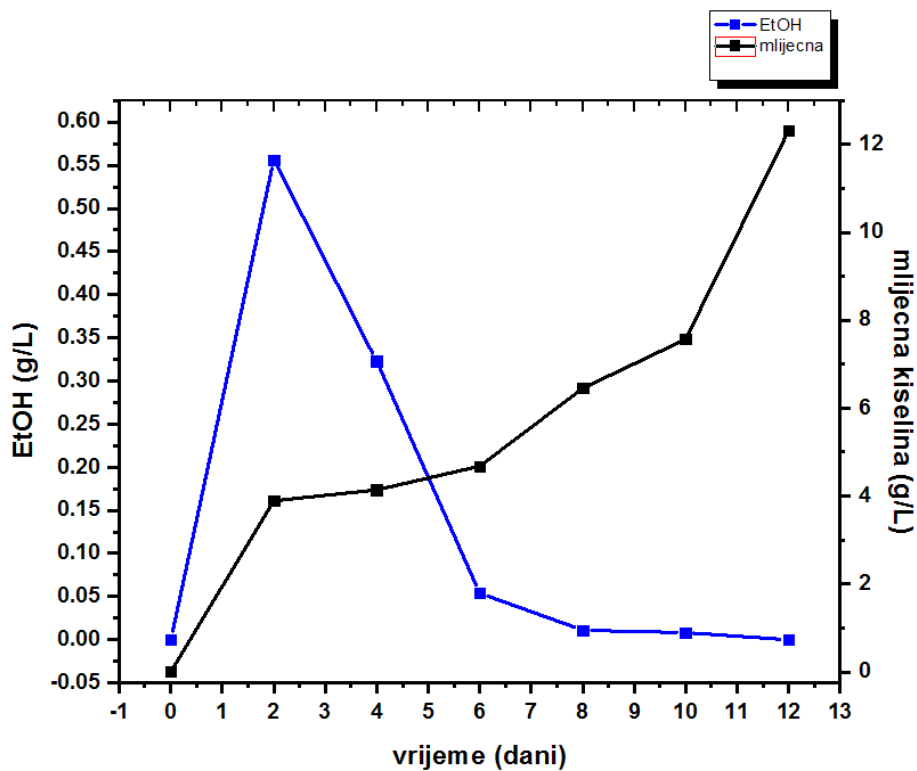
Kao što je i očekivano, kako se pH vrijednost uzoraka smanjivala, tako je rasla koncentracija organskih kiselina; koncentracija octene, glukonske i mliječne kiseline koje su određene u ovom radu (Slike 7 do 9). Nastajanje mliječne kiseline je rezultat metabolizma bakterija mliječne kiseline i vrlo je značajan zbog svog inhibicijskog djelovanja na patogene mikroorganizme i vrste koje izazivaju kvarenje kefiru (Magalhaes i sur., 2010). U svim istraživanim uzorcima uočena je najveća koncentracija octene kiseline (13,2 g/L), dok je koncentracija mliječne kiseline bila malo niža (12,32 g/L), a glukonske kiseline 8,67 g/L. Tijekom 12 dana fermentacije crnog čaja s kokulturom kefirnih zrnaca i *kombuche*, koncentracije mliječne kiseline je rasla s 3,89 g/L do 12,32 g /L na kraju fermentacije (Slika 9). Slične rezultate su postigli i Magalhaes i sur. (2011) na kravljem mlijeku, u kojem je koncentracija mliječne kiseline porasla s 1,4 na 17,4 g/L.



Slika 7. Promjena koncentracije octene kiseline tijekom 12 dana uzgoja kokulture kefirnih zrnaca i *kombuche* u crnom čaju



