

Fermentacija, biosinteza bakterijske nanoceluloze i antimikrobna aktivnost kombuche uzgojene u kokosovoj vodi

Nemec, Vili

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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:159:937205>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Vili Nemeč

7190/BT

**FERMENTACIJA, BIOSINTEZA BAKTERIJSKE NANOCELULOZE I
ANTIMIKROBNA AKTIVNOST *KOMBUČE* UZGOJENE U KOKOSOVOJ VODI**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 2

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

Zagreb, 2018.

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

FERMENTACIJA, BIOSINTEZA BAKTERIJSKE NANOCELULOZE I ANTIMIKROBNA AKTIVNOST *KOMBUCHÉ* UZGOJENE U KOKOSOVOJ VODI

Vili Nemeč, 7190/BT

Sažetak: Celuloza je fascinantna i obnovljiva prirodna polimerna sirovina koju karakteriziraju izvrsna svojstva poput hidrofilitnosti, kiralnosti, biorazgradivosti, širokog spektra svojstava kemijskih modifikacija, te stvaranja različitih morfologija polukristaliničnih vlakana. U ovom je radu istraživana uzgoj kombuche u aerobnim uvjetima tijekom 14 dana fermentacije u kokosovoj vodi, na sobnoj temperaturi, uz dodatak različitih koncentracija saharoze. Praćene su promjene pH vrijednosti, koncentracije etanola, octene, glukonske i mliječne kiseline, kao i prinos bakterijske nanoceluloze (BNC). Istraživana je kinetika otpuštanja vode iz sintetizirane BNC, a rezultati su potvrdili da su uzorci pogodni za ublaživanje rana. Antimikrobna aktivnost je BNC testirana je na bakterijama *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* i *Bacillus subtilis*, te kvascu vrste *Candida albicans*. Uočena je antimikrobna aktivnost *kombuche* na bakterije, no ne i na kvasac *Candida albicans*.

Ključne riječi: *kombucha*, organske kiseline, bakterijska nanoceluloza, kinetika otpuštanja vode, antimikrobna aktivnost

Rad sadrži: 35 stranica, 15 slika, 4 tablice, 67 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: rujan 2018.

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

FERMENTATION, BACTERIAL NANOCELLULOSE SYNTHESIS, AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *KOMBUCHA* IN FERMENTED COCONUT WATER

Vili Nemec, 7190/BT

Abstract: Cellulose is a fascinating and sustainable natural polymeric raw material characterized by exciting properties such as hydrophilicity, chirality, biodegradability, broad chemical-modifying capacity, and the formation of different semicrystalline fiber morphologies. This work studies cultivation of *kombucha* in aerobic conditions over a period up to 14 days of fermentation in coconut water, at room temperature with different sucrose concentrations added. Changes in pH value, ethanol, acetic acid, gluconic acid, and lactic acid were observed, as well as yield of bacterial nanocellulose (BNC). The water release rate (WRR) were investigated, and the results supported its anticipated use as antimicrobial wound dressing material. The antimicrobial activity of BNC was tested against bacteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* and *Bacillus subtilis*, as well as yeast *Candida albicans*. Antimicrobial activities were observed in the fermented samples against all the investigated bacteria strains, but *Candida albicans* was not inhibited by *kombucha*.

Keywords: *Kombucha*, Organic acids, Bacterial nanocellulose, Water release kinetics, Antimicrobial activity

Thesis contains: 35 pages, 15 figures, 4 tables, 67 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, 2018

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Bakterijska nanoceluloza	3
2.2. Biosinteza bakterijske nanoceluloze	3
2.3. Biotehnološki pristup proizvodnji bakterijske nanoceluloze.....	5
2.4. Primjena bakterijske nanoceluloze.....	8
2.4.1. Biomedicinska i farmaceutska primjena.....	9
3. MATERIJALI I METODE	11
3.1. Cjelokupni tijek istraživanja	11
3.2. Materijali i metode rada.....	12
3.2.1. Priprava <i>kombuche</i>	12
3.2.2. Određivanje pH vrijednosti	13
3.2.3. Određivanje koncentracije octene kiseline.....	13
3.2.4. Određivanje koncentracije glukonske kiseline	13
3.2.5. Određivanje koncentracije mliječne kiseline.....	14
3.2.6. Određivanje alkohola kemijskom metodom	14
3.2.7. Izračunavanje prinosa celulozne biomase <i>kombuche</i>	15
3.2.8. Određivanje brzine otpuštanja vode (<i>eng.</i> Water-Release Rate; WRR).....	15
3.2.9. Određivanje antimikrobne aktivnosti.....	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1. Promjena pH vrijednosti	17
4.2. Promjena koncentracija organskih kiselina i etanola	18
4.3. Sinteza bakterijske celuloze	22
4.4. Kinetika otpuštanja vode (WRR).....	24
4.5. Antimikrobna aktivnost.....	25
5. ZAKLJUČCI	28
6. LITERATURA	29

1. UVOD

Kombucha je tradicionalni fermentirani napitak s prošlošću starom nekoliko tisuća godina na dalekom istoku, smatra se da potječe iz Kine, a sada je sve popularniji diljem Europe, sjeverne Amerike i Sjeverne Afrike. *Kombucha* se tradicionalno proizvodi u mnogim zemljama, posebice u Rusiji i Ukrajini, fermentiranjem čajeva pomoću, u narodu zvane „čajne gljive“, koja se prenosi od kuće do kuće. U posljednje vrijeme se u razvijenim zemljama povećala zainteresiranost za ovim napitkom, što je prepoznala i prehrambena industrija, pa se u trgovinama zdrave hrane mogu naći komercijalni proizvodi novije generacije (Malbaša i sur., 2008).

Kombucha je osvježavajući, blago gazirani napitak s okusom čaja ili soka u kojem je uzgajana. Tijekom fermentacije okus *kombuche* se mijenja od blago kiselog okusa s gaziranom aromom, no nakon dulje fermentacije okus ima izraženiju octenu notu (Sievers i sur., 1995).

Istraživanja su pokazala da konzumiranje *kombuche* pozitivno utječe na probavni, intestinalni i endokrini sustav, te može pomoći ublažavanju tegoba kod arterioskleroze, ubrzati izlučivanje toksina i ublažiti dijabetes. Također može djelovati kao laksativ, a poznato je da olakšava simptome reumatizma zglobova, giht i tegobe s hemoroidima (Dufresne i Farnworth, 2000). Ljekoviti učinci konzumiranja *kombuche* mogu se povezati s gubitkom tjelesne mase, čak i izlječenjem raka i AIDS-a (Teoh i sur., 2004). Nedavno je dokazano da *kombucha* ima sposobnost vezanja slobodnih radikala i antioksidacijsku aktivnost (Jayabalan i sur., 2008; Malbaša i sur., 2011).

Celuloza je najzastupljeniji biopolimer na svijetu, čineći oko 1,5 milijardi tona ukupne godišnje proizvodnje biomase. Bakterijska nanoceluloza (BNC) je visoko kristalinični glukozni polimer promjera vlakana manjeg od 100 nm, koju sintetizira bakterija *Gluconacetobacter xylinus* (prije *Acetobacter xylinum*) oksidativnom fermentacijom u kompleksnim ili kemijski definiranim podlogama (Chawla i sur., 2009). Ta mikrovlakna su poslagana u 3D mrežne strukture, pri čemu oblikuju mikrofibrile i time se stvara fibrilarna vrpca agregacijskim slaganjem jednog do drugog fibrila, koja rezultira visokom kristaliničnošću strukture (Czaja i sur., 2004). Sintetizirana BNC privlači sve više pažnje istraživača u području biomedicinskih znanosti zbog svoje jedinstvene strukture i svojstava. Karakteristike poput visoke vlačne čvrstoće, izrazito hidrofилne površine, homologne strukture s nativnim ekstracelularnim matriksom, jedinstvenom nanostrukturom i izvrsnom biorazgradivošću, čine BNC obećavajućim i poželjnim materijalom u prehrambenoj i biomedicinskoj primjeni.

Čimbenici koji utječu na sintezu BNC većinom su sastav hranjive podloge, okolišni uvjeti i nastajanje sporednih produkata, većinom organskih kiselina (octena, glukonska i mliječna),

te etanola, tako da su u ovom radu ispitivani ključni čimbenici za sintezu BNC uzgojene u kokosovoj vodi tijekom 14 dana fermentacije.

Tijekom fermentacije provedene pomoću *kombuche* u kokosovoj vodi praćeni su i određivani sljedeći parametri:

- promjena pH vrijednosti
- promjena koncentracije etanola, octene, glukonske i mliječne kiseline u aerobnim uvjetima uzgoja tijekom 14 dana fermentacije
- prinos BNC sintetizirane u kokosovoj vodi
- kinetika otpuštanja vode iz BNC
- antimikrobna aktivnost fermentiranog napitka

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Bakterijska nanoceluloza

Celuloza je najprisutniji prirodni polimer na Zemlji. Prema procjeni, u cijelom svijetu se proizvodi 10^{14} t celulozne pulpe godišnje, naglašavajući ekonomsku važnost polimera (Lin i sur., 2014). Zbog prisutnosti drugih komponenti osim celuloze, različiti kemijski postupci koji upotrebljavaju jako zagađujuće kemijske proizvode, kao što su plinoviti klor, natrijeva lužina, ugljikov disulfid, ugljikov monoksid i ugljikov dioksid, često se moraju koristiti kako bi se dobila čista celuloza (Basta i El-Saied, 2009; Klemm i sur., 2011).

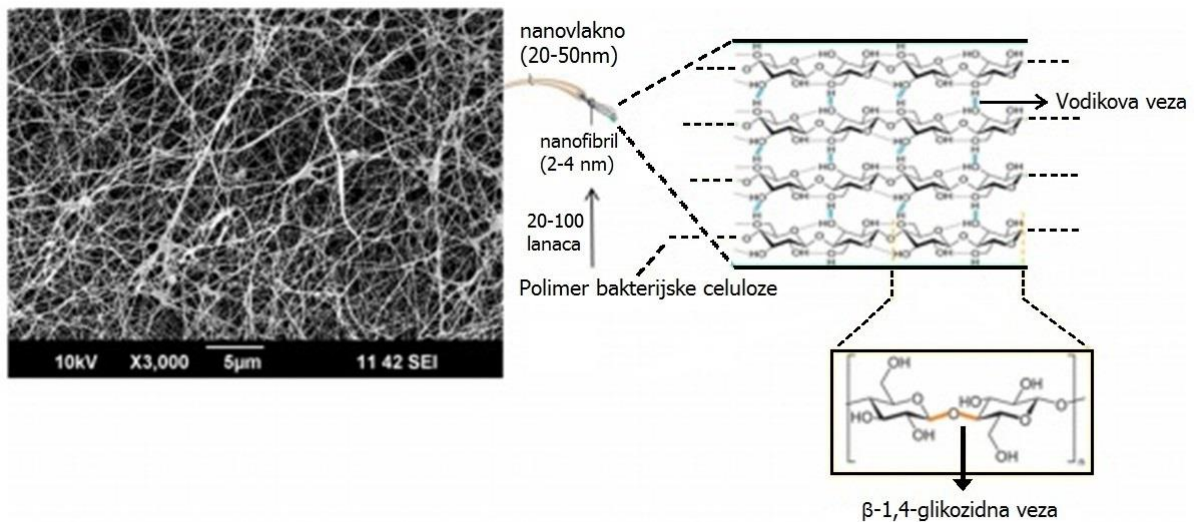
Jang i sur. (2017) su usporedili produktivnost celuloze dobivene iz biljaka i mikroorganizmima kako bi se odredile prednosti proizvodnje celuloze iz mikroorganizama. U svojoj analizi su usporedili proizvodnju celuloze iz 1 hektara eukaliptusa sa srednjim godišnjim povećanjem (MAI) od 50 m^3 , pružajući osnovnu gustoću od 500 kg/m^3 ; ovo je tvorilo MAI od 25 t/ha/godini . Tijekom 7 godina od sjetve do kultivacije, dajući oko 45% udjela celuloze, ovaj proces bi omogućio produktivnost od oko 80 t celuloze/ha . Autori su ustanovili da bi se ista proizvodnja mogla doseći s bakterijom do hipotetskog prinosa od 15 g/L s 50 h kulture (prosjek od $0,3 \text{ g/h}$) u bioreaktoru od 500 m^3 u približno 22 dana. Ova efikasnija metoda proizvodnje je također dala čistu i ekološki održivu BNC kao proizvod.

