

# Usporedba kinetike sinteze bakterijske nanoceluloze uzgojem u kompleksnim i kemijski definiranim hranjivim podlogama

---

Hranić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:159:555643>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2019. godine

Ivana Hranić

1152/BPI

**USPOREDBA KINETIKE SINTEZE  
BAKTERIJSKE NANOCELULOZE  
UZGOJEM U KOMPLEKSNIM I  
KEMIJSKI DEFINIRANIM  
HRANJIVIM PODLOGAMA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Sunčice Beluhan, izv. prof. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

*Veliko hvala dugujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Sunčici Beluhan na strpljenju, savjetima i pomoći tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada kao i prilikom pisanja diplomskog rada.*

*Posebnu zaslugu želim izraziti mojoj obitelji, bez njihove bezuvjetne podrške i ljubavi danas ne bih postigla ovo sve što jesam dosad. Hvala mama, tata, Josipe i Josipa.*

*Zahvaljujem se svim svojim dragim prijateljima i kolegama koji su uvijek bili tu uz mene i bez kojih ovo školovanje ne bi prošlo lakše i zabavnije.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

*Diplomski rad*

*Sveučilište u Zagrebu*

*Prehrambeno-biotehnološki fakultet*

*Zavod za biokemijsko inženjerstvo*

*Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada*

*Znanstveno područje: Biotehničke znanosti*

*Znanstveno polje: Biotehnologija*

### **USPOREDBA KINETIKE SINTEZE BAKTERIJSKE NANOCELULOZE UZGOJEM U KOMPLEKSNIM I KEMIJSKI DEFINIRANIM HRANJIVIM PODLOGAMA**

*Ivana Hranić, 1152/BPI*

**Sažetak:** Bakterijska nanoceluloza (BNC) je fascinantna i održiva prirodna polimerna sirovina, koju karakteriziraju izvrsna svojstva, kao što su hidrofilnost, biorazgradivost, velika sposobnost kemijske modifikacije, te sposobnost oblikovanja različitih polukristaliničnih morfologija. Opsežno su istraženi različiti uvjeti rasta, ovisno o sastavu hranjivih podloga, vremenu uzgoja, volumenu inokuluma, površini i volumenu hranjivih podloga, kako bi se maksimizirao prinos BNC proizvedene pomoću kombuche tijekom 12 dana fermentacije zaslađenog bijelog čaja u aerobnim uvjetima (50 do 110 g/L saharoze), i u Hestrin-Schramm hranjivoj podlozi (HS) koja je sadržavala različite koncentracije glukoze, galaktoze, fruktoze (1-5 % tež/vol), i glicerola (1-5 % vol/vol) kao izvora ugljika. Praćene su promjene pH vrijednosti, nastajanje organskih kiselina (octene i glukonske), etanola i prinosa BNC. Smanjenje pH vrijednosti posljedica je simbiotičko-metaboličkih aktivnosti osmofilnih kvasaca i bakterija octene kiseline i nastajanja organskih kiselina. Debljina i prinos BNC se povećavala tijekom fermentacije, ovisno o porastu površine i dubine hranjive podloge. Uzorci su analizirani FT-IR spektroskopijom te je utvrđeno da su svi imali veći postotak kristaliničnosti. Uočena je antimikrobna aktivnost BNC prema bakterijama *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.* i kvascu *Candida albicans*, ali ne i prema bakteriji *Vibrio cholerae*.

**Ključne riječi:** bakterijska celuloza, fermentacija, biotransformacija, antimikrobna svojstva, fizikalna svojstva

**Rad sadrži:** 55 stranica, 28 slika, 5 tablica, 87 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

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

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof. dr. sc. Ksenija Markov
2. izv. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan
3. prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek
4. prof. dr. sc. Blaženka Kos(zamjena)

**Datum obrane:** prosinac, 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology

*Scientific area:* Biotechnical Sciences

*Scientific field:* Biotechnology

### COMPARISON OF THE KINETICS OF BACTERIAL NANOCELLULOSE SYNTHESIS GROWING IN COMPLEX AND CHEMICALLY DEFINED MEDIA

Ivana Hranić, 1152/BPI

**Abstract:** Bacterial nanocellulose (BNC) is a fascinating and sustainable natural polymeric raw material characterized by exciting properties such as hydrophilicity, biodegradability, broad chemical-modifying capacity, and the formation of different semicrystalline fiber morfologies. An extensive matrix of different growth conditions including media, incubation time, inoculum volume, surface area and media volume were investigated in order to maximize the yield of BNC produced by Kombucha in aerobic conditions over a period up to 12 days of fermentation in sucrose-sweetened white tea (50 to 110 g/L), and in Hestrin-Schramm based media (HS) containing glucose, galactose, fructose (1-5 % w/v), and glycerol (1-5 % v/v) as carbon source. Changes in pH value, the formation of organic acids (acetic and gluconic), ethanol and BNC yield were observed. Altering in pH was due to the symbiotic metabolic activity of osmophilic yeast and acetic acid bacteria and declined with the formation of organic acids. The BNC thickness and yield increased with fermentation time and correspondingly with the increase of surface area and depth of media. Analyzing samples by FT-IR spectroscopy, it was detected that all samples had a higher percentage of crystallinity. Antimicrobial activity was observed against bacteria *Salmonella typhimurium*, *Esherichia coli*, *Pseudomonas sp.*, and yeast *Candida albicans*, but not against the bacterium *Vibrio cholerae*.

**Keywords:** Bacterial nanocellulose (BNC), Fermentation, Organic acids, Physical properties, Antimicrobial activity

**Thesis contains:** 55 pages, 28 figures, 5 tables, 87 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** PhD Sunčica Beluhan, Associate professor

#### **Reviewers:**

1. PhD Ksenija Markov, Full professor
2. PhD Sunčica Beluhan, Associate professor
3. PhD Mirela Ivančić Šantek, Full professor
4. PhD Blaženka Kos, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** December, 2019