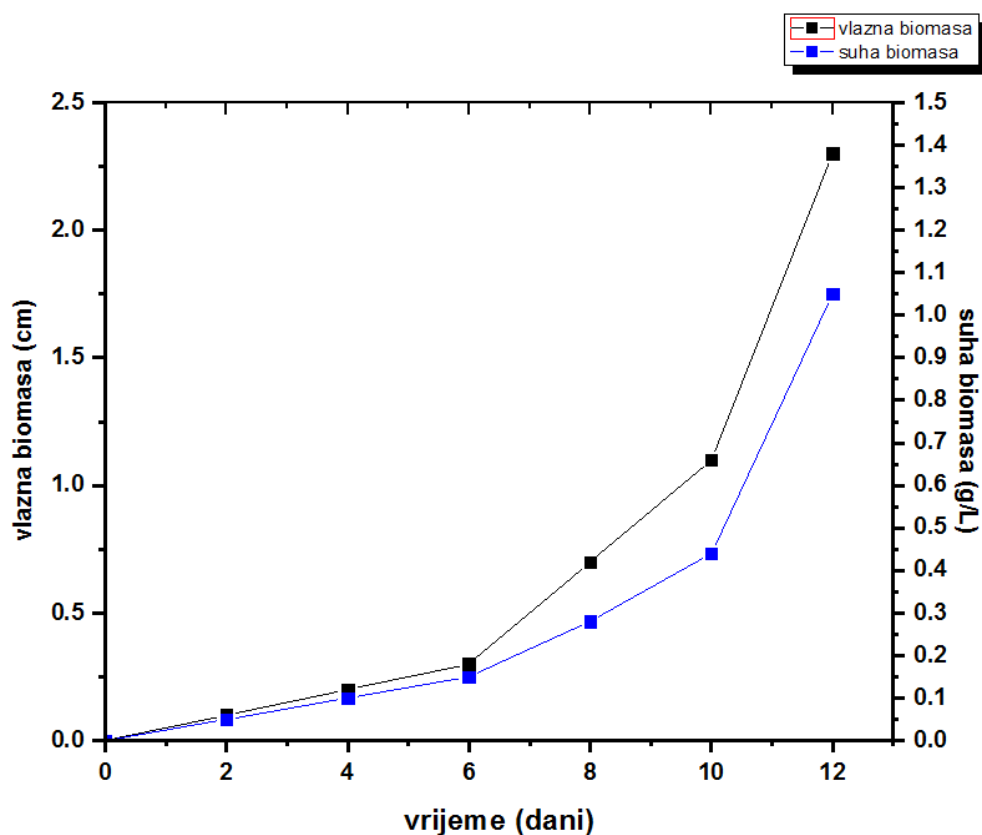
Slika 8. Promjena koncentracije glukonske kiseline tijekom 12 dana uzgoja kokulture kefirnih zrnaca i *kombuche* u crnom čaju



Slika 9. Promjena koncentracije mliječne kiseline tijekom 12 dana uzgoja kokulture kefirnih zrnaca i *kombuche* u crnom čaju

4.3. Sinteza bakterijske celuloze

Jedna od prvih i vidljivih proizvoda biotransformacije zaslađenog čaja tijekom fermentacije je celulozna opna (pelikula) koja se u tankom sloju oblikuje na površini tekućine (Slika 11). Na Slici 10 prikazana je kinetika nastajanja bakterijske celuloze iz koje je vidljivo linearno povećanje mase celuloze tijekom 12 dana uzgoja. Prinos biomase tijekom fermentacije je usko povezan s izvorom ugljika, odnosno supstratom. Prema dobivenim rezultatima, saharoza (80 g/L) je dobar supstrat jer je nakon 12 dana fermentacije izmjereno 2,3 cm vlažne bakterijske celuloze, odnosno 1,05 g/L suhe bakterijske biomase (Slika 10).



Slika 10. Utjecaj trajanja fermentacije na sintezu bakterijske celuloze u crnom čaju

Celuloznu pelikulu na površini održava CO_2 koji nastaje kao posljedica fermentativne aktivnosti kvasaca (Sievers i sur., 1995). Na površini celulozne pelikule nalazi se veliki broj bakterija octene kiseline, striktnih aeroba, kojima je za rast i razmnožavanje nužan atmosferski kisik, dok se s donje strane nalaze nakupine kvasaca, koji pripadaju fakultativno anaerobnim mikroorganizmima (Malbaša i sur., 2008). Nacijepljena kefirna zrnca, čiju

mikrofloru čine združena kultura bakterija mliječne kiseline koje su mikroaerofili i kvasaca, udvostručila su svoju masu tijekom fermentacije (Slika 12). Važno je napomenuti da postoje dvije vrste kefirnih zrnaca, mliječna, čiji krajnji proizvod je kefir, i vodena pomoću kojih se fermentiraju voćni i povrtni napitci (Malbaša i sur., 2008).