Za razliku od celuloze iz biljaka, BNC se proizvodi u čistoj strukturi, bez lignina, hemiceluloze, pektina ili bilo kojeg drugog sastojka prisutnog u biljnoj pulpi i ne sadrži sastojke životinjskog podrijetla. Nadalje, ima bolja mehanička svojstva u usporedbi s biljnom celulozom (Fu i sur., 2013).

2.2. Biosinteza bakterijske nanoceluloze

Anhidroglukozne jedinice i različiti fibrili bakterijske celuloze uzajamno djeluju jedni na druge stvarajući kristaličnu strukturu pomoću unutarnjih i vanjskih vodikovih veza, rezultirajući zbijanjem vlakana koja su potpuno netopljiva u vodi, ali mogu biti hidratizirana (Lynd i sur., 2002; Conley i sur., 2016). Tanka nanovlakna imaju promjer $20\text{-}100 \text{ nm}$, s velikom površinom po volumenu (Slika 1), a ovo svojstvo, zajedno sa hidrofilnom prirodom BNC rezultira velikim kapacitetom apsorpcije vode, boljem prijanjanju i većem udjelu vlage (Fu i sur., 2013; Numata i sur., 2015a). Ta svojstva, zajedno sa specifičnim fizikalnim i mehaničkim svojstvima molekule, uključujući njenu netopljivost, brzu biorazgradivost, čvrstoću, elastičnost, izdrživost te netoksična i nealergena svojstva, čine BNC idealnu za

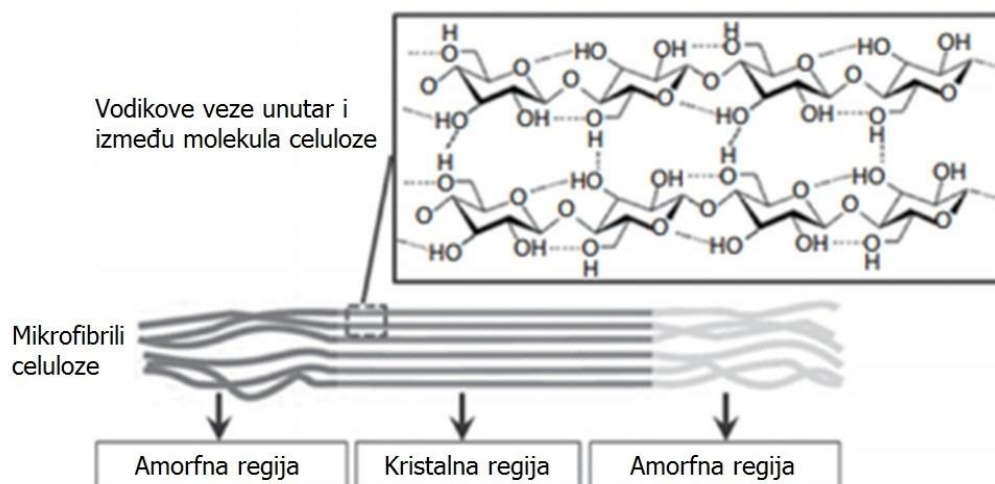
produkciju nekoliko proizvoda s visokom dodanom vrijednošću, poput umjetne kože koja se koristi kao privremena zamjena u liječenju opekлина i drugih kožnih ozljeda (Thompson i Hamilton, 2001; Rehim i sur., 2014; Cakar i sur., 2014).



Slika 1. SEM fotografija i strukturni prikaz BNC nanovlakana (Conley i sur., 2016)

BNC je izrazito kristalinični linearni polimer glukoze sintetiziran uglavnom pomoću bakterije *Gluconacetobacter xylinus* (prije zvana *Acetobacter xylinum*). Iako je proizvodnja BNC prvenstveno proučavana na *G. xylinus*, drugi mikroorganizmi također pokazuju sposobnost sintetiziranja ovog biopolimera, poput drugih vrsta bakterija *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium spp.*, i gram pozitivnih *Sarcina ventriculli* (Tanskul i sur., 2013; Mohammadkazemi i sur., 2015).

Bakterija *G. xylinus* je glavni mikrobni proizvođač BNC i postala je modelni organizam za proučavanje biosintetskih mehanizama proizvodnje BNC u bakterijama (Keshk, 2014). Kako bi proizvela nanocelulozu, *G. xylinus* gradi sloj nanofibrila sa gušćom bočnom površinom i želatinoznim slojem na suprotnoj strani (Kurosumi i sur., 2009; Cai i Kim, 2009). Biokemijski proces sinteze celuloze s *G. xylinus* sastoji se od tri glavna koraka: (i) polimerizacija glukoznih ostataka u β -1-4 glukan, (ii) ekstracelularno lučenje linearnih lanaca i (iii) organizacija i kristalizacija glukanskih lanaca vodikovim vezama i van der Waalsovima vezama poredanih u hijerarhijske trake (Slika 2). Time se sintetiziraju mikrofibrili celuloze (Klemm i sur., 2011).



Slika 2. Shematski prikaz kristaliničnih i amornih područja BNC (Zhou i Wu, 2012)

Unatoč gore navedenim istraživanjima, metabolički put kroz koji mikroorganizmi reguliraju proizvodnju BNC nije do sada u potpunosti razjašnjen. Osim toga, još uvijek se traga za novim mikroorganizmima koji mogu proizvesti ovaj biopolimer.

2.3. Biotehnološki pristup proizvodnji bakterijske nanoceluloze

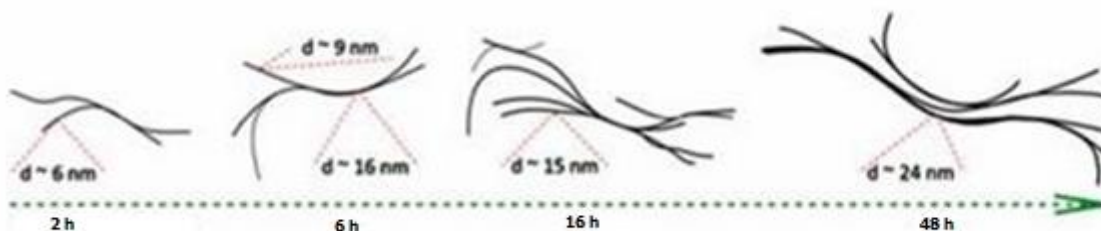
Sve je važnija proizvodnja ekološki prihvatljivih proizvoda, a u ovom kontekstu proizvodnja nanoceluloze mikrobim putem. Proizvodnja BNC koristeći mikroorganizme je industrijski važna jer ti mikroorganizmi imaju brzo generacijsko vrijeme, postižu visoke prinose i dostupni su tijekom cijele godine (Santos-Ebinuma i sur., 2013).

Postoje dvije glavne metode proizvodnje BNC: uzgojem u statičnoj kulturi, koji rezultira nakupljanjem debelog, želatinoznog BNC sloja na granici zraka i tekućine (Kuo i sur., 2015), ili u miješanoj kulturi, u kojoj je nanoceluloza sintetizirana na način da je raspršena u hranjivoj podlozi, tvoreći nepravilne pelete ili suspendirana vlakna (Krystynowicz i sur., 2002; Czaja i sur., 2004). Izbor između tih dvaju načina proizvodnje ovisi o krajnjoj primjeni BNC jer se morfološka, fizička i mehanička svojstva nastalih polimera razlikuju prema metodi uzgoja (Slika 3).



Slika 3. Izgled sintetizirane BNC uzgojene u statičkoj i miješanoj kulturi (Chawla i sur., 2009)

BNC sintetizirana kulturom koja je miješana ima nižu mehaničku čvrstoću u usporedbi s onom sintetiziranom u statičnom uzgoju. Osim toga, miješane kulture rezultiraju nižim prinosisima nego statične kulture i imaju veću vjerojatnost mutacije mikroorganizama, što može utjecati na proizvodnju BNC. S druge strane, statične kulture zahtijevaju veću uzgojnu površinu i duže vrijeme uzgoja (Slika 4) (Chawla i sur., 2009; Keshk, 2014; Cakar i sur., 2014; Lee i sur., 2014; Jeon i sur., 2014; Tyagi i Suresh, 2015).



Slika 4. Kinetika biosinteze nanofibrila BNC (Lee i sur., 2014)

Nužno je dobro razmotriti sve parametre kada se određuju uvjeti potrebni za proizvodnju BNC. Isplativost hranjive podloge u obliku prinosa BNC je važan faktor i zato je nužno odrediti sadržaj i volumen hranjive podloge. Sastav hranjive podloge može izravno utjecati na ekonomsku isplativost biotehnološkog procesa i od kritične je važnosti za bilo koji bioproizvod, uključujući BNC (Ruka i sur., 2012; Lee i sur., 2014; Mohammadkazemi i sur., 2015).

Hranjiva podloga mora sadržavati izvor ugljika, dušika i drugih makro- i mikronutrijenata potrebnih za rast mikroorganizama, poput fosfora, sumpora, natrija i magnezijevih soli (Krystynowicz i sur., 2002; Chawla i sur., 2009; Mohammadkazemi i sur., 2015).

Proces sinteze celuloze je osjetljiv na kemijske agense i fizičke utjecaje sastojaka prisutnih tijekom njegove proizvodnje. Dakle, bez obzira na način proizvodnje, faktori kao što su prinos, morfologija, struktura i fizikalne osobine mogu ovisiti o korištenoj hranjivoj podlozi (Jung i sur., 2010).

Hranjivu podlogu, koja se obično koristi za proizvodnju BNC, bez obzira koristi li se statična ili miješana kultura, prvi su put opisali Hestrin i Schramm (HS) (Schramm i Hestrin, 1954). Ova hranjiva podloga se sastoji od 2% glukoze (glavni izvor ugljika), 0.5% peptona, 0.5% ekstrakta kvasca, 0.27% bezvodnog dinatrijevog fosfata i 0.15% monohidrata limunske kiseline. Međutim, HS hranjiva podloga može povećati krajnju cijenu proizvodnje biopolimera i smatra se neisplativom za upotrebu u komercijalnoj proizvodnji BNC zbog svoje visoke cijene (Tyagi i Suresh, 2015; Huang i sur., 2016). Zbog toga su napravljena različita istraživanja tijekom zadnjih 10 godina kako bi se povećao prinos BNC na osnovi nekoliko parametara tijekom fermentacije, poput kontrole pH vrijednosti, alternativnih izvora ugljika, uključujući šećernu trsku, melasu, trulo voće, kao i uzgoj u u statičnoj i miješanoj kulturi (Chawla i sur., 2009).

Gluconoacetobacter može koristiti nekoliko izvora ugljika za sintezu BNC. Glukoza se najčešće koristi jer je i izvor energije i idealni prekursor za dobivanje BNC tijekom procesa biosinteze. Međutim, prinos BNC može biti nizak zbog prisutnosti glukoza dehidrogenaze, koja pretvara glukozu u glukonsku kiselinu, time smanjujući pH hranjive podloge i potencijalno utječući na biosintezu BNC u staničnoj membrani *G. xylinus* (Kuo i sur., 2015).