<b>Sadržaj</b>	<b>stranica</b>
<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>3</b>
2.1. <i>KOMBUCHA</i> .....	3
2.2. MIKROORGANIZIMI U <i>KOMBUCHA</i> ČAJU.....	3
2.2.1. Kvasci u <i>kombucha</i> kulturi .....	4
2.2.2. Bakterije u <i>kombucha</i> kulturi.....	4
2.3. BIJELI ČAJ .....	4
2.4. PROCES FERMENTACIJE <i>KOMBUCHE</i> .....	5
2.5. BAKTERIJSKA NANOCELULOZA (BNC) .....	7
2.5.1. Površinska karakterizacija bakterijske nanoceluloze .....	10
2.6. PRIMJENA <i>KOMBUCHE</i> I BAKTERIJSKE NANOCELULOZE (BNC) .....	13
2.6.1. BNC kao aditiv u prehrambenoj industriji.....	13
2.6.2. BNC u biomedicini .....	15
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>17</b>
3.1. TIJEK ISTRAŽIVANJA .....	17
3.2. MATERIJALI I METODE RADA .....	18
3.2.1. Priprava kulture <i>kombuche</i> .....	18
3.2.2. Vrsta čaja.....	18
3.2.3. Priprava kompleksne podloge (bijeli čaj) .....	18
3.2.4. Kemijski definirane podloge.....	18
3.2.5. Određivanje pH vrijednosti.....	19
3.2.6. Određivanje koncentracije octene kiseline .....	19
3.2.7. Određivanje koncentracije glukonske kiseline .....	20
3.2.8. Određivanje alkohola kemijskom metodom .....	20
3.2.9. Izračunavanje mase i prinosa nanocelulozne biomase <i>kombuche</i> .....	21
3.2.10. Određivanje utjecaja površine i dubine hranjive podloge na kinetikusinteze bakterijske celuloze .....	22
3.2.11. Određivanje kapaciteta zadržavanja vode ( <i>eng.</i> Water-Holding Capacity; WHC).....	22
3.2.12. Određivanje brzine otpuštanja vode ( <i>eng.</i> Water-Release Rate; WRR) .....	23
3.2.13. FT-IR spektroskopija .....	23
3.2.14. Pretražna elektronska mikroskopija ( <i>eng.</i> Scanning Electron Microscopy; SEM) .....	23



3.2.15. Određivanje kristaliničnosti bakterijske celuloze (jodni broj) .....	23
3.2.16. Određivanje antimikrobne aktivnosti <i>kombuchabijelog čaja</i> .....	24
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>25</b>
4.1. pH VRIJEDNOST, ORGANSKE KISELINE I ETANOL .....	26
4.1.1. Kompleksna podloga – bijeli čaj .....	26
4.1.1.1. pH vrijednost .....	26
4.1.1.2. Organske kiseline .....	27
4.1.2. Kemijski definirane podloge.....	31
4.2. SINTEZA BAKTERIJSKE NANOCELULOZE (BNC) .....	36
4.3. UTJECAJ POVRŠINE I DUBINE HRANJIVE PODLOGE NA PROIZVODNJU BAKTERIJSKE NANOCELULOZE (BNC) .....	39
4.4. KAPACITET ZADRŽAVANJA I KINETIKA OTPUŠTANJA VODE ( <i>ENG. WHC I WRR</i> ) .....	40
4.5. KRISTALINIČNOST I MORFOLOGIJA POVRŠINE BAKTERIJSKE NANOCELULOZE (BNC)....	42
4.6. PRETRAŽNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA ( <i>eng. SEM</i> ).....	43
4.7. FT-IR SPEKTROSKOPSKA ANALIZA .....	44
4.8. ANTIMIKROBNO DJELOVANJE <i>KOMBUCHA</i> BIJELOG ČAJA .....	45
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>46</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>47</b>

# 1. UVOD

Bioekonomija se temelji na učinkovitoj primjeni različitih prirodnih supstrata i procesa, za proizvodnju hrane, ishrane (stoka), bio-baziranim produktima i bioenergiji. Jedan od primjera racionalnih izvora je proizvodnja bakterijske nanoceluloze (BNC), koja se može proizvesti iz različitih otpadaka ili biomase.

Svjetski poznati napitak, *kombucha*, koje su u Europu donijeli portugalski i nizozemski istraživači vjerojatno potječe sa sjeveroistoka Kine (Dufresne i Farnworth, 2000). *Kombucha* je nutritivno bogat napitak koje se priprema fermentacijom vrućih vodenih ekstrakata zelenog ili crnog čaja i saharoze združenim mikrobnim kulturama bakterija i kvasaca. Dominantne *kombucha* kulture su bakterija *Glucanacetobacter xylinus*, kvasci roda *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Saccharomyces* i ostali osmotolerantni i kiselinski tolerantni sojevi koji koegzistiraju u mediju (Sievers i sur., 1995; Liu i sur., 1996). Ovisno o podrijetlu mikrobiološke kulture i uvjeta pod kojima se provodi fermentacija razlikuju se i mikrobiološki sastavi fermentacijskih čajeva. Na granici tekućine i zraka pri statičnim uvjetima uzgoja s obzirom na aerobni karakter bakterija proizvodi se celulozni film. Mikrobiološke kulture uključene u fermentacijski proces nazivaju se "SCOBY" (eng. *symbiotic culture of bacteria and yeast*) i predstavnici su simbiotskih kultura bakterija i kvasaca ili pojednostavljeno „čajne gljive“. Ovaj pogrešan naziv je povezan sa sposobnošću bakterija da proizvedu celuloznu opnu nalik kontaminaciji s plijesni (Dufresne i Farnworth, 2000; Kappel i Anken, 1993; Teoh i sur., 2004).

Dva glavna supstrata uključena u fermentaciju *kombuche* su etanol i octena kiselina. Kvasac najprije previre šećere (saharozu, fruktozu, glukozu) u etanol, koji se koristi kao supstrat bakterijama za proizvodnju octene kiseline. Proizvedena octena kiselina potiče kvasac na proizvodnju više etanola, koji ponovno bakterije metaboliziraju (Liu i sur, 1996; Greenwalt i sur., 2000; Teoh i sur., 2004). Na površini tekućeg medija stvara se tanka celulozna pelikula (opna) koja s produženjem trajanja fermentacijskog procesa dobiva na volumenu i masi. Bakterijska nanoceluloza (BNC) je multifunkcionalni biopolimer, koji posjeduje visoki stupanj poroznosti, izrazito visoku sposobnost upijanja vode, relativno veliku propusnost za tekućine i plinove, čvrstoću strukture i ultrafinu mrežnu strukturu (Ullah i sur., 2016). Bakterijska celuloza svoju primjenu pronalazi u prehrambenoj industriji i biomedicini zbog svoje izrazite čistoće i unikatnih fizikalno-kemijskih svojstava (Dufresne i Farnworth, 2000). Danas je *kombucha* komercijalan proizvod nove generacije koji je široko

rasprostranjen te je lako dostupan velikoj populaciji u prodavaonicama zdrave hrane diljem Europe i Amerike (Malbaša i sur., 2008).

Cilj ovog rada bio je istražiti biokemijske promjene koje se zbivaju tijekom biotransformacije simbiotski združene kulture bakterija octene kiseline i kvasaca(*kombucha*) tijekom 12 dana uzgoja u kompleksnoj (bijeli čaj) i kemijski definiranim podlogama (Hestrin i Schramm, 1954) s različitim izvorima ugljika.