Slika 11. Sintetizirana celulozna opna kokulture kefirnih zrnaca i *kombuche* u crnom čaju nakon 36 sati fermentacije



Slika 12. Umnožena kefirna zrnca tijekom fermentacije crnog čaja u kokulturi s *kombuchom*

Za razliku od bakterijske celuloze sintetizirane tijekom fermentacije čaja pomoću *kombuche*, koja ima potpuno glatku površinu, u kokulturi s kefirnim zrnima sintetizirana je neravna površina na čijoj su površini vidljive nakupine kefirnih zrnaca (Slika 13a). Nakon nacjepljivanja, „majčinska“ kultura potone na dno staklene posude, no nakon 48 sati fermentacije, kao posljedica metaboličkog stvaranja CO₂, polako se podiže prema površini, te se u konačnici spaja s novo sintetiziranom bakterijskom celulozom (Slika 13b).



a



b

Slika 13. Prikaz površine sintetizirane bakterijske celuloze (a) i povezanosti „majčinske“ i sintetizirane bakterijske celuloze (b) nakon 12 dana fermentacije crnog čaja

5. ZAKLJUČCI

Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti:

1. U ovom radu je pripravljen napitak vrlo složenog sastava i velike nutritivne vrijednosti, dobiven fermentacijom crnog čaja s kefirnim zrnima i *kombuchom*.
2. Glavni produkti fermentacije crnog čaja su organske kiseline (mliječna, octena i glukonska) i etanol, a biotransformacijom je dobivena bakterijska celuloza, koja se u obliku tanke opne svakodnevno oblikovala na površini fermentiranog napitka.
3. Tijekom fermentacije crnog čaja, sniženje pH vrijednosti i koncentracije etanola bilo je u pozitivnoj korelaciji s povećanjem koncentracija mliječne, octene i glukonske kiseline.

6. LITERATURA

Angulo, L., Lopez, E., Lema, C. (1993) Microflora present in kefir grains of the Galician region (North-west of Spain). *Journal of Dairy Resources* **60**: 263-267.

Bader, J., Mast-Gerlach, E., Popović, M. K., Bajpai, R., Stahl, U. (2010) Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology* **109**: 371-387.

Balentine, D. A., Wiseman, S. A., Bouwens, L. C. (1997) The chemistry of tea flavonoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **37**: 693-704.

Bauer-Petrovska B., Petrushevska –Tozi, L. (2000) Mineral and water soluble vitamin content in the kombucha drink. *International Journal of Food Science and Technology* **35**: 201-205.

Benkerroum, N., Daoudi, A., Hamraoui, T., Ghalfi, H., Thiry, C., Duroy, M., Evrart, P., Roblain, D. (2005) Lyophilized preparations of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* as potential protective adjuncts to control *Listeria monocytogenes* in dry-fermentative sausages. *Journal of Applied Microbiology* **98**: 56-63.

Bergey, D.H., Holt, J.G. (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, *Williams & Wilkins* **9**, USA.

Beruga, M. I., Jaspe, A., San Jose C. (1997) Selection of yeast strains for lactose hydrolysis in dairy effluents. *International Biodeterioration and Biodegradation* **40**: 119-123.

Boesch, C., Trcek, J., Sievers, M., Teuber, M. (1998) *Acetobacter intermedius*, sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* **21**: 220-229.

Cheirsilp, B., Shimizu, H., Shioya, S. (2003) Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefirifaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology* **100**: 43-53.

Chen, C., Liu, B. Y. (2000) Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *Journal of Applied Microbiology* **89**: 834-839.

Chu, S. C., Chen C. S. (2006) Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chemistry* **98**: 502-207.

Cloughley J. B., Ellis R. T., Pelnington, S., Humphrey P. (1982) Volatile constituents of some Central Africa black-tea clones. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **80**: 842-845.

Crespy V., Williamson G. (2004) A review of the health effects of green tea catechins in *in vivo* animal models. *Journal of Nutrition* **134**: 534-540.

de Moreno de LeBlanc, A., Matar, C., Farnworth, E., Perdigon, G. (2006) Study of immune cells involved in the antitumor effect of kefir in a murine breast cancer model. *Journal of Dairy Science* **90**: 1920-1928.

Dufresne, C., Farnworth, E. (2000) Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Research International* **33**: 409-421.

Dutta, D., Gachhui, R. (2006) Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrogenifigens* sp. nov., isolated from kombucha tea. *International Journal of Systematic Evolution and Microbiology* **56**: 1899-1903.

Dutta, D., Gachhui, R. (2007) Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter kombuchae* sp. nov., isolated from kombucha tea. *International Journal of Systematic Evolution and Microbiology* **57**: 353-357.