Uz temperaturu i pH, koncentracija otopljenog kisika u hranjivoj podlozi je važan faktor koji utječe na proizvodnju BNC. U statičnim kulturama, supstrat mora biti transportiran u potpunosti difuzijom, a budući da su izvori ugljika uglavnom dostupni, niska koncentracija kisika može postati limitirajući faktor za stanični metabolizam i može imati negativan utjecaj na proizvodnju i kvalitetu celuloze (Chawla i sur., 2009). Ruka i sur. (2012) su pronašli da se proizvodnja celuloze povećava kako se povećava površina i volumen hranjive podloge pri statičnom uzgoju, no ovaj povećani prinos rezultira povećanom cijenom i vremenom proizvodnje.

Tijekom biosinteze BNC, ako hranjiva podloga sadrži različite sastojke, kao što su organski, anorganski ili polimerni materijali, te komponente mogu biti ugrađene u membrane BNC, čime dobivaju dodanu vrijednost. Postoje dva osnovna sintetska pristupa za tvorbu BNC matriksa smjese: *in situ* i *ex situ*. U *in situ* metodi, sporedni sastojci se mogu unijeti u

hranjivu podlogu BNC na početku biosintetskog postupka. U *ex situ* metodi, sporedni sastojci se mogu unijeti u BNC matriks metodom ubrizgavanja otopine (Erbaş Kızıltas i sur., 2015a). Metoda uzgoja je također važan parametar koji bi se trebao detaljnije analizirati. Statična kultura je najčešće korištena metoda; međutim, mnogi bioreaktori sadržavaju spremnik za miješanje, obično miješanje zraka i modificirano miješanje zraka s pravokutnom žičanom mrežom (za smanjenje brzine). BNC dobiven iz tih tipova bioreaktora je nitast ili u obliku peleta (Krališć i sur. 2010; Lee i sur. 2014; Wu i Li, 2015), a ova tehnologija može dati obećavajuće rezultate. Stoga su potrebna daljnja istraživanja kako bi se ispitala funkcionalnost BNC tijekom njezine biosinteze, što bi mogao biti ključni faktor za poticanje tržišnog širenja ovog biopolimera.

2.4. Primjena bakterijske nanoceluloze

S obzirom na svojstva BNC, uključujući njenu visoku čistoću, visoki stupanj kristaliničnosti, visoku gustoću, zadržavanje dobrog oblika, visoku sposobnost vezanja vode i veću površinu u usporedbi s prirodnom celulozom, BNC može imati primjenu u različitim kontekstima, kao što su tekstilna industrija, netkana odjeća, papir, hrana, lijekovi, obrada otpada, (Wu i Liu, 2012; Ashjari i sur., 2013; Lin i Dufresne, 2014). Ta prepoznatljiva svojstva su ubrzala primjenu BNC u konstruiranju nekoliko različitih proizvoda, uključujući gume, membrane za slušalice, visoko učinkovite govorne membrane, visoko-kvalitetan papir, jastučice za šminku, dijetnu hranu i tekstil (Shah i sur., 2013).

Fragmentirana BNC ima potencijalnu primjenu u proizvodnji papira, posebice savitljivog/izdržljivog papira i papira s visokim udjelom punila, što je idealno za novčanice (Chawla i sur., 2009; Ashjari i sur., 2013). Istražena je i njezina uporaba kao vezivnog sredstva u pravljenju papira (Basta i El-Saied, 2009). Mautner i sur. (2015) su pokazali da je nanopapir na bazi BNC prikladan za uske ultrafiltracijske operacije, dok su Li i sur. (2015) razvili jeftinu i ekološki prihvatljivu uređaj za očuvanje energije na bazi papira koristeći BNC – polipirol nanofibrile u kombinaciji s više slojeva ugljika.

Kemijski čista celuloza može biti korištena u procesiranoj hrani kao stabilizirajući agens ili za potpomaganje geliranja i vezanja vode. Nadalje, BNC je vrsta dijetalnog vlakna i klasificirana je kao "generally recognized as safe" (GRAS) hrana, te je US Food and Drug Administration (FDA) 1992. godine izdao dopustnicu za prodaju BNC (Shi i sur., 2014). Prvo korištenje BNC u prehrambenoj industriji je bilo u "Nati de coco" na Filipinima, napravljenog od BNC gela i

tradicionalni je desert u jugoistočnoj Aziji (Chawla i sur., 2009; Shi i sur., 2014). Postoji mnogo vrsta Nata, ovisno o vrsti fermentiranog napitka, a najpoznatije su Nata de coco i Nata de pina. Arome tih proizvoda su ovisne o sirovini hranjive podloge, pa se tako za Nata de coco koristi kokosova voda kao hranjiva podloga, dok se za Nata de Pina koristi ananasov sok (Shi i sur., 2014).

2.4.1. Biomedicinska i farmaceutska primjena

Zbog svoje jedinstvene 3D mrežaste strukture u nanoformi, BNC može služiti kao prirodni nosač materijala za regeneraciju različitih oblika tkiva (Fu i sur. 2013). Najzujbudljivije primjene ovih biomaterijala su u biomedicini, gdje je BNC korištena kao materijal za zacjeljivanje rana, umjetnu kožu, prenosnice, nosač za konstrukciju tkiva, umjetne krvne žile, medicinske jastučice i zubnu ispunu (Shah i sur., 2013). Mnoge prednosti BNC, uključujući njenu biokompatibilnost, usklađenost, elastičnost, transparentnost, sposobnost da održi vlažni okoliš oko rane te sposobnost da otpušta tekućinu kod opekline, omogućava veliki potencijal za primjenu u liječenju rana (Chawla i sur., 2009).

Osim unaprijeđenja postojećih svojstva BNC, složeni materijali su podarili BNC s novim svojstvima koje pokazuju tipični anorganski ili organski nanomaterijali, a ta svojstva uključuju antibakterijske učinke, optička, električna i magnetska svojstva te katalitičke i biomedicinske primjene (Hu i sur., 2014). Shah i sur. (2013) su istraživali primjenu BNC smjesa u biomedicinskim proizvodima, vodičima, električnim uređajima, izdvajanju i pročišćavanju proizvoda, te smjesa s velikom mehaničkom čvrstoćom za industrijsku primjenu. Povrh toga, Hu i sur. (2014) su razmotrili potencijalne prednosti i različite primjene funkcionalnih nanomaterijala na osnovi BNC, koncentrirajući se uglavnom na primjene kao senzora, fotokatalitičkih nanomaterijala, optoelektroničkih materijala i sprava, te magnetsko-osjetljivih membrana.

Struktura BNC materijala se može prikazati od nano- do makro- veličine kontrolirajući proces biosinteze. Povrh toga, površinske modifikacije imaju ključnu ulogu u određivanju *in vivo* učinka materijala. Molina de Olyveria i sur. (2013) su proučavali tretman gama zračenjem kako bi se modificirala površinska svojstva BNC, povećavajući njen potencijal za primjenu u biomedicini. Uzorci nisu pokazivali značajne razlike u termalnim svojstvima, međutim, veća gustoća pora je proizvedena u ozračenim uzorcima nego u neozračenim uzorcima, rezultirajući sporijom difuzijom nego onih kod neozračenih membrana.

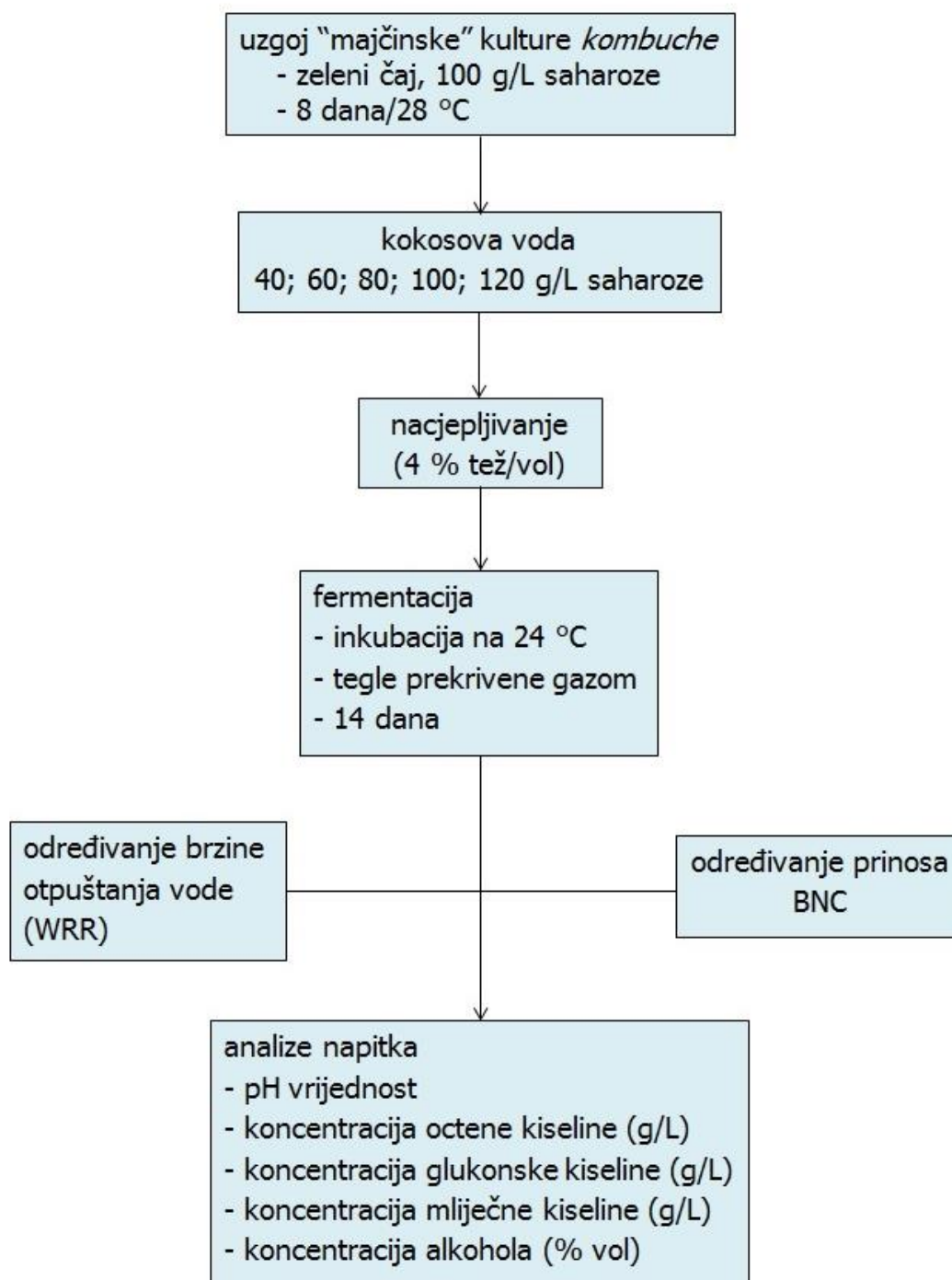
BNC ima potencijalnu ulogu u farmaceutskoj industriji. Müller i sur. (2013) su istraživali primjenljivost BNC kao sustava za isporuku lijekova za proteine koristeći serum albumin kao modelni lijek. Pronašli su da su liofilizirani uzorci imali niži kapacitet održivosti albumina nego prirodni BNC, što bi se moglo objasniti promjenama u mreži niti tijekom procesa liofilizacije. Rajwade i sur. (2015) su nedavno izdali rad o primjeni BNC u biomedicini, poput nosača za konstrukciju tkiva, nosača za prijenos lijekova te materijala za liječenje rana. Numata i sur. (2015b) su istraživali kombinaciju BNC gela i amfofilnih kopolimernih nanočestica kao sustava za isporuku lijekova, a Cacicedo i sur. (2015) su stvorili hibridni sustav mikročestica koristeći BNC i stereospecifičnu nukleizaciju mezoporoznih hibridnih mikrosfera sastavljenih od CaCO_3 . Ovaj hibridni sustav bi se mogao potencijalno koristiti kao ugrađeni sustav za isporuku lijekova za personalizirane onkološke terapije.