Tijekom fermentacija praćeni su i određivani sljedeći parametri:

- koncentracija organskih kiselina (octene i glukonske) i nastalog etanola,
- kinetika sinteze bakterijske celuloze u kompleksnim podlogama,
- utjecaj pH vrijednosti, te različitih izvora ugljika na sintezu bakterijske celuloze u kompleksnim podlogama,
- utjecaj površine i dubine hranjive podloge na sintezu bakterijske celuloze,
- utjecaj površine bakterijske celuloze na kapacitet zadržavanja i brzinu otpuštanja vode,
- antimikrobna svojstva *kombucha* napitka.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KOMBUCHA

*Kombucha* je sinonim za simbiozu bakterija octene kiseline (BOK) i kvasaca, u kojoj se isprepliću složeni mehanizmi alkoholne i octene fermentacije. Svojom metaboličkom aktivnošću mikroorganizmi *kombuche* sprečavaju rast kompetitivne mikroflore koja potencijalno može izazvati kontaminaciju proizvoda (Villarreal-Sotoi sur., 2018). Na površini fermentirajućeg čaja se istovremeno sintetizira celulozna opna, odnosno biofilm. Proizvod koji nastaje fermentacijom na crnom čaju je veoma ukusnog i osvježavajućeg ukusa, opisuje ga blaga kiselost, gaziranost i voćna aroma (Chen i Liu, 2000).

### 2.2. MIKROORGANIZIMI U KOMBUCHA ČAJU

Pokazalo se da i *kombucha*, poput mnogih drugih fermentiranih namirnica, sadrži kompleksnu zajednicu mikroorganizama. Kako tijekom fermentacije posuda ostaje otvorena za zrak, raznolikost vrsta je uglavnom nestabilna te ovisi o uvjetima uzgoja, dodatku supstrata i okolišu. Raznolikost mikroorganizama tijekom fermentacije se smanjuje, u gotovom napitku dominiraju *Proteobacteria* koje često čine više od 90% svih prisutnih bakterija (Coton i sur., 2017; Marsh i sur., 2014). Tijekom fermentacije *Acetobacter* i *Gluconacetobacter* uvelike nadvisuju koncentraciju ranije spomenutih bakterija. Među najdominantnijim kulturama bakterija octene kiseline u *kombuchi* su *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Komagataeibacter xylinus* i *Gluconobacter oxydans*. Novije studije otkrile su prisutnost više vrsta bakterija mliječne kiseline te se njihova koncentracija tijekom fermentacije povećava (Marsh i sur., 2014). Otkriveno je da rod *Lactobacillus* djeluje na rod *Gluconacetobacter* povećavajući proizvodnju celuloze i rast bakterija (Marsh i sur., 2014). Zajednica kvasca u *kombuchi* je složena i vrste koje dominiraju u kulturi mijenjaju se s vremenom. Zajednica općenito uključuje rodove *Zygosaccharomyces*, *Dekkera*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Torulasporea*, *Torulopsis*, *Pichia*, *Saccharomycoides*, *Wallemia*, *Schizosaccharomyces* i *Lachancea* (Coton i sur., 2017). Sadržaj mikroorganizama u *kombuchi* uglavnom doseže  $10^4$ - $10^6$  CFU/mL nakon 10 dana fermentacije.

### 2.2.1. Kvasci u *kombucha* kulturi

Kvasci su jednostanični eukariotski mikroorganizmi, koji pripadaju carstvu gljiva. Većina kvasaca se nespolno razmnožava asimetričnim pupanjem (Dussap i Poughon, 2017). Rast većine vrsta se odvija u blago kiselj sredini pri pH između 4 i 6, te pri temperaturi između 15 i 30°C. Prema fiziološkim karakteristikama, kvasci su fakultativno anaerobni mikroorganizmi, što znači da će se u aerobnim uvjetima pojaviti oksidativni tip metabolizma, a pri anaerobnim fermentativni (Walker, 1998). Kvasci su u biotehnologiji najviše korišteni radni mikroorganizmi (osobito *S. cerevisiae*), nadilazeći upotrebu bilo kojeg drugog industrijskog mikroorganizma. Ovaj kvasac se primjenjuje u fermentaciji prehrambenih proizvoda i pića, ali i u proizvodnji heterolognih proteina, farmaceutskih proizvoda, kemikalija i dr. (Marques i sur., 2016; Ray i Joshi, 2014).

### 2.2.2. Bakterije u *kombucha* kulturi

Stanice bakterija octene kiseline (BOK) su Gram-negativne ili Gram-varijabilne, pojavljuju se pojedinačno, u parovima ili lancima. Oblik može biti elipsoidan, štapićast sa ili bez zaobljenja na krajevima. Mogu biti nepokretne ili se kretati pomoću polarne ili peritrihalno raspoređenih flagela (Vidra i Németh, 2018). Dužina im varira od 0,8 do 4,5 µm, a širina od 0,4 do 1,0 µm (Sengun i Karabiyikli, 2011). Mezofilni su mikroorganizmi sa optimalnom temperaturom za rast od 25-30 °C. Optimalan pH za rast je između 5 i 6,5 uz mogućnost rasta i pri pH između 3 i 4 (Sengun i Karabiyikli, 2011). Obligatni su aerobi, što znači da imaju respiratorni metabolizam gdje je kisik krajnji receptor elektrona (Kersters i sur., 2006). Imaju sposobnost oksidacije šećera, šećernih alkohola i alkohola (Komagata i sur., 2014). Posjeduju katalazu ali ne i oksidazu.

## 2.3. BIJELI ČAJ

Čaj je jedan od najpopularnijih napitaka diljem svijeta i stoljećima se koristi u tradicionalnoj medicini (Pawar, 2018). Tek posljednjih desetljeća moderna znanost otkriva razlog zdravlja i dugovječnosti ljudi koji svakodnevno konzumiraju čaj. Bijeli čaj je nefermentirani čaj dobiven od mladih izbojaka i pupova biljke čajevac *Camellia sinensis* (Porodica: *Theaceae*), zaštićene od sunca da bi se izbjegla razgradnja polifenola.

Za razliku od crnog ili zelenog čaja, bijeli čaj se ne rola, a tek malo oksidira, što ga čini najmanje prerađenim čajem. Od mladih listova čaja s mnogo finih srebrnih dlačica može se proizvesti kvalitetan bijeli čaj. Lišće i pupoljci mogu se osušiti na prirodnom suncu prije nego što se lagano obrade kako bi se spriječila oksidacija ili daljnja obrada čaja. Nakon skupljanja lišća brzo se suši parom - oksidacije uopće nema. Kako nema oksidacije, sadrži najviše antioksidansa i katehina, najmanje kofeina, a ima blijedu boju s delikatnim, slatkim okusom (Tablica 1).

**Tablica 1.** Usporedba sastava i svojstava bijelog, zelenog i crnog čaja (Pawar, 2018)

Parametri	Bijeli čaj	Zeleni čaj	Crni čaj
Prosječni udjel kofeina/šalice	15 mg	40 mg	20 mg
Ukupni polifenoli/100 g	16,23-25,95	13,7-24,7	8,3-24,8
Postupak obrade (fermentacija)	nema	kratka	duga
Okus	sladak	sladak, gorak	gorak
Boja	svijetlo žuta	zeleno ili tamno žuta	crvena ili crna

S obzirom da je najmanje prerađivan, bijeli čaj je izvrstan izvor ukupnih polifenola, koji mu daju izvanrednu moć u preveniranju bolesti i poremećaja. Bijeli čaj štiti od karcinoma, bolesti srca, moždanog i srčanog udara, koji su najčešći uzroci smrti u industrijaliziranom svijetu. Postoji 5 glavnih vrsta bijelog čaja koji uključuju najpoznatiju vrstu Silver Needle, zatim Pai Mu Tan, koji je korišten u ovom radu, White Peony, Long Life Eyebrow i Tribute Eyebrow (Pawar, 2018).