Engel, G., Krusch, U., Teuber, M. (1986) Microbiological composition of kefir. I. Yeasts. *Milchwissenschaft* **41**: 418-421.

Ergüllü, E., Üçüncü, M. (1983) Studies on kefir microflora. *Food* **8**: 3-10.

Garbers, I. M., Britz, T. J., Witthuhn, R. C. (2004) PCR-based DGGE typification and identification of the microbial consortium present in Kefir grains. *Worlds Journal of MicrobialBiota* **20**: 687-693.

Garrote, G. L., Abreham, A. G., De Antoni, G. L. (2001) Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Resources* **68**: 639-652.

Guzel-Seydim Z., Kok-Tas T., Greene A. K., Seydim A. C. (2011) Review: Functional Properties of Kefir. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **51**: 261-268.

Holzappel, W. H., Schillinger, U. (2002) Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International* **35**: 109-116.

Hoon L. Y., Choo, C., Watawana, M. I., Jayawardena, N., Waisundara, V. Y. (2014) Keshk, S. M. A. S. (2014) Bacterial Cellulose Production and its Industrial Applications. *Journal of Bioprocess and Biotechnology* **4**:150-156.

Howard G.E. (1978) The volatile constituents of tea. *Food Chemistry* **4**: 79-106.

Jansen, M., Geeraerd, A. H., Logist, F., De Visscher, Y., Vereecken, K. M., Debevere, J., Devlieghere, F., Van Impe, J. F. (2006) Modelling *Yersinia enterocolitica* inactivation in coculture experiments with *Lactobacillus sakei* as based on pH and lactic acid profiles. *International Journal of Food Microbiology* **111**: 59-72.

Jarrell J., Cal, T., Bennett, J. W. (2000) The Kombucha Consortia of yeasts and bacteria. *Mycologist* **14** (4): 166-170.

Jayabalan, R., Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas J. S., Sathishkumar M. (2014) A Review on Kombucha Tea – Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity and Tea Fungus. *Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety* **13**: 538-550.

Jayabalan R., Malini, K., Sathishkumar, M., Swaminathan K., Yun S. (2010) Biochemical Characteristics of Tea Fungus Produced During Kombucha Fermentation. *Food Science and Biotechnology* **19**(3): 843-847.

Keller, L., Surette, M. G. (2006) Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Natural Review in Microbiology* **4**: 478-482.

Kojic, M., Lozo, J., Begovic, J., Jovcic, B. (2007) Topisirovic, L: Characterisation of lactococci isolated from homemade kefir. *Archives in Biological Sciences* **59**: 13-22.

Kok-Tas, T. (2010) Effects of controlled atmosphere application on kefir grains and kefir. PhD thesis. Suleyman Demirel University, Isparta, Turkey

Iwasawa, S., Ueda, M., Miyata, N., Hirota, T., Ahiko, K. (1982) Identification and fermentation character of kefir yeast. *Agriculture and Biological Chemistry* **46**: 2631-2636.

Jonas, R., Farah, L. F. (1998) Production and application of microbial cellulose. *Polymers Degradation and Stability* **59**: 101–106.

Latorre-Garcia, L., del Castillo-Agudo, L., Polaina, J. (2007) Taxonomical classification of yeasts isolated from kefir based on the sequence of their ribosomal RNA genes. *World Journal of Microbial Biotechnology* **23**: 785.

Lin, C. W., Chen, H. L., Liu, J. R. (1999) Identification and characterization of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir grains in Taiwan. *Australian Journal of Dairy Technology* **54**:14.

Liu, C. H., Hsu, W. H., Lee, F. L., Liao, C. C. (1996) The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation. *Food Microbiology* **13**: 407-415.

Magalhães, K., de M. Pereira, G., Dias, D., Schwan, R. (2010) Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **26(7)**: 1241–1250.

Magalhães, K., de M. Pereira, G., Campos, C. R., Dragone, G., Schwan, R. (2011) Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. *Brazilian Journal of Microbiology* **42(2)**: 693-702.

Mainville, I., Robert, N., Lee, B. H., Farnworth, E. R. (2005) Polyphasic characterization of the lactic acid bacteria in kefir. *Systematic and Applied Microbiology* **29**:1, 59-68.

Malbaša, R.V., Lončar, E.S., Vitas, J.S., Čanadanović-Brunet, J.M. (2011) Influence of starter cultures on the antioxidant activity of Kombucha beverage. *Food Chemistry* **127**: 178–184.