Enzimskom ili kiselinskom hidrolizom, BNC može tvoriti nanokristale celuloze (NCC), celulozne igličaste čestice s visokom kristaliničnošću i sa širinom 5 – 70 nm i visinom između 100 nm i nekoliko mikrometara. NCC također ima mnoge blagotvorne učinke, uključujući biokompatibilnost, biorazgradivost i manjak toksičnosti, čineći ju izvrsnim kandidatom za farmaceutske primjene (Akhlaghi i sur., 2013).

Prema Basmaji i sur. (2014), korištenje BNC kao dio ekstracelularnog matriksa je sastavni dio nove biotehnologije i jedinstvene biomedicine naznačena za liječenje i upravljanje kroničnih ozljeda, prijenos lijekova, konstrukciju tkiva i liječenje raka kože. Nadalje, ovaj materijal nudi opipljivo, učinkovito rješenje za ozbiljan medicinski i socijalni problem, potičući brzo liječenje u ozljedama uzrokovanim dijabetesom, opeklinama, čirevima donjih udova ili bilo koju drugu okolnost koja uključuje gubitak epidermalnog ili dermalnog tkiva. U ovom kontekstu, novi antimikrobni peptidi (AMP) i bakterijska nanoceluloza /poliheksanid bigvanid (PHMB), koji su proizvedeni simbiotskom kulturom između PHMB i hranjive podloge zelenog čaja, rezultiraju čistom 3D strukturom koja se sastoji od ultratanke mreže novih matriksa. Ovi 3D matriksi sadrže biocelulozu/PHMB nanofibrile (2 – 8 nm) koji su visoko hidratizirani (99 % po masi), imaju veliku molarnu masu i pokazuju dobru biokompatibilnost.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Cjelokupni tijek istraživanja



Slika 5. Shematski prikaz cjelokupnog istraživanja

3.2. Materijali i metode rada

3.2.1. Priprava *kombuche*

Komercijalna starter kultura *kombuche* pripravljena je s „majčinskom tekućinom“ u zelenom čaju (Franck d.d., Hrvatska) uz dodatak 100 g/L saharoze. Uzgoj je trajao 8 dana u aseptičnim uvjetima pri 28 °C u termostatu.

Uzgojena *kombucha* nacijepljena je u pasteriziranu 100 %-tnu kokosovu vodu proizvođača Galleria Internazionale d.o.o., Nizozemska.

Tablica 1. Nutritivni sastav kokosove vode uporabljene u istraživanju za uzgoj kokulture

Energija	90 kJ/21,5 kcal
Proteini	0
Ugljikohidrati	5,2 g
od kojih šećeri	3,0 g
Masti	0 g
od kojih zasićene	0 g
Vlakna	0 g
Kalij	180 mg
Magnezij	7,8 mg
Mangan	0,3 mg
Kalcij	15,9 mg
Fosfor	5,8 mg
Soli	0,03 mg

Tablica 2. Koncentracije saharoze dodane u uzorke kokosovog mlijeka

Oznaka uzorka	γ saharoze (g/L)
U1	40
U2	60
U3	80
U4	100
U5	120

3.2.2. Određivanje pH vrijednosti

Uzorcima je pH vrijednost mjerena svaki dan tijekom 14 dana fermentacije. Mjerenja su provedena nakon pažljivog izuzimanja 5 mL uzorka pipetiranjem uz rub posuda, kako ne bi došlo do oštećenja plutajuće celulozne biomase na površini uzorka. Mjerenja su provedena pomoću pH metra Hanna Industrial model HI 98103.

3.2.3. Određivanje koncentracije octene kiseline

U Erlenmeyer tikvicu od 200 mL stavljeno je 1 mL uzorka fermentirane kokosove vode i 20 mL vode te je dodano nekoliko kapi fenolftaleina. Ovako pripremljeni uzorak titriran je otopinom 0,1 M NaOH do prve pojave ljubičaste boje. Masena koncentracija octene kiseline (g/L) izračunata je prema izrazu:

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

gdje je:

$V(\text{NaOH})$ = utrošeni volumen 0,1 M NaOH (mL)

$f(\text{NaOH})$ = faktor 0,1 M NaOH (1,000)

$V(\text{uzorka})$ = volumen uzorka (1 mL)

3.2.4. Određivanje koncentracije glukonske kiseline

U Erlenmeyer tikvicu od 200 mL stavljeno je 25 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:

$$\gamma(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_7) = (V(\text{NaOH}) \cdot M(\text{NaOH}) \cdot 1,97) / V(\text{uzorka}) \quad (2)$$

gdje je:

$V(\text{NaOH})$ = utrošeni volumen 0,1 M NaOH (mL)

$M(\text{NaOH})$ = molaritet NaOH (0,1 M)

$V(\text{uzorka})$ = volumen uzorka (mL)

3.2.5. Određivanje koncentracije mliječne kiseline

U Erlenmeyer tikvicu od 200 mL stavljeno je 25 mL uzorka fermentirane kokosove vode i dodano je nekoliko kapi fenolftaleina. Ovako pripremljeni uzorak titiran je 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)

$V(\text{uzorka})$ = volumen uzorka (mL)

3.2.6. Određivanje alkohola kemijskom metodom

Udjel alkohola u fermentiranim uzorcima, tijekom previranja šećera do etanola i biooksidacije etanola do octene kiseline, određivan je 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 stavljeno je 5 mL uzorka kokosove vode koji je razrijeđen s demineraliziranom vodom do 50 mL (odnos kokosove vode 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 je morala biti polagana i postupna, a trajala je dok se sadržaj u tikvici za destilaciju nije smanjio 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. Tijekom oksidacije, utrošen je jedan dio bikromata, dok je drugi ostao u suvišku. Nakon toga 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. Tijekom tog perioda dolazi do oksido-redukcijske reakcije između preostalog kalijevog bikromata i KI, gdje se krom se iz šesterovalentnog reducira u trovalentni, a jod iz KI oksidira se u elementarni jod, zbog čega otopina dobije tamnu boju; elementarni jod se oslobađa u količini ekvivalentnoj kalijevom bikromatu. 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 oksido-redukcijske reakcije 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)

3.2.7. Izračunavanje prinosa celulozne biomase *kombuche*

Nakon 14 dana fermentacije, plutajuće pelikule nanocelulozne biomase, koje su formirane na površini kokosove vode, pažljivo su izvađene iz staklenih posuda i oprane demineraliziranom vodom sve dok pH vode za ispiranje nije dostigao početnu vrijednost vode (Toda i sur., 1991).

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

$$Y_{cb} (\%) = \frac{(\gamma \text{ vlažne biomase nakon fermentacije} - \gamma \text{ vlažnog inokuluma})}{(\gamma \text{ izvora C na početku fermentacije})} \cdot 100 \quad (5)$$

3.2.8. Određivanje brzine otpuštanja vode (*eng. Water-Release Rate; WRR*)

Za određivanje brzine otpuštanja vode iz novo sintetizirane BNC nakon 14 dana fermentacije u kokosovoj vodi, mase vlažnih uzoraka mjerene su kontinuiranim vaganjem u određenim vremenskim razmacima do konstantne mase tijekom 5 dana na sobnoj temperaturi. Uzorci su bili pohranjeni u Petrijevoj zdjelici, pokriveni filter papirom (Shezad i sur., 2010). Rezultati su prikazani grafički kao odnos mase otpuštene vode u određenom vremenskom periodu.

3.2.9. Određivanje antimikrobne aktivnosti

Antimikrobna aktivnost inhibicijom rasta odabranih test mikroorganizama: bakterija vrsta *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* i kvasca *Candida albicans* određivana je metodom radijalne difuzije.

Kao testni mikroorganizmi korišteni su sojevi bakterijskih i kvašćevih kultura iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu.

Suspenzije stanica bakterija i kvasca (10^8 /mL) nacijepljene su na hranjive podloge te im je u izbušene rupe u podlozi (visina 3 mm, promjer 4 mm) pipetom dodano 100 μ L uzoraka fermentirane kokosove vode s dodanim različitim koncentracijama saharoze. Podloge su stavljene na inkubaciju 24 h pri 28 °C (kvasci) i 48 h pri 37 °C (bakterije). Tijekom inkubacije, istraživani uzorci su difundirali radijalno u agar tvoreći gradijent koncentracije i, ovisno o njihovim antimikrobnim djelovanjima, inhibirali rast mikroorganizma u okolini izbušenih rupa. Prozirna zona u kojoj nema vidljivog rasta naziva se zona inhibicije (ZI) i indikacija je osjetljivosti mikroorganizma prema napitku s antimikrobnim djelovanjem.

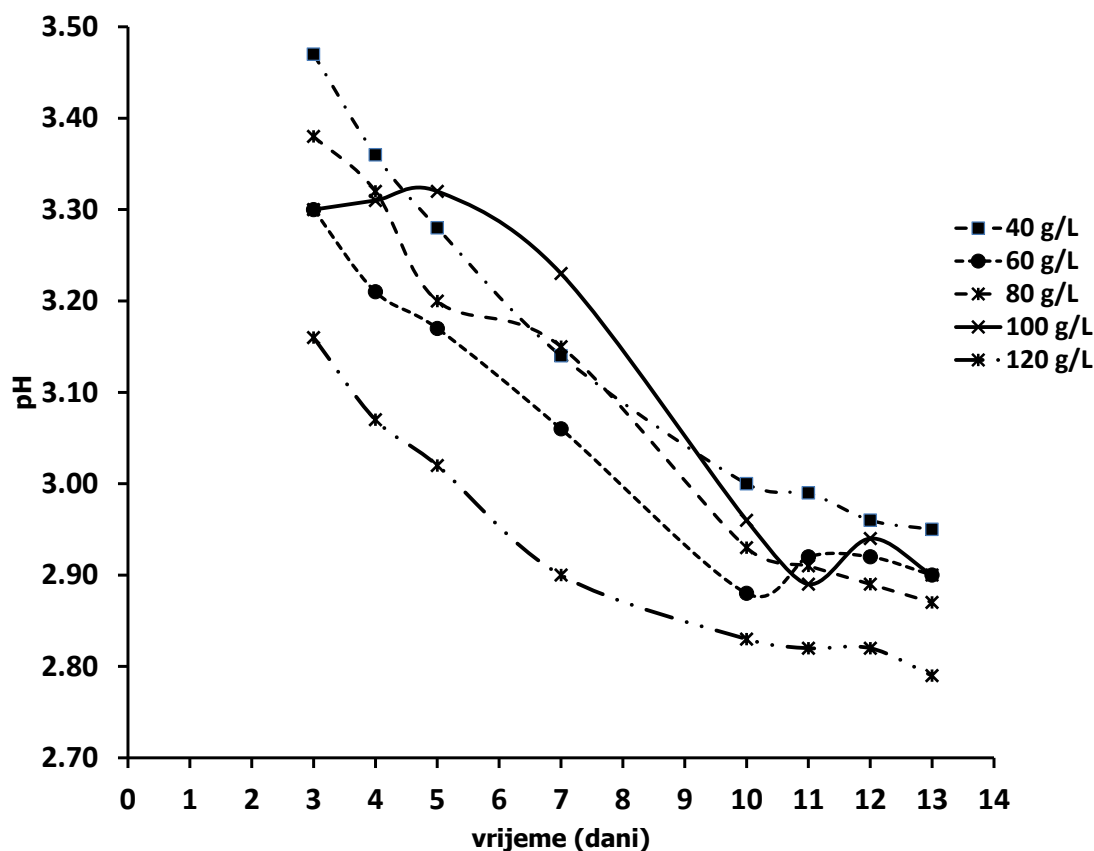
Nakon toga su očitani rezultati istraživanja, pri čemu je zamjećivano postoji li zona inhibicije, je li područje zamućeno ili čisto, te su mjereni promjeri nastalih zona.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom je radu proučavana fermentacija kokosove vode s *kombuchom*. Tijekom 14 dana aerobne fermentacije na sobnoj temperaturi, praćeni su različiti parametri: promjena pH vrijednosti fermentirane kokosove vode, kinetika nastajanja octene, glukonske i mliječne kiseline, te smanjenja koncentracije etanola, kao i kinetika sinteze bakterijske nanoceluloze, otpuštanja vode iz BNC i antimikrobno djelovanje fermentiranog napitka (Slike 6-15, Tablice 3 i 4).