Glavni sastojci čaja su proteini, polisaharidi, polifenoli, minerali i elementi u tragovima, amino i organske kiseline, lignini i metilksantini (kofein, teofilin i teobromin). Bijeli čaj sadrži oko 3,35-5,74 % kofeina, 16,23-25,95 % polifenola, 0,06-1,44 % flavonoglikozida i 7,94-16,56 % katehina. Zbog svog sastava, bijeli čaj ima jača antiviralna i antibakterijska svojstva od zelenog i crnog čaja.

#### **2.4. PROCES FERMENTACIJE KOMBUCHE**

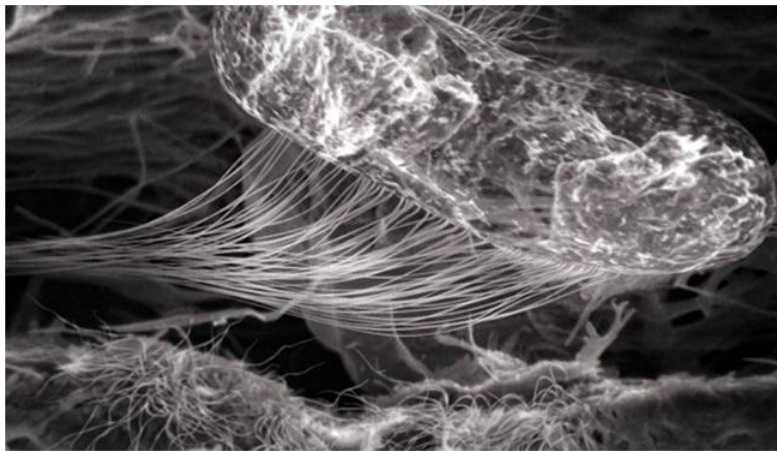
Jedna od najstarijih metoda za konzerviranje hrane uz sušenje je fermentacija. Otkrivena je slučajno te dugo nije bilo poznato što joj je uzrok. Tek krajem osamnaestog stoljeća,

znanstvenici su razjasnili da su mikroorganizmi odgovorni za proces fermentacije hrane, nakon što je Louis Pasteur je dokazao da fermentaciju nemoguće izvesti bez prisutnosti mikroorganizama (Lavefve i sur., 2019). Fermentacijom se postiže trajnost proizvoda proizvodnjom inhibicijskih metabolita u koje se ubrajaju: organske kiseline, etanol, ugljikov dioksid, diacetil, bakteriocini i dr., čijim prisustvom se stvaraju nepovoljni uvjeti za rast mikroorganizama koji mogu dovesti do kvarenja proizvoda, a hrana se konzervira. Inhibiranjem rasta patogenih mikroorganizama postiže se i očuvanost proizvoda, ali i kvaliteta hrane povećanjem nutritivne vrijednosti, kao i unapređenje organoleptičkih svojstava (Ray i Joshi, 2014; Villarreal-Soto i sur., 2018; Lavefve i sur., 2019). *Kombucha* se tradicionalno proizvodi od crnog čaja i saharoze, ali je veoma česta upotreba i zelenog čaja. Krajnji proizvodi metabolizma ovise o mnoštvu faktora: vrsti i količini čaja, koncentraciji saharoze, temperaturi i vremenu fermentacije, vrsti bakterija i kvasaca prisutnih u starter kulturi. Svaka promjena uvjeta fermentacije utječe i na krajnji proizvod (Villarreal-Soto i sur., 2018). Saharoza je najčešće korišten izvor ugljika koji se dodaje prije početka *kombucha* fermentacije. Kvasci će je enzimom invertazom razgraditi do fruktoze i glukoze, koji će na taj način postati dostupni i bakterijama octene kiseline. Kvasci koriste oba monosaharida i putem glikolize nastaje etanol i ugljikov dioksid (El-Salam, 2012). Vrste mikroorganizama prisutne u simbiotskoj kulturi *kombuche* i njihove metaboličke aktivnosti, ovise o stupnju iskorištenja glukoze i fruktoze, kao i prioritetu njihovog korištenja (Sievers i sur.,1995). *Komagataeibacter xylinus* koristi glukozu za sintezu octene i glukonske kiseline, kao i celulozne pelikule. Sa druge strane, fruktozu slabo metabolizira, dok saharozu uopće ne koristi. Oksidaciju etanola do acetaldehida vrši alkohol dehidrogenaza (ADH), a potom aldehyd dehidrogenaza (ALDH) oksidira aldehyd do octene kiseline. Ovu sposobnost imaju svi rodovi BOK osim roda *Asaia*. Dehidrogenacija se odvija na površini stanične stijenke (Slika 1) gdje su vezani enzimi dehidrogenaze, kao i na citoplazminoj membrani, na strani periplazme, gdje se nalazi još jedan set dehidrogenaza (Komagatai sur., 2014).





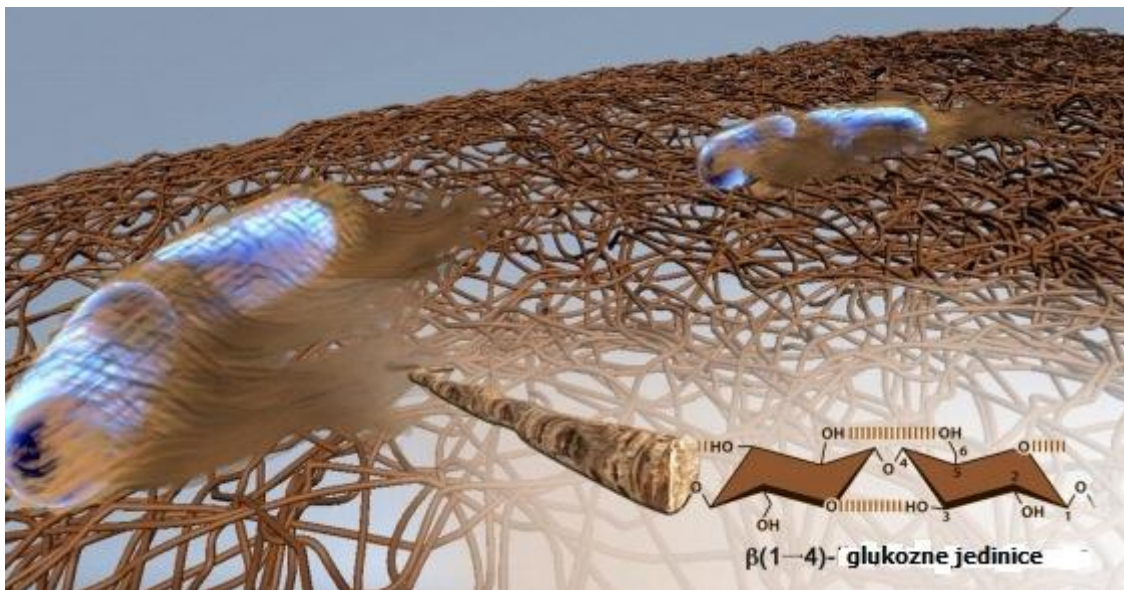
Ovakva samo-imobilizacija stanica omogućava učinkoviti transport hranjivih tvari i kisika, koji su esencijalni za ove aerobne bakterije. S obzirom na veliku sposobnost zadržavanja vode (udjel vode je oko 98 % vlažne mase pelikule), ovi polisaharidi štite njihove proizvođače od isušivanja. Celulozni matriks štiti ove bakterije i od drugih negativnih okolišnih čimbenika, kao što je UV zračenje. Bakterije sintetiziraju celulozu s vanjske strane njihove površine i relativno su pokretne, što dovodi do uspješne kolonizacije ekoloških niša, čime se smanjuje dostupan prostor i pristup hranjivima drugim mikroorganizmima koji nastanjuju isto stanište (Keshk i Semeshima, 2006) (Slika 2).