Marsh, J.A., O'Sullivan, O.O., Hill, C., Ross, P.R., Cotter, P.D. (2014) Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple Kombucha (teafungus) samples. *Food Microbiology* **38**: 171–178.

Marshall, V. M. (1993) Starter cultures for milk fermentation and their characteristics. *Journal of Society of Dairy Technology* **46**: 49-56.

Malbaša, R., Lončar, E., Djurić, M., Došenović, I. (2008) Effect of sucrose concentration on the products of Kombucha fermentation on molasses. *Food Chemistry* **108**: 926-932.

Masaoka, S., Ohe, T., Sakota, N. (1993) Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **75**: 18-22.

Meyer, V., Stahl, U. (2003) The influence of co-cultivation on expression of the antifungal protein in *Aspergillus giganteus*. *Journal of Basic Microbiology* **43**: 68-74.

Mikkelsen, D., Flanagan, B. M., Dykes, G. A., Gidley, M. J. (2009) Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconobacter xylinus* strain ATCC 53524. *Journal of Applied Microbiology* **107**: 576-583.

Mobili, P., Londero, A., Maria, T. M. R., Eusébio, M.E.S., De Antoini, G. L., Fausto, R., Gómez-Zavaglia, A. (2008) Characterization of S-layer proteins of *Lactobacillus* by FTIR spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Vib Spectroscopy* **50**:1, 68-77.

Moller, S., Sternberg, C., Andersen, J. B., Christensen, B. B., Ramos, J. L., Givskov, M., Molin, S. (1998) In situ gene expression in mixed-culture biofilms: evidence of metabolic interactions between community members. *Applied and Environment Microbiology* **64**: 721-732.

Möller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N., Schrezenmier, J. (2008) Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects. *European Journal of Nutrition* **47**: 171-182.

Nguyen, N. K., Dong, N. T. N., Nguyen, H. T., Le, P. H. (2015) Lactic acid bacteria: promising supplements for enhancing the biological activities of kombucha. *SpringerPlus* **4**:91.

Ottogalli, G., Galli, A., Resmini, P., Volonterio, G. (1973) Composizione microbiologica, chimica ed ultrastruttura dei granuli di kefir. *Annuario Microbiologica* **23**: 109-121.

Rohm, H., Eliskases-Lechner, F., Braver, M. (1992) Diversity of yeasts in selected dairy products. *Journal of Applied Bacteriology* **72**: 370-376.

Reimersma R. A., Rice-Evans C. A., Tyrrell R. M., Clifford M. N. (2001) Tea flavonoids and cardiovascular health. *Quarterly Journal of Medicine* **94**: 277-282.

Reiss, J. (1994) Influence of different sugars on metabolism of the tea fungus. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **198**: 258-261.

Rosi, J., Rossi, J. (1978) The kefir microorganisms: The lactic acid bacteria. *Science of Technology Lattiero Casearia* **29**: 291-305.

Qian, M., Tian, S., Li, X., Zhang, J., Pan, Y., Yang, X. (2006) Ethanol production from dilute-acid softwood hydrolysate by co-culture. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **134**: 273-284.

Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto J., Mattila-Sand-Holm, T. (2000) Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology* **84**: 197-215.

Sajilata, M.G., Bajaj, P. R., Singhal, R. S. (2008) Tea Polyphenols as Nutraceuticals. *Comprehensive reviews in food science and food safety* **7**: 229-254.

Santos, A., San Mauro, M., Sanchez, A., Torres, J. M., Marquina, D. (2003) The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. *Systematic and Applied Microbiology* **26**: 434-437.

Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sanholm, T., de Vos, W. M. (2005) Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Current Opinion in Biotechnology* **16**: 204-211.

Schwenninger, S. M., Meile, L. (2004) A mixed culture of *Propionibacterium jensenii* i *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* inhibits food spoilage yeasts. *Systematic and Applied Microbiology* **27**: 229-237.

Seydim, Z. B. (2001) Studies on fermentative, microbiological and biochemical properties of kefir and kefir grains. Ph.D. Dissertation. Clemson University, Clemson, SC.

Shah, N. P. (2007) Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal* **17**: 1262-1277.

Sievers M., Lanini C., Weber A., Schuler-Schmid U., Teuber M. (1996) Microbiology and Fermentation Balance in a Kombucha Beverage Obtained from a Tea Fungus Fermentation. *Systematic and Applied Microbiology* **18**: 590-594.

Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, T., Frengova, G., Spasov, Z. (2002) Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **28**: 1-6.