4.1. Promjena pH vrijednosti

Optimalna pH vrijednost za rast kvasaca iz roda *Saccharomyces* je od 4,3 do 4,8, a bakterija iz roda *Acetobacter* između 5,4 i 6,3. 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 kiseline kao dio mikroflore *kombuche* sposobne rasti, proizvoditi organske kiseline i sintetizirati BNC čak i pri pH vrijednostima nižim od 3,0 (Slika 6).



Slika 6. Promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije kokosove vode s *kombuchom*

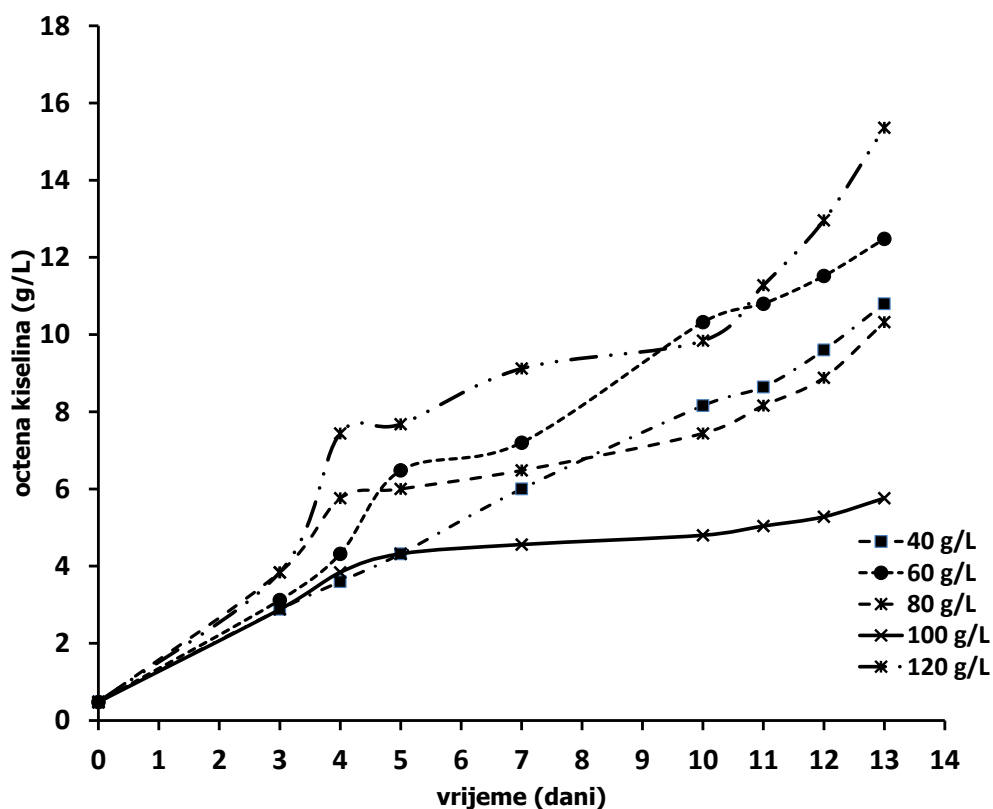
Važno je napomenuti da se pH vrijednost tijekom uzgoja može sniziti zbog nakupljanja sekundarnih metabolita, uglavnom organskih kiselina (octena, glukonska, mliječna), koje nastaju kao rezultat potrošnje izvora ugljika ili dušika. Zbog toga je u industrijskoj proizvodnji bakterijske celuloze izrazito važno održavanje pH podloge na vrijednosti na kojoj se postiže maksimalni prinos BNC, uz minimalnu mogućnost kontaminacije.

Pad pH vrijednosti započinje fermentacijom i sintezom organskih kiselina (Mikkelsen i sur., 2009). No, nastajanje organskih kiselina nije jedini razlog smanjenja pH vrijednosti *kombucha* napitaka. Postoji pH gradijent između *kombuche* i fermentacijske podloge. *Kombucha* je prirodno kisela jer se tijekom inokulacije dodaje i dio „majčinskog“ čaja u kojem je uzgojena, te se njenom inokulacijom odmah smanjuje pH vrijednost hranjive podloge, najčešće s početne vrijednosti na 3 tijekom 14 dana fermentacije (Chen i Liu, 2000; Sreeramulu i sur., 2000).

4.2. Promjena koncentracija organskih kiselina i etanola

Octena kiselina jedna je od glavnih metabolita tijekom fermentacije *kombuche*. Kinetika nastajanja octene kiseline tijekom fermentacije kokosove vode prikazana je na Slici 7. Vidljivo je gotovo linearno povećanje koncentracije tijekom 14 dana fermentacije pri svim dodanim koncentracijama saharoze. Najveća koncentracija na kraju procesa određena je u uzorku sa 120 g/L šećera (15,36 g/L), a najniža kod 100 g/l (5,76 g/L), dok su u ostalim koncentracijama određena relativno podjednaka koncentracija octene kiseline (od 10,32 do 12,48 g/L).

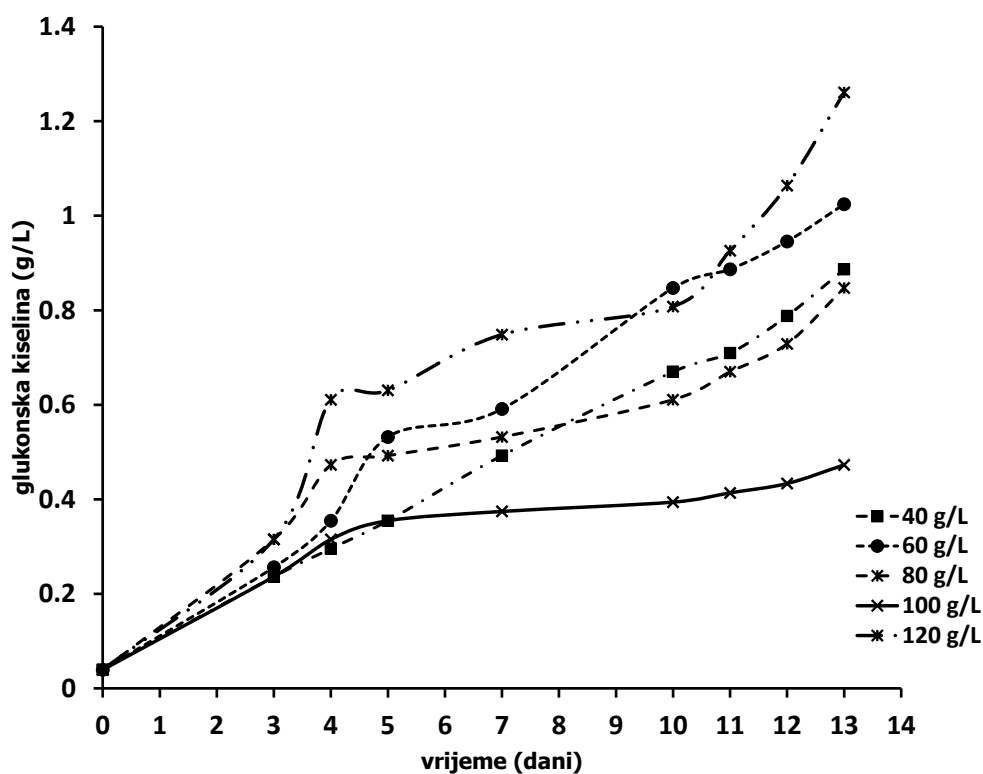
Dobiveni rezultati razlikuju se od rezultata koje je objavio Blanc (1996), koji je u podlozi sa 70 g/L saharoze izmjerio nisku koncentraciju octene kiseline, u podlozi sa 100 g/L visoku koncentraciju, a najvišu koncentraciju u podlozi s 50 g/L dodane saharoze. No, općenito gledano, iako i u rezultatima dobivenim u ovom radu i u istraživanju koje je proveo Blanc (1996) nema izričite regularnosti, apsolutne vrijednosti nastale octene kiseline u obadva istraživanja su bile podjednake, između 4 i 16 g/L.



Slika 7. Promjena koncentracije octene kiseline tijekom 14 dana uzgoja *kombuche* u kokosovoj vodi

Ovisno o tome želi li se proizvoditi fermentirani *kombucha* napitak ili BNC, 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 BNC (Masaoka i sur., 1993). Prema istraživanju koje je proveo Roussin (30), uz octenu kiselinu koja je dominantna u *kombucha* napitcima, u relativno visokim koncentracijama je određena i glukonska kiselina. Autor je upozorio da često navođena prisutnost glukuronske kiseline u različitim uzorcima kombuche može zavarati jer obje kiseline imaju isto retencijsko vrijeme ako se određuju mjerenjem na HPLC-u. Zaključio je da glukuronska kiselina nije tipična za *kombucha* napitke, već je to glukonska kiselina.

Rezultati prikazani na Slici 8 ukazuju da je koncentracija glukonske kiseline bila 10 puta niža od koncentracije octene kiseline, no može se uočiti karakteristični linearni rast i kod jedne i druge kiseline tijekom 14 dana fermentacije kokosove vode. Ponovno je najveća koncentracija određena kod uzorka s dodanih 120 g/L saharoze (1,26 g/L), nešto niža pri 60 g/L (1,024 g/L), najniža pri 100 g/L (0,85 g/L), a u uzorcima sa 40 i 80 g/L izmjerene su vrlo slične koncentracije glukonske kiseline (0,89 i 0,87 g/L).



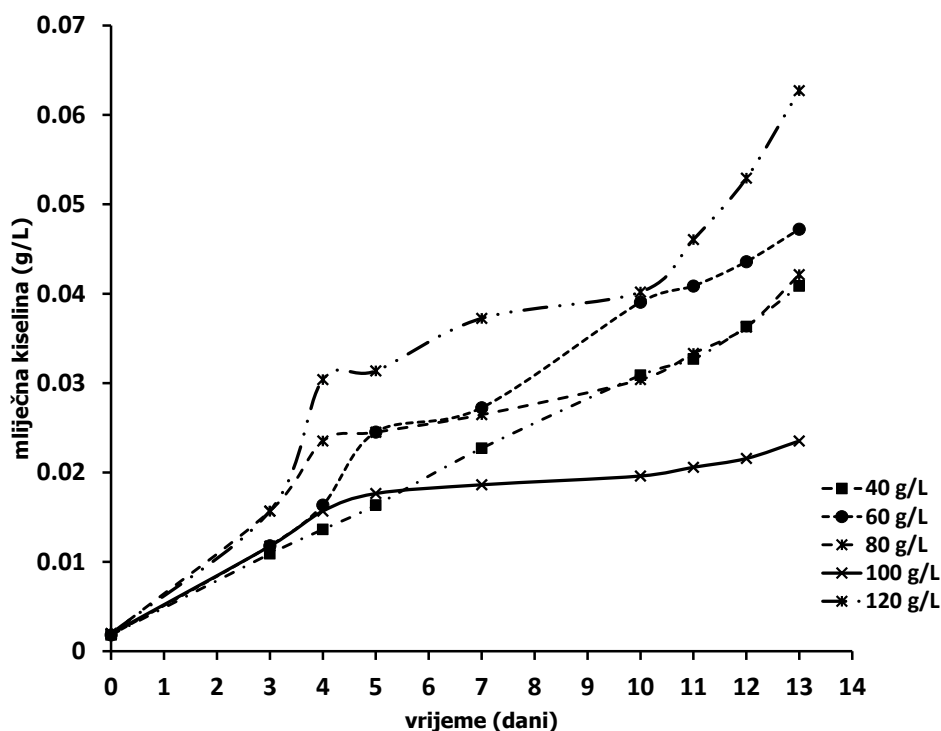
Slika 8. Promjena koncentracije glukonske kiseline tijekom 14 dana uzgoja *kombuche* u kokosovoj vodi

Uzorci nacijepljeni *kombuchom* uzgojeni su u statičkoj kulturi, pri čemu nije bio određivan mikrobiološki sastav uzoraka. Upravo zbog ovog razloga određeno odstupanje između dobivenih rezultata u ovom radu i objavljenih u literaturi može biti posljedica različitosti mikroflore koja je dio ekološkog izvorišta nacijepljenih kultura.