**Slika 2.** Sinteza bakterijske celuloze na površini bakterijske stanice (Keshk i Semeshima, 2006)

BNC sintetiziranu s bakterijama iz roda *Gluconacetobacter* karakterizirana je jedinstvenim svojstvima, koji su rezultat prirodne biološke uloge, kao što su visoka hidrofilnost, kristaliničnost, čistoća i kapacitet zadržavanja vode, mehanička izdržljivost i otpornost na razgradnju, izvrsna biokompatibilnost i nedostatak citotoksičnosti i alergnosti. Zbog ovih svojstava i osjetljivosti prema biološkim, kemijskim i fizikalnim modifikacijama, ovaj prirodni biomaterijal je pronašao brojne primjene u proizvodnji bioprodukata i smatra se „bio-bazom“ za razvoj novih materijala u različitim područjima, kao što su prerada hrane, elektronika, proizvodnja papira, kemijska i tekstilna industrija, kao i u medicini. Stalno rastuće zanimanje za bakterijsku nanocelulozu u različitim granama industrije i medicine iznjedrilo je i rezultiralo brojnim istraživanjima na poboljšanju proizvodne učinkovitosti, uz istovremene pokušaje smanjenja troškova biosinteze i modifikacije bakterijske nanoceluloze.

Pojava celulozne pelikule na površini podloga za proizvodnju *kombuche* je karakteristika koja se javlja tijekom *kombucha* fermentacija kao sekundarni proizvod. Dominantna vrsta koja sintetizira celulozu je *Komagataeibacter xylinus*, (ranije klasificirana kao *Acetobacter xylinum*, a potom i kao *Gluconacetobacter xylinus*) (Villarreal-Soto i sur., 2018). Proizvodnja se odvija u prisutnosti zraka, uz miješanje (aeracija) pri čemu nastaju peleti ili u statičnim uvjetima kada se formira porozna pelikula sastavljena od guste mreže nanoceluloznih vlakana (Islam i sur., 2017) (Slika 3).

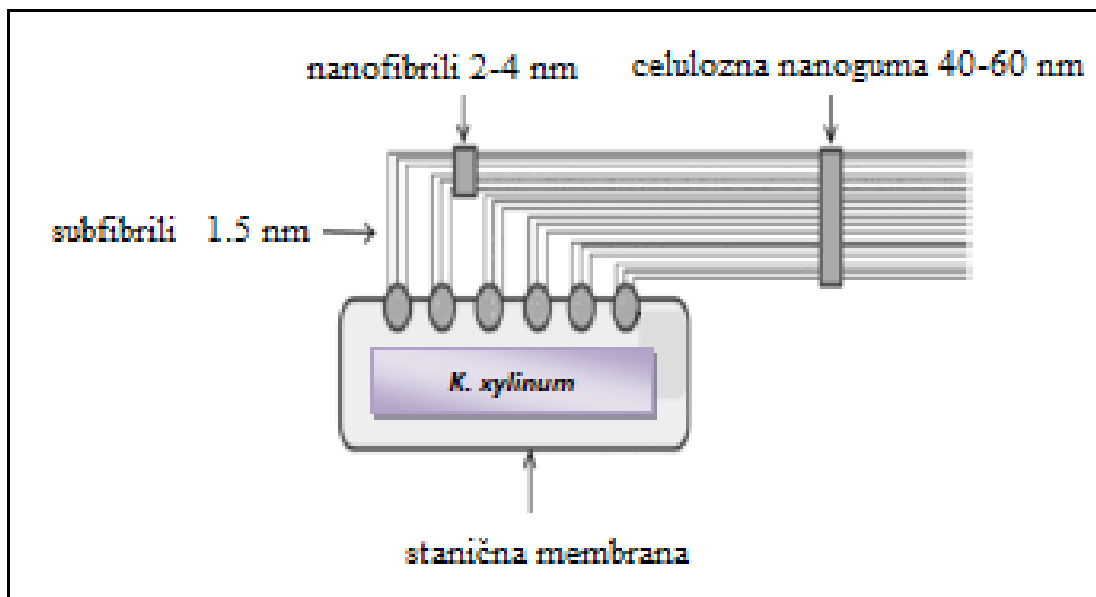


**Slika 3.** 3-D struktura bakterijske celuloze (de OliveiraBarud i sur., 2016)

Nanocelulozna pelikula nastaje polimerizacijom ostataka glukoze, formiranjem lanaca  $\beta$ -1,4-glukana i vezana je izvanstanično za bakterijsku stanicu. Svaka stanica sadrži između 50 i 80 pora, promjera 3,5 nm, kroz koje celuloza izlazi iz membrane. Sastavljanjem ovih celuloznih niti nastaju čvršći nanofibrili koji, nakon što se poveže oko 1000glukanskih lanaca, formiraju mikrofibrile u 3D strukturi (Slika 4).

Nastala celuloza se sastoji od dva tipa celuloze. Prva je nalik na gumu, dok je druga amorfan polimer koji je termodinamički stabilniji (Villarreal-Soto i sur., 2018). U strukturi amornog polimera se nalaze mikro-i nanopore koje mogu zadržati različite nanočestice čime se povećava mogućnost primjene nastalih nanostrukture. Uklanjanjem amornog dijela kiselinskom hidrolizom, mogu se proizvesti nanokristali koji primjenu mogu naći u proizvodnji stabilizatora i učvršćivača za hranu, prehrambene ambalaže, biomedicinskih

materijala (umjetna koža, umjetne krvne žile, umjetne dijafragme), tretiranju rana i opekline (Campano i sur., 2016). Karakteristike bakterijskog celuloznog polimera su visoka kristalnost, visoka zatezna čvrstoća, elastičnost, netopljivost u većini otapala, mogućnost željenog oblikovanja, visok stupanj polimerizacije i zadržavanje do 200 puta više vode u odnosu na suhu masu. Za razliku od biljne celuloze, niti bakterijske celuloze su do 100 puta tanje, ne sadrže hemicelulozu, pektin i lignin, što ih čini čistijim izvorom celuloze (Villarreal-Soto i sur., 2018).