Simova, E., Simov, Z., Beshkova, D., Frengova, G., Dimitrov, Z., Spasov, Z. (2005) Amino acid profiles of lactic acid bacteria isolated from kefir grains and kefir starter made from them. *International Journal of Food Microbiology* **107**:8, 112-123.

Sodini, I., Latrille, E., Corrieu, G. (2000) Identification of interacting mixed cultures of lactic acid bacteria by their exclusion from a model predicting the acidifying activity of non-interacting mixed cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* **54**: 715-718.

Son, H. J., Heo, M. S., Kim, Y. G., Lee, S. J. (2001) Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **33**: 1-5.

Sreeramulu G., Zhu Y., Knol W. (2000) Kombucha Fermentation and Its Antimicrobial Activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **48**: 2589-2594.

Valasaski, K., Staikou, A., Theodorou, L. G., Charamopoulou, V., Zacharaki, P., Papamichae, E. M. (2008) Purification and kinetics of two novel thermophilic extracellular proteases from

Lactobacillus helveticus, from kefir with possible biotechnological interest. *Bioresource Technology* **9**:13, 5804-5813.

Vinderola, G. C., Perdigo'n, G., Duarte, J., Farnworth, E., Matar, C. (2007) Effects of the oral administration of the products derived from milk fermentation by kefir microflora on immune stimulation. *Journal of Dairy Resources* **73**: 472-479.

Vitas, J. S., Malbaša, R. V., Grahovac, J. A., Lončar, E. S. (2013) The antioxidant activity of kombucha fermented milk products with stinging nettle and winter savory. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* **19**: 129-139.

Wang, S. Y., Chen, H. C., Liu, J. R., Lin, Y. C., Chen M. J. (2008) Identification of yeasts and evaluation of their distribution in Taiwanese kefir and Viili starters. *Journal of Dairy Science* **91**: 3789-3805.

Wang, Y., Ji, B. P., Wu, W., Wang, R. J., Yang, Z. W., Zhang, D., Tian, W. L. (2014) Hepatoprotective effects of kombucha tea: identification of functional strains and quantification of functional components. *Journal of Science and Food Agriculture* **94**: 265-272.

Weisburger J. H. (2003) Prevention of coronary heart disease and cancer by tea, a review. *Environment Health PreviewMedicine* **7**: 283-288.

Takeo T., Mahanta P. K. (1983) Comparison of black tea aromas of orthodox and CTC tea and of black tea made from different varieties. *Journal of Science and Food Agriculture* **34**: 307-310.

Takizawa, S., Kojima, S., Tamura, S., Fujinaga, S., Benno, Y., Nakase, T. (1994) *Lactobacillus kefrigranum* sp. nov. and *Lactobacillus parakefir* sp. nov., two new species from kefir grains. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**: 435-439.

Tan, L. L., Ren, L., Cao Y. Y., Chen, X. L., Tang, X. Y. (2012) Bacterial cellulose synthesis in kombucha by *Gluconoacetobacter* sp. and *Saccharomyces* sp. *Advanced Material Resources* **554-556**: 1000-1003.

Torres, F. G., Commeaux, S., Troncoso, O. P. (2012) Biocompatibility of Bacterial Cellulose Based Biomaterials. *Journal of Functional Biomaterials* **3**(4): 864-878.

Yang, Z., Zhou F., Ji, B., Li, B., Luo, Y., Yang, L., Li, T. (2010) Symbiosis between Microorganisms from Kombucha and Kefir: Potential Significance to the Enhancement of Kombucha Function. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **160**: 446-455.

Yara, R., Maccheroni, W. Jr., Horii, J., Azevedo, J. L. (2006) A bacterium belonging to the *Burkholderia cepacia* complex associated with *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Microbiology* **44**: 263-268.

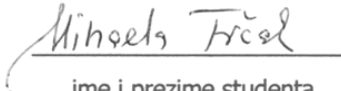
Yoshida, T., Toyoshima, K. (1994) Lactic acid bacteria and yeasts from kefir. *Journal of Japanese Society of Nutrition Food Sciences* **47**: 55-59.

Yoshino, T., Asakura, T., Toda, K. (1996) Cellulose production by *Acetobacter pasteurianus* on silicone membrane. *Journal of Fermented Bioengineering* **81**: 32-36.

Yuksekdag, Z. N., Beyatli, Y., Aslim, B. (2004) Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* **37**: 663-667.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.


ime i prezime studenta