Nastajanje mliječne kiseline rezultat je metabolizma bakterija mliječne kiseline i vrlo je značajna zbog svog inhibicijskog djelovanja na patogene mikroorganizme i vrste koje izazivaju kvarenje namirnica (Magalhaes i sur., 2010). Povećanje koncentracije mliječne kiseline tijekom 14 dana fermentacije prikazano je na Slici 9. Kao što se može primijetiti na grafičkom prikazu, ponovno je najmanja koncentracija određena u uzorku sa 100 g/L dodane saharoze (0,024 g/L), a najveća kod 120 g/l (0,063 g/L). Pri koncentraciji šećera od 60 g/L izmjereno je 0,047 g/L mliječne kiseline, a s 40 g/L i 80 g/L saharoze su imale istu koncentraciju (0,041 g/L).

Ovako niske koncentracije mliječne kiseline mogu se objasniti time što kokosova voda ne sadrži biotin kao faktor rasta i amino dušik koji su nužni za intenzivniji metabolizam kombuche koji bi rezultirao većim udjelom mliječne kiseline u napitku. Nadalje, bakterije mliječne kiseline su mikroarefili, a uzgoj *kombuche* se odvija u aerobnim uvjetima zbog

striktno aerobnih bakterija octene kiseline i fakultativno anaerobnih kvasaca (Malbaša i sur., 2008).

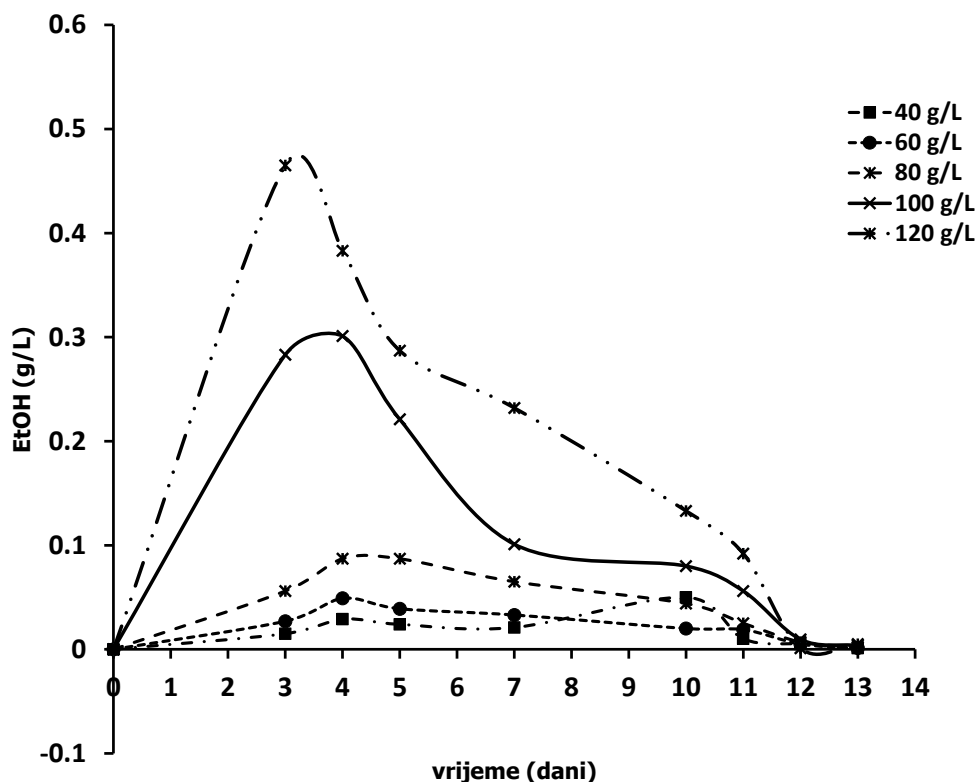


Slika 9. Promjena koncentracije mliječne kiseline tijekom 14 dana uzgoja kombuche u kokosovoj vodi

Kombucha je kompleksni napitak koji je istovremeno i zdrav i osvježavajući, te gotovo ima status „kultnog“ ili „izlječujućeg“. Na tržištu se može naći kao bezalkoholno piće, čija koncentracija etanola mora biti niža od 0,5 % vol/vol.

Prema istraživanjima koje su proveli Chen i Liu (2000), koncentracija etanola se povećava u prvom dijelu fermentacije kombuche i postiže svoju maksimalnu vrijednost, te se nakon toga smanjuje. Do istog zaključka došao je i Reiss (1994), koji je zaključio da se nastajanje etanola povećava do maksimuma u šestom danu fermentacije, a nakon toga se smanjuje.

U ovom je radu izmjereno linearno povećanje koncentracije etanola do četvrtog dana fermentacije kombuche u kokosovoj vodi i to kod svih koncentracija šećera (Slika 10). Najveće koncentracije su izmjerene kod 120 g/L (0,465 g/L) i 100 g/L saharoze (0,301 g/L), dok su pri drugim koncentracijama šećera izmjerene puno manje koncentracije etanola (od 0,029 do 0,087 g/L). Rezultati smanjenja koncentracije etanola ukazuju na biooksidaciju do octene kiseline jer je u četvrtom danu njena koncentracija naglo počela rasti (Slika 7).



Slika 10. Promjena koncentracije etanola tijekom 14 dana *kombuche* u kokosovoj vodi

4. 3. Sinteza bakterijske celuloze

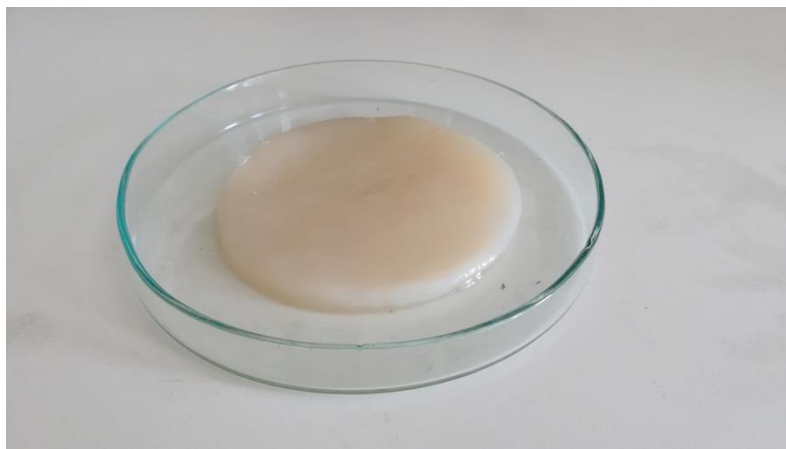
Jedna od prvih i vidljivih proizvoda biotransformacije zaslađenog napitka tijekom fermentacije je celulozna opna (pelikula) koja se u tankom sloju oblikuje na površini tekućine (Slika 11). Celuloznu pelikulu na površini održava CO₂ koji nastaje kao posljedica fermentativne aktivnosti kvasaca (Sievers 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 su s donje strane nakupine kvasaca, koji pripadaju fakultativno anaerobnim mikroorganizmima (Malbaša i sur., 2008). Prinos biomase tijekom fermentacije je usko povezan s koncentracijom izvora ugljika (Slika 12, Tablica 3). Prema dobivenim rezultatima, dodatkom 80 g/L saharoze u kokosovu vodu postignut je najbolji prinos vlažne BNC biomase (38,23 %) nakon 14 dana fermentacije. Na Slici 13 prikazana je kinetika nastajanja bakterijske celuloze iz koje je vidljivo linearno povećanje mase celuloze tijekom 12 dana uzgoja.



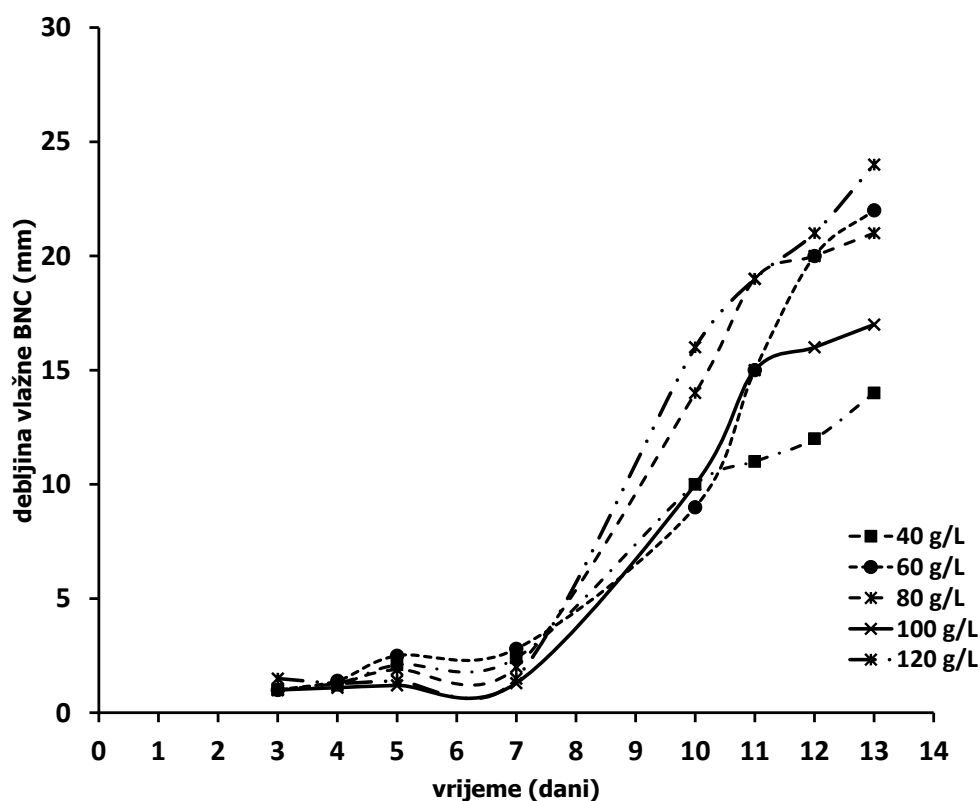
Slika 11. Sintetizirana celulozna pelikula *kombuche* u kokosovoj vodi nakon 24 sata fermentacije

Tablica 3. Prinos BNC nakon 14 dana fermentacije *kombuche* u kokosovoj vodi

Koncentracija saharoze (g/L)	γ inokuluma (g/L)	γ BNC (g/L)	Prinos (%)
40	16,14	27,02	27,21
60	24,28	35,82	19,23
80	32,07	62,65	38,23
100	40,47	49,64	9,17
120	48,02	78,68	25,55