**Slika 4.** Građa nanoceluloznih mikrofibrila kod bakterije *K. xylinum* (Villarreal-Soto i sur., 2018)

### 2.5.1. Površinska karakterizacija bakterijske nanoceluloze

Bakterijska nanoceluloza (BNC) poprimila je značajan interes zbog svojih jedinstvenih strukturnih značajki i impresivnih fizikalno-mehaničkih svojstava. Svako nanovlakno bakterijske nanoceluloze snop je celuloznih nanofibrila koji su agregati proširenih celuloznih lanaca; koeficijent toplinske ekspanzije nanovlakana bakterijske nanoceluloze u aksijalnom smjeru sličan je onome od stakla (minimalno 0,1 ppm/K), Youngov modul (približno 128GPa) i vlačna čvrstoća nanofibrila bakterijske celuloze (procijenjeno na najmanje 2 GPa) čine ih gotovo jednakima vlaknima aramida (npr. Kevlar), (Zhou i sur., 2013). Iskorištenje

potpunog potencijala bakterijske nanoceluloze zahtijeva znanje o karakteristikama i svojstvima celuloze na nano osnovi.

Svojstva i primjena bakterijske nanoceluloze kao membrane u velikoj mjeri ovisi o svojstvima površine. Osnovne metode za analizu površine uključuju mikroskopiranje. Kvaliteta informacija dobivenih koristeći mikroskop većinski ovisi o razlučivosti i kontrastu (Grubb i Sawyer, 1996). Brojne tehnike, uključujući određene tipove elektronske mikroskopije (EM), skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) i optičke mikroskopije, koriste se za karakterizaciju površine bakterijske nanoceluloze. Svaki od ovih tipova mikroskopije ima svoje prednosti i ograničenja u njihovoj primjeni za istraživanja celuloze. Najjednostavnija metoda, svjetlosna mikroskopija, zbog svoje dostupnosti omogućuje pregled s manjim povećanjem za lociranje specifičnih polja ili provjeru orijentacije (Reid, 1974). Značajno ograničenje metode je činjenica da tvari niže valne duljine od svjetlosti nije moguće razlučiti svjetlosnom mikroskopijom. Stoga, za vizualizaciju detalja naprednim mikroskopskim metodama primjenjuju se metode koje koriste pobuđene elektrone kao izvor osvjetljenja. Najčešće metode za karakterizaciju površine bakterijske celuloze su SEM, TEM i AFM.

**Tablica 2.** Najčešće metode analize površine BNC

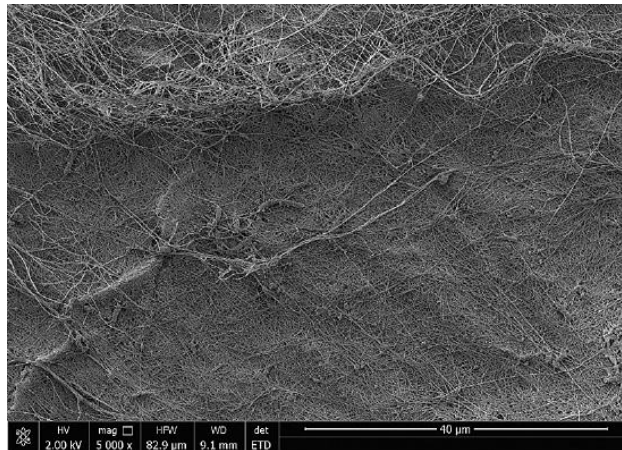
<b>Skraćenica</b>	<b>Tehnika</b>	<b>Izlazna zraka</b>
<b>SEM</b>	Skenirajuća elektronska mikroskopija	Elektroni
<b>TEM</b>	Transmisijska elektronska mikroskopija	Elektroni
<b>AFM</b>	Mikroskopija atomske sile	-
<b>SIMS</b>	Mikroskopija sekundarne ionske mase	Ioni
<b>HEFM</b>	Fluorescentna mikroskopija visoke rezolucije	Fotoni
<b>CARS</b>	Koherentna anti-Stokes Raman mikroskopija	Fotoni
<b>SHG</b>	Harmonična mikroskopija druge generacije	Elektroni

SEM koristi rastersko skeniranje koje pruža signale koje nose informacije o svojstvima površine uzorka i njegove trodimenzionalne projekcije. U SEM-u, zraka pobuđenih elektrona (koje emitira izvor elektrona) bombardira uzorak, skenirajući površinu liniju po liniju. Elektroni uzajamno djeluju s uzorkom što uzrokuje emisiju različitih signala (elektrona, fotona, X-zraka, infracrvenih, ultraljubičastih, poluvodičkih učinaka s uzorcima). Te signale registriraju odgovarajući detektori i naknadno ih obrađuju u sliku ili koriste za dobivanje

spektra rendgenskih zraka (Nixon i sur., 1971). Uzorak se može mehanički pomicati kroz x, y i z smjer, rotirati, zakretati, itd.

Za tradicionalno snimanje pomoću SEM uzorak mora biti električni provodljiv, barem na površini. Neprovodni materijali mogu se obložiti ultra tankim filmom (premazom pomoću niskog vakuuma ili isparavanjem pod visokim vakuumom) ugljika, zlata, platine, osmija ili drugog vodljivog materijala da bi se postigla provodljivost bez značajnog utjecaja na morfologiju površine uzorka. Drugi važan faktor je kompatibilnost uzorka čak i s umjerenim vakuumom (prosjeck vrijednosti tlaka u sustavu tijekom analize je  $1 \cdot 10^{-5}$  Torr ili manje). Ovisno o proizvođaču mikroskopa, u velikoj komori SEM obično se može nalaziti uzorak promjera do 200mm. Veći uzorci (300mm) se mogu analizirati s ograničenim stupnjem zakreta. Visina uzorka je obično ograničena na 50mm.

Celulozni uzorci se većinom tretiraju teškim atomima (zlato, platina ili osmij) kako bi se neprovodni suhi celulozni materijal pretvorio u provodni materijal (Dikin i sur., 2006). SEM se često koristi za karakterizaciju morfologije i mikrostrukture BNC i nanokompozita bakterijske nanoceluloze. Elektronsko snimanje BNC pod naponom omogućuje određivanje izgleda membranske mreže, određivanje poroznosti, morfologije i dimenzije vlakana. Slika 5. prikazuje SEM sliku bakterijske celuloze koja prikazuje koherentnu 3D mrežu formiranu od celuloznih vlakana.