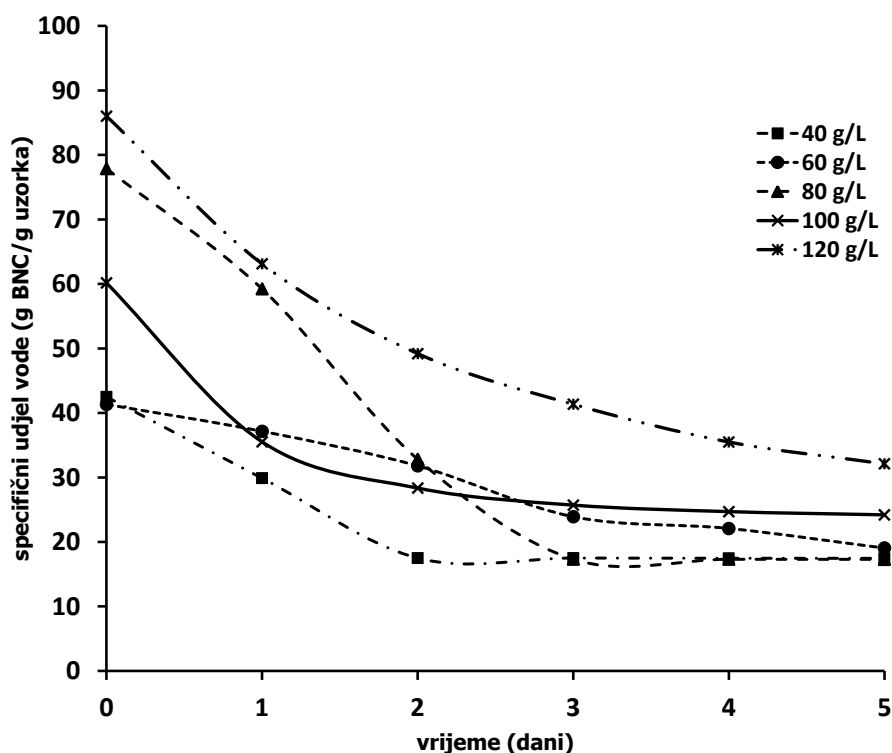
Slika 12. Sintetizirana celulozna pelikula *kombuche* u kokosovoj vodi nakon 14 dana fermentacije



Slika 13. Kinetika sinteze BNC tijekom fermentacije kokosove vode

4.4. Kinetika otpuštanja vode (WRR)

Sposobnost otpuštanja vode izrazito je važno svojstvo BNC za biomedicinsku primjenu kao pokrovnog materijala na ranama. Na Slici 14 je prikazana kinetika otpuštanja vode iz uzoraka sintetiziranih u kokosovoj vodi tijekom 5 dana pokusa. Iz slike je vidljivo da je izmjereni specifični udjel vode u početku bio najveći u uzorku s 120 g/L saharoze, slijedio je 80 g/L saharoze, u uzorku sa 100 g/L saharoze izmjerena je srednja vrijednost, a najmanja vrijednost je izmjerena u uzorcima sa 40 i 60 g/L saharoze. Apsorbirana voda je za 6 dana iz uzoraka sa 40, 60 i 80 g/L najvećim dijelom evaporirala i preostalo je 20 %, dok je u uzorku BNC iz podloge sa 100 g/L ostalo 30 %, a sa 120 g/L 40 % vode vezane u matriksu pelikule.



Slika 14. Kinetika otpuštanja vode (5 dana) iz BNC sintetizirane nakon 14 dana uzgoja u kokosovoj vodi

Izlazak molekula vode iz matriksa pelikule BNC ovisi o rasporedu mikrovlakana (Shezad i sur., 2010). Gusto pakirana mikrovlakna vežu molekule vode puno učinkovitije zbog jačih interakcija među vodikovim vezama u strukturi nanoceluloznog matriksa (Shah i sur., 2010). Prema literaturnim podacima, brzina otpuštanja vode (WRR) je jako ovisna o strukturnim značajkama bakterijske nanoceluloze, posebice o veličini i ukupnom volumenu pora. Uzorci s manjim promjerima pora mogu zadržati vodu u matriksu pelikule duže vrijeme, ali veći promjer pora znači da će uzorak akumulirati više vode i time povećati kapacitet zadržavanja vode (Ul-Islam i sur., 2012).

4.5. Antimikrobna aktivnost

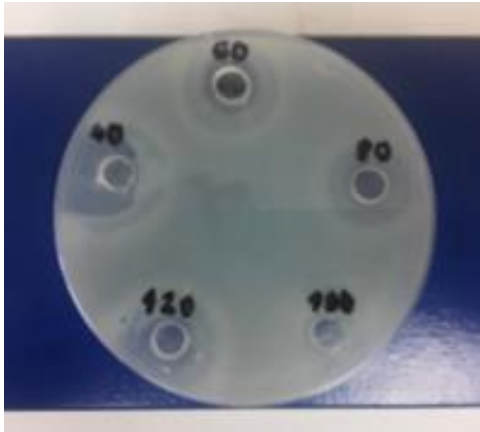
Mnoga dosadašnja istraživanja antimikrobne aktivnosti *kombucha* napitaka pokazala su djelovanje na široki spektar patogenih bakterija, no djelovanje na kvasce i plijesni je vrlo rijetko istraživano (Greenwalt i sur., 1998; Sreeramulu i sur., 2000). Rezultati tih istraživanja pokazali su da *kombucha* vrlo djelotvorno inhibira rast bakterijskih vrsta, dok prema kvascima i plijesnima uglavnom nije imala inhibicijsko djelovanje, vjerojatno zato što su

kvasci i plijesni acidofilni mikroorganizmi, a time i otporniji na organske kiseline koje nastaju tijekom fermentacije, posebice na octenu kiselinu koja nastaje u najvećoj koncentraciji (Battikh i sur., 2012).

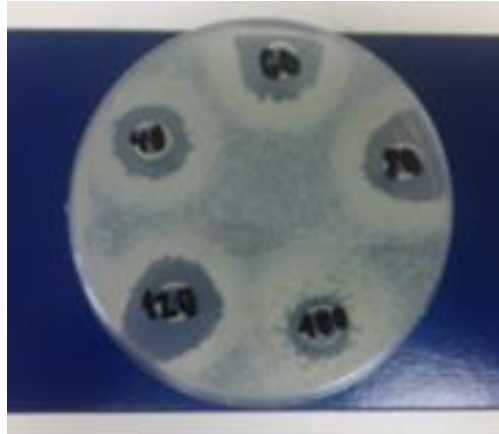
U ovom su radu, zbog određivanja antimikrobne aktivnosti *kombuche* uzgajane u kokosovoj vodi s različitim koncentracijama dodane saharoze, uzorci testirani na hranjivim podlogama naciepljenim s bakterijama *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* i *S. typhimurium*, te kvascem *C. albicans*. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 4 i Slici 15. Može se uočiti da je dvostruko veća antimikrobna aktivnost postignuta prema bakterijama, pri svim koncentracijama saharoze dodane u kokosovu vodu, nego prema *C. albicans*. Najveće zone inhibicije, i kod bakterija i kod kvasca, postignute su pri koncentraciji 40 g/L, tek malo manje pri 120 g/L, dok pri 100 g/L i 120 g/L nisu postignute zone inhibicije prema kvascu *C. albicans*. Fermentirana kokosova voda s dodatkom 40 g/L saharoze pokazala se izrazito djelotvornom za inhibiciju rasta svih vrsta ispitivanih mikroorganizama.

Tablica 4. Antimikrobna aktivnost fermentirane kokosove vode pomoću *kombuche* uz dodatak različitih koncentracija saharoze

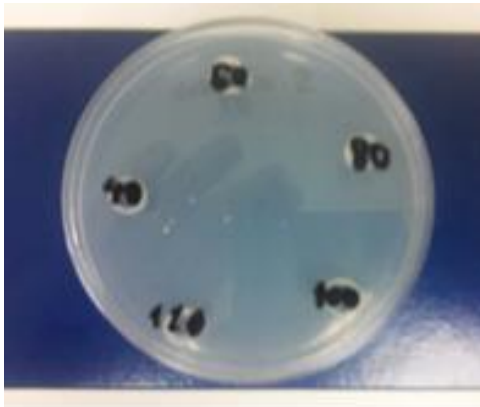
Koncentracija saharoze (g/L)	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>C. albicans</i>
	Zone inhibicije (mm)				
40	33	20	-	23	14
60	28	24	-	23	13
80	28	22	-	22	11
100	25	16	-	15	-
120	32	24	-	24	-



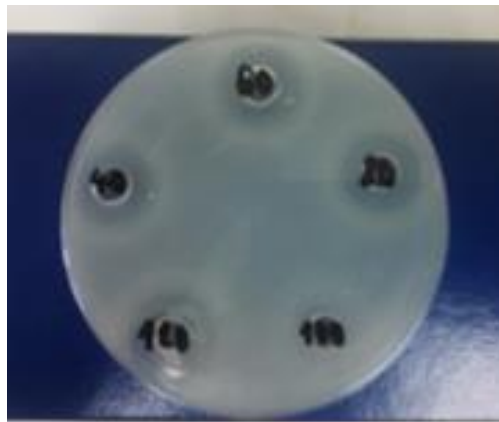
E. coli



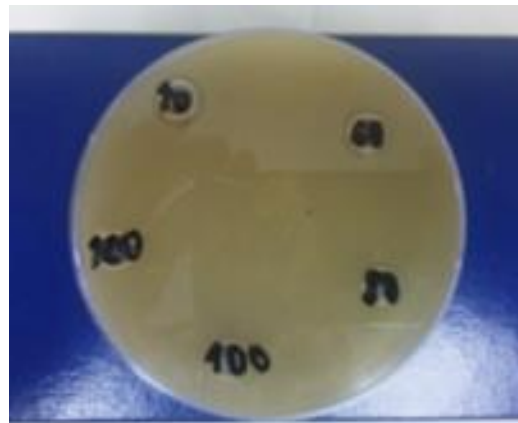
B. subtilis



S. aureus



S. typhimurium



C. albicans

Slika 15. Zone inhibicije ispitivanih mikroorganizama (razrjeđenje 10^{-2})

5. ZAKLJUČCI

Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti:

1. *Kombucha* je nutritivno vrijedni napitak dobiven fermentacijom saharozom zaslađene kokosove vode pomoću združene kulture bakterija octene kiseline i osmofilnih kvasaca.
2. Istraživane su fermentacije kokosove vode (14 dana) s komercijalnom kulturom *kombuche* pri 24 °C, uz dodatak 40; 60; 80; 100 i 120 g/L saharoze.
3. U svim je uzorcima tijekom fermentacije smanjenje pH vrijednosti i koncentracije etanola bilo u korelaciji s povećanjem koncentracija octene, glukonske i mliječne kiseline.
4. Najveći prinos celulozne biomase nakon 14 dana fermentacije izmjeren je u kokosovoj vodi s 80 g/L saharoze (38,23 %), a najmanji sa 100 g/L saharoze (9,17 %), dok su prinosi u uzorcima sa 40 g/L (27,21 %), 120 g/L (25,55 %) i 60 g/L (19,25 %) bili približno isti.
5. Svi uzorci bakterijske nanoceluloze su pokazali izvrsnu sposobnost otpuštanja vode, što ih čini biomedicinski prihvatljivim proizvodom.
6. Antimikrobna aktivnost ispitivana je mjerenjem zona inhibicije rasta bakterija *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. typhimurium* i kvasca *C. albicans*. Osim prema *S. aureus*, svi uzorci su pokazali dobru antimikrobnu aktivnost prema bakterijskim kulturama i djelomičnu prema kvascu *C. albicans*.