**Slika 5.** SEM mikrografija uzorka bakterijske nanoceluloze (Technopark, Lodz, Poljska)

Nakon kemijske modifikacije bakterijske nanoceluloze, na nju se vezuju, male molekule, neorganske nanočestice i drugi polimeri što vodi do stvaranja različitih funkcionalnih nanokompozita. Vrlo često ugradnja raznih kemijskih komponenti mijenja strukturu

bakterijske nanoceluloze. SEM pomaže u određivanju strukture i homogenosti nanoceluloznog materijala, prisutnosti ugrađenih supstancija i vjerojatnu orijentaciju celuloznih kristala (Sabu i sur., 2012).

## **2.6. PRIMJENA *KOMBU* I BAKTERIJSKE NANOCELULOZE (BNC)**

Bakterijska nanoceluloza se zbog svoje visoke čistoće, hidrofilnosti, sposobnosti za formiranje struktura, kiralnosti i biokompatibilnosti može upotrijebiti u širokom spektru posebnih primjena, npr. kao hrana (*Nata de coco*), izvor dijetalnih vlakana, kao akustične ili filter membrane, ultra čvrsti papir, fino mrežasta optička mreža s oblogom. Karakteristike zgušnjavanja i suspendiranja daju već sada nekoliko primjena bakterijske nanoceluloze u humanoj i veterinarskoj medicini.

### **2.6.1. BNC kao aditiv u prehrambenoj industriji**

Jedan od prvih komercijalno dostupnih proizvoda bakterijske nanoceluloze (BNC) je *Nata de Coco*. Tradicionalni narodni je proizvod na Filipinima (Keshk i Sameshima, 2006), izvoz *Nata* iz Filipina u Japan imao je veliki utjecaj na globalno širenje proizvodnje mikrobnog celuloze. To je prehrambeni proizvod od bakterijske nanoceluloze koji nastaje fermentacijom otpadnih voda nakon obrade kokosa bakterijama octene kiseline koje imaju sposobnost sinteze nanoceluloze, pomoću *K. xylinus* (Lapuz i sur., 1967). Najčešća uporaba *Nata de Coco* uključuje niskokalorične zaslađene deserte, voćne salate i hranu bogatu vlaknima.

Potencijalne primjene bakterijske nanoceluloze (BNC) u prehrambenoj tehnologiji uključuju preljeve, umake, glazure, kiselo i tučeno vrhnje, šlag i smrznute mliječne deserte. Njegova se uporaba posebno preporučuje u situacijama koje zahtijevaju stabilizaciju pjene i stabilnost pH područja te održavanja temperature. Upotreba BNC u kombinaciji s drugim sredstvima poput saharoze i karboksimetil-celuloze poboljšava disperziju proizvoda. Također je niskokalorični aditiv, zgušnjivač i stabilizator (Khan i sur., 2007).

Okiyama i sur. (1992), pokazali su da se membranska BNC može preraditi sa šećernim alkoholima, alginatima ili kalcijevim kloridom te joj se na taj način mogu promijeniti teksturna svojstva. Ti autori pripremili su novi oblik celuloze raspadanjem BNC u suspenziju. Viskoznost suspenzije bakterijske nanoceluloze bila je niža u usporedbi s uobičajenim zgušnjivačima, kao što je ksantan guma, celulozni prah, mikrofibrilirana celuloza i mikrokristalna celuloza. Kao punilo, BNC ima najveći kapacitet zadržavanja vode među

komercijalnim proizvodima od celuloze. BNC se smatra toplinski stabilnim stabilizatorom, niske viskoznosti i niskokaloričnom zamjenom za masti. Kao dokaz tehnološke funkcije BNC dodatno je ugrađena u čokoladna pića, začine za tijesta, sladoled, tofu, pljeskavice, kobasice i „an“ (džem od crvenog graha). Istraživanja Okiyame i sur. (1993) pokazali su da fizikalno-kemijska svojstva bakterijske nanoceluloze djeluju pozitivno u prehrambenim sustavima, osim u hrani s niskom vlagom kao što su slastice i grickalice. U primjeni na tekućine, BNC stabilizira zagrijane suspenzije, poput čokoladnog napitka i juhe učinkovitije od ksantan gume (Shi i sur., 2014) (Slika 6).



**Slika 6.** Primjena bakterijske celuloze u prehrambenoj tehnologiji (Shi i sur., 2014)

Dodatak BNC u čvrstu hranu mijenja njihova reološka svojstva. Kada je BNC dodana krhkim gelovima kao što u sojina skuta i rezanci heljde, hrana je ojačana zadržavajući nježnu teksturu. S druge strane, kada se doda u elastične gelove, bakterijska nanoceluloza sprječava stvaranje gela autohtonih makromolekula hrane i smanjuje elastičnost. U tijestima, BNC smanjuje ljepljivost i daje čvrstoću (Okiyama i sur., 1993). Ng i Shyu (2004) predložili su novi prehrambeni proizvod, *Monascus*-bakterijski celulozni kompleks, koji ima svojstva i bakterijske nanoceluloze i *Monascus* gljive, a pokazao se potencijalnom novom hranom u vegetarijanskoj prehrani, kao zamjena za meso ili morske plodove. Boja i tekstura kompleksa

su poput jetre ili nemasnog mesa. Također je izvor visokog sadržaja vlakana, nisko kaloričan je i sadrži zdrave hranjive tvari. U 2013. godini patentiran je izum vezan uz keks s visokim udjelom dijetalnih vlakana koji sadrži BNC, a priprema se dodatkom do 70% BNC običnom keksu (Hong i Yang, 2013). Patent je sadržavao opis načina pripreme biskvita s visokim dijetalnim vlaknima. Dodatkom BNC u biskvit, poboljšao se okus i povećale su se sposobnosti adsorpcije štetnih tvari u ljudskom organizmu u usporedbi s običnim biskvitom dijetalnih vlakana. Novi biskvit s dijetalnim vlaknima poboljšao je nutritivnu vrijednost samog keksa i nadogrudio njegove funkcionalne potrebe, a proces proizvodnje je jednostavan i zahtijeva malo ulaganja u opremu, predstavljajući tako proces proizvodnje ekonomski isplativim i pogodnim za industrijsku proizvodnju (Hong i Yang, 2013). Watanabe i sur. (1998) i Clark i sur. (1997) objavili su dva patenta koji se odnose na upotrebu niskokalorične i organoleptički prihvatljive vodene paste koje sadrži dijetalna vlakna (BNC), koja se općenito mogu koristiti kao sirovina u pripremi nekoliko jela. Predstavljena je detaljna demonstracija metoda i sastava uključenih u proizvodnju hamburgera, kobasica, džema od graha, kaše od riže i mnoge druge hrane. BNC, korištena u znatno nižim količinama, sposobna je pružiti poželjne funkcionalnosti hrani, od onih uobičajeno potrebnih za konvencionalne aditive na bazi celuloze.