6. LITERATURA

- Akhlaghi S. P., Berry R. C., Tam K. C. (2013) Surface modification of cellulose nanocrystal with chitosan oligosaccharide for drug delivery applications. *Cellulose* **20**: 1747 – 1764.
- Ashjarian A., Yazdanshenas M. E., Rashidi A., Khajavi R., Rezaee A. (2013) Overview of bio nanofabric from bacterial cellulose. *Journal of the Textile Institute* **104**: 121 – 131.
- Basmaji P., de Olyveira G. M., dos Santos M. L., Guastaldi A. C. (2014) Novel antimicrobial peptides bacterial cellulose obtained by symbioses culture between polyhexanide biguanide (PHMB) and green tea. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering* **4**: 59 – 64.
- Basta A. H., El-Saied H. (2009) Performance of improved bacterial cellulose application in the production of functional paper. *Journal of Applied Microbiology* **107**: 2098 – 2107.
- Battikh, H., Bakhrouf, A., Ammar, E. (2012) Antimicrobial effect of Kombucha analogues. *LWT – Food Science and Technology* **47**: 71 – 77.
- Bergey, H., Holt, J. (1994) Group I the Spirochetes. U: *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9. izd. (Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A. i sur., ured.), Williams & Wilkins, Baltimore, str. 27-38.
- Blanc, P.J. (1996) Characterization of the tea fungus metabolites. *Biotechnology Letters* **18(2)**: 139-142.
- Cacicedo M. L., Cesca K., Bosio V. E., Porto L. M., Castro G. R. (2015) Self-assembly of carrageenin–CaCO₃ hybrid microparticles on bacterial cellulose films for doxorubicin sustained delivery. *Journal of Applied Biomaterials* **13**: 239 – 248.
- Cai Z., Kim J. (2009) Bacterial cellulose/poly(ethylene glycol) composite: characterization and first evaluation of biocompatibility. *Cellulose* **17**: 83 – 91.
- Cakar F., Ozer I., AYTEKIN A. Ö., Sahin F. (2014) Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium. *Carbohydrate Polymers* **106**: 7–13.

- Chawla P. R., Bajaj I. B., Survase S. A., Singhal R. S. (2009) Microbial Cellulose: Fermentative Production and Application. *Food Technology and Biotechnology* **47(2)**: 107 – 124.
- Chen, C., Liu, B. Y. (2000) Changes in major components of tea fungus metanolites during prolonged fermentation. *Journal of Applied Microbiology* **89**, 834-839.
- Conley K., Godbout L., Whitehead M. A., Tony, Van De Ven T. G. M. (2016) Origin of the twist of cellulosic materials. *Carbohydrate Polymers* **135**: 285 – 299.
- Czaja W., Romanovicz D., Brown M. R. (2004) Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose* **11**: 403 – 411.
- Czaja W. K., Young D. J., Kawecki M., Brown R. M. (2007) The future prospectsof microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules* **8**: 1 – 12
- de Azeredo H. M. C. (2013) Antimicrobial nanostructures in food packaging. *Trends in Food Science and Technology* **30**: 56 – 69.
- Erbas Kiziltas E., Kiziltas A., Blumentritt M., Gardner D. J. (2015a) Biosynthesis of bacterial cellulose in the presence of different nanoparticles to create novel hybrid materials. *Carbohydrate Polymers* **129**: 148 – 155.
- Fu L., Zhang J., Yang G. (2013) Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. *Carbohydrate Polymers* **92**: 1432 – 1442.
- Greenwalt, C. J., Letford, R. A., Steinkraus, K. H. (1998) Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea kombucha. *LWT – Food Science and Technology* **31**: 291 – 296.
- Hu W., Chen S., Yang J., Li Z., Wang H. (2014) Functionalized bacterial cellulose derivatives and nanocomposites. *Carbohydrate Polymers* **101**: 1043 – 1060.

Huang C., Guo H.-J., Xiong L., Wang B., Shi S.-L., Chen X.-F., Lin X.-Q., Wang C., Luo J., Chen X.-D. (2016) Using wastewater after lipid fermentation as substrate for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Carbohydrate Polymers* **136**: 198 – 202.

Jayabalan, R., Marimuthu, S., Swaminathan, K. (2007) Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry* **102**: 392-398.

Jang W. D., Hwang J. H., Kim H. U., Ryu J. Y., Lee S. Y. (2017) Bacterial cellulose as an example product for sustainable production and consumption. *Microbial Biotechnology* **10**: 1181-1185.

Jeon S., Yoo Y.-M., Park J.-W., Kim H.-J., Hyun J. (2014) Electrical conductivity and optical transparency of bacterial cellulose based composite by static and agitated methods. *Current Applied Physics* **14**: 1621 – 1624.

Jung H.-I., Lee O.-M., Jeong J.-H., Jeon Y.-D., Park K.-H., Kim H.-S., An W.-G., Son H.-J. (2010) Production and characterization of cellulose by *Acetobacter* sp. V6 using a cost-effective molasses-corn steep liquor medium. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **162**: 486 – 497.

Keshk S. M. (2014) Bacterial cellulose production and its industrial applications. *Journal of Bioprocess and Biotechnology* **4**: 150.

Klemm D., Kramer F., Moritz S., Lindström T., Ankerfors M., Gray D., Dorris A. (2011) Nanocelluloses: a new family of nature-based materials. *Angewandte Chemie - International Edition in English* **50**: 5438 – 5466.

Kralisch D., Hessler N., Klemm D., Erdmann R., Schmidt W. (2010) White biotechnology for cellulose manufacturing – the HoLiR concept. *Biotechnology and Bioengineering* **105**: 740–747.

Krystynowicz A., Czaja W., Wiktorowska-Jeziarska A., Gonçaves-Miśkiewicz M., Turkiewicz M., Bielecki S. (2002) Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **29**: 189 – 195.

- Kuo C.-H., Chen J.-H., Liou B.-K., Lee C.-K. (2015) Utilization of acetate buffer to improve bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Food Hydrocolloids* **53**: 98 – 103.
- Kurosumi A., Sasaki C., Yamashita Y., Nakamura Y. (2009) Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. *Carbohydrate Polymers* **76**: 333 – 335.
- Lee K.-Y., Buldum G., Mantalaris A., Bismarck A. (2014) More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. *Macromolecular Bioscience* **14**: 10 – 32.
- Li Z., Wang L., Hua J., Jia S., Zhang J., Liu H. (2015) Production of nano bacterial cellulose from waste water of candied jujube-processing industry using *Acetobacter xylinum*. *Carbohydrate Polymers* **120**: 115 – 119.
- Lin N., Dufresne A. (2014) Nanocellulose in biomedicine: current status and future prospect. *European Polymers Journals* **59**: 302 – 325.
- Lin D., Lopez-Sanchez P., Li R., Li Z. (2014) Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917 using only waste beer yeast as nutrient source. *Bioresource Technology* **151**: 113 – 119.
- Lynd L. R., Weimer P. J., van Zyl W. H., Pretorius I. S. (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Review* **66**: 506 – 577.
- 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.
- 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. Chem.*, **127**: 1727–1731.
- Masaoka, S., Ohe, T., Sakota, N. (1993) Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. *Journal of Fermentation and Bioenergy* **75**: 18-22.

Mautner A., Lee K.-Y., Tammelin T., Mathew A. P., Nedoma A. J., Li K., Bismarck A. (2015) Cellulose nanopapers as tight aqueous ultrafiltration membranes. *Reactive and Functional Polymers* **86**: 209 – 214.

Mohammadkazemi F., Azin M., Ashori A. (2015) Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. *Carbohydrate Polymers* **117**: 518 – 523.

Molina de Olyveira G., Maria Manzine Costa L., Basmaji P. (2013) Physically modified bacterial cellulose as alternative routes for transdermal drug delivery. *Journal of Biomater Tissue Engineering* **3**: 227 – 232.

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

Müller A., Ni Z., Hessler N., Wesarg F., Müller F. A., Kralisch D., Fischer D. (2013) The biopolymer bacterial nanocellulose as drug delivery system: investigation of drug loading and release using the model protein albumin. *Journal of Pharmaceutical Science* **102**: 579 – 592.

Nimeskern L., Martínez Ávila H., Sundberg J., Gatenholm P., Müller R., Stok K. S. (2013) Mechanical evaluation of bacterial nanocellulose as an implant material for ear cartilage replacement. *Journal of Mechanical Behaviour of Biomedicine Matererials* **22**: 12 – 21.

Numata Y., Mazzarino L., Borsali R. (2015a) A slow-release system of bacterial cellulose gel and nanoparticles for hydrophobic active ingredients. *International Journal of Pharmacology* **486**: 217 – 225.

Numata Y., Sakata T., Furukawa H., Tajima K. (2015b) Bacterial cellulose gels with high mechanical strength. *Materials Science and Engineering C- Materials for Biological Applications* **47**: 57 – 62.

Rajwade J. M., Paknikar K. M., Kumbhar J. V. (2015) Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. *Applied Microbiology and Biotechnology* **99**: 2491 – 2511.

Rehim S. A., Singhal M., Chung K. C. (2014) Dermal skin substitutes for upper limb reconstruction. *Hand Clinics* **30**: 239 – 252.

Reiss, J. (1994) Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Food Research and Technology* **198**: 258-261.

Roussim, M. R. (1996) Analyses of Kombucha ferments report on growers. Information Resources, LC, Salt Lake City, Utah.

Ruka D. R., Simon G. P., Dean K. M. (2012) Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers* **89**: 613 – 622.

Santos-Ebinuma V. C., Roberto I. C., Simas Teixeira M. F., Pessoa A. (2013) Improving of red colorants production by a new *Penicillium purpurogenum* strain in submerged culture and the effect of different parameters in their stability. *Biotechnology in Progress* **29**: 778 – 785.

Schramm M., Hestrin S. (1954) Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. *Journal of General Microbiology* **11**: 123 – 129.

Shah N., Ul-Islam M., Khattak W. A., Park J. K. (2013) Overview of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material. *Carbohydrate Polymers* **98**: 1585 – 1598.

Shi Z., Zhang Y., Phillips G. O., Yang G. (2014) Utilization of bacterial cellulose in food. *Food Hydrocolloids* **35**: 539 – 545.

Sievers, M., Lanini, C., Weber, A., Schuler-Schmid, U., Teuber, M. (1995) Microbiology and fermentation balance in kombucha beverage obtained from a tea fungus fermentation. *Systematic and Applied Microbiology* **18**: 590-594.

Sreeramulu, G., Zhu, Y., Knool, W. (2000) Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **48**: 2589-2594.

- Tanskul S., Amornthatree K., Jaturonlak N. (2013) A new cellulose-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. MI 2: screening and optimization of culture conditions. *Carbohydrate Polymers* **92**: 421 – 428.
- Teoh, A. L., Heard, G., Cox, J. (2004) Yeast ecology of Kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology* **95**: 119-126.
- Thompson D. N., Hamilton M. A. (2001) Production of bacterial cellulose from alternate feedstocks. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **91 - 93**: 503 – 514.
- Trovatti E., Serafim L. S., Freire C. S. R., Silvestre A. J. D., Neto C. P. (2011) *Gluconacetobacter sacchari*: an efficient bacterial cellulose cell-factory. *Carbohydrate Polymers* **86**: 1417 – 1420.
- Tyagi N., Suresh S. (2015) Production of cellulose from sugarcane molasses using *Gluconacetobacter intermedius* SNT-1: optimization & characterization. *Journal of Cleaner Production* **112**: 71 – 80.
- Wu J.-M., Liu R.-H. (2012) Thin stillage supplementation greatly enhances bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Carbohydrate Polymers* **90**: 116 – 121.
- Wu S.-C., Li M.-H. (2015) Production of bacterial cellulose membranes in a modified airlift bioreactor by *Gluconacetobacter xylinus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **120(4)**: 444 – 449.
- Zhang S., Winestrand S., Guo X., Chen L., Hong F., Jönsson L. J. (2014) Effects of aromatic compounds on the production of bacterial nanocellulose by *Gluconacetobacter xylinus*. *Microbial Cell Factories* **13**: 62.
- Zhou, C., Wu, Q. (2012) Recent development in applications of cellulose nanocrystals for advanced polymer-based nanocomposites by novel fabrication strategies: INTECH Open Access Publisher.

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.

Vili Nemeč

ime i prezime studenta