### 2.6.2. BNC u biomedicini

Bakterijska nanoceluloza (BNC), otkako je prepoznata kao visoko biokompatibilni hidrogel, postala je predmetom opsežnog istraživanja, iskorištavajući njezina jedinstvena svojstva u polju biomedicinskih znanosti. Mnogi znanstvenici ju smatraju izvrsnom alternativom sintetičkim polimerima, koji i dalje, unatoč različitim neupitnim prednostima, kao što su kontrolirana poroznost, biorazgradivost, lakoća proizvodnje i modifikacije uzrokuju prekomjerni imunološki odgovor i kod dugotrajnih primjena često ne ispunjavaju na odgovarajući način svoje funkcije. BNC, kao prirodni polimer izvrsne kemijske čistoće, ima priliku postati konkurentnim proizvodom, uspješno primijenjenom u medicini za rekonstrukciju i regeneraciju tkiva. Bakterijsku nanocelulozu odlikuju različita svojstva koja imaju učinak na njene strukturne karakteristike i što ju čini vrlo atraktivnim materijalom s medicinskog stajališta. Najviše važni su: ultrafina mrežna struktura, koja djeluje izrazito kristalinično, kao i jednoosna orijentacija celuloznih subfibrila; ekstremna netopljivost; velika elastičnost i prozirnost (nakon pročišćavanja), koja je rezultat nano debljine vlakana; hidrofилna svojstva eksplicirana prisustvom brojnih pora; svojstva nalik hidrogelu, jer najmanje 95% njene mase čini voda, koja većinom nije vezana na polimer i može se istisnuti



laganim pritiskom; izvanredna kemijska čistoća, kao posljedica neprisutnosti hemiceluloze, pektina i lignina koji obavijaju biljnu celulozu; biokompatibilnost koja je rezultat visoke čistoće materijala i nedostatka toksičnih učinaka na živa tkiva; neuobičajeno visoka zatezna čvrstoća koja dolazi od ultrafine mrežne strukture i prikazana je visokim Young-ovim vrijednostima modula; osjetljivost na različite kemijske i fizikalne modifikacije tijekom kultivacije, kao i nakon pročišćavanja (Bielecki i sur., 2013; Bielecki i sur., 2002).

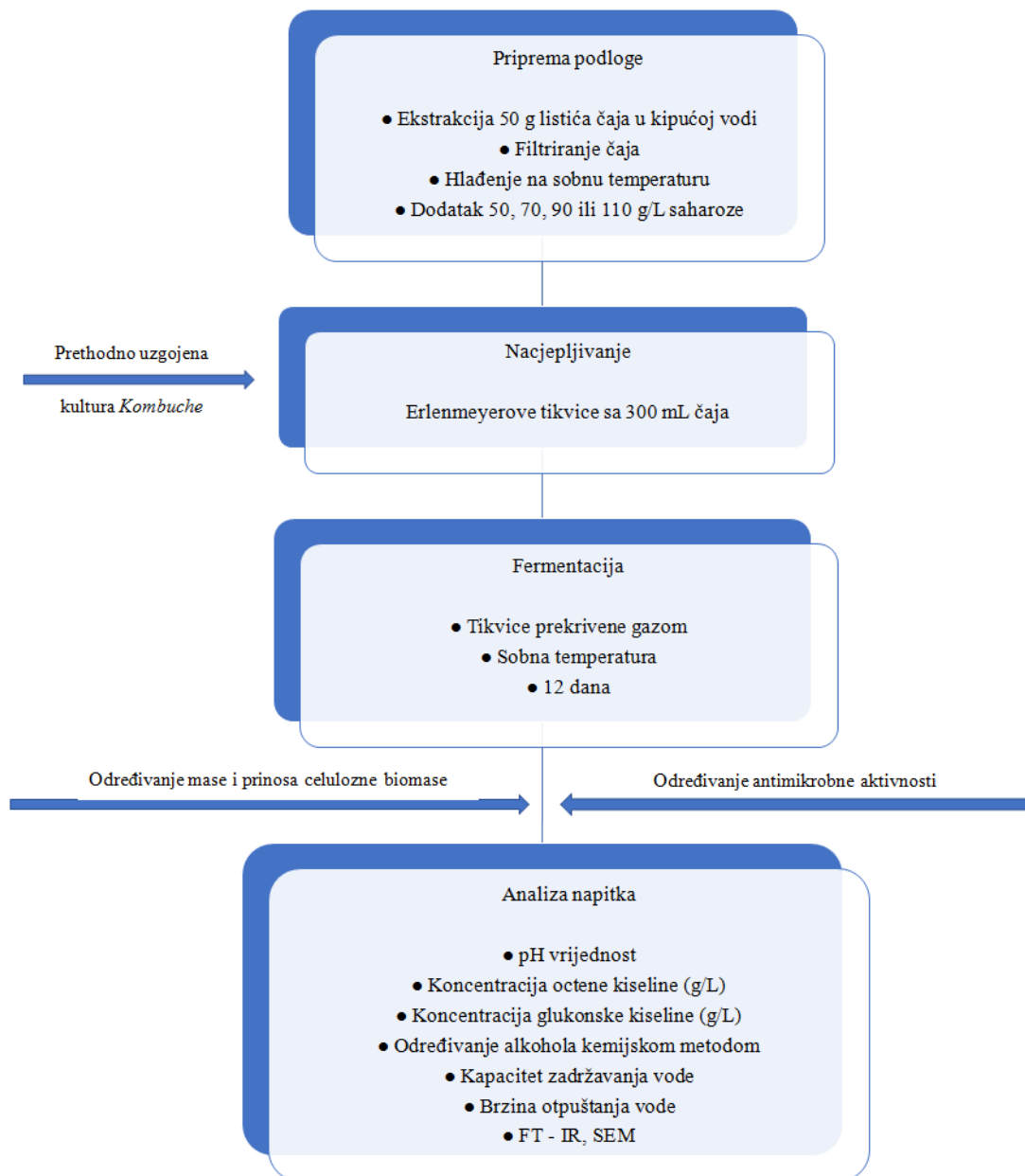
Bakterijska nanoceluloza (BNC) nalazi mnogo različitih primjena, ne samo zbog svojih jedinstvenih svojstava, nego i zbog činjenice da pripada proizvodima s GRAS (eng. *Generally Recognized As Safe*) statusom. Kao biološki materijal može se lako proizvesti u industrijskim razmjerima za sektore kao što su industrija papira i tekstila, elektronika ili šumarstvo. U kozmetičkoj industriji se koristi kao stabilizator emulzija (kreme, tonike, balzama za nokte, itd.) i kao komponenta umjetnih noktiju. Mnogo polja primjene BNC se može spomenuti, ali ona koja najviše plijeni pozornost je primjena u biomedicini. Već je nađeno da mikrobnna celuloza ima veliki potencijal primjene u postupku zacjeljivanja rana (Slika 7). Primjenjuje se kao dehidrirani ili nikad osušeni pokrov za rane koji ubrzava proces zarastanja i smanjuje stvaranje ožiljaka. S druge strane veličina šupljih prostora unutar celulozne mreže i nedostatak efekta bubrenja odgovaraju potrebama za unutarnju primjenu ovog materijala. Rasprostranjena istraživanja u posljednjih 10 godina u *in vivo* primjenama BNC ukazuje na potrebu daljnjih istraživanja vezanih uz njegovu upotrebu u rekonstrukcijskoj kirurgiji.



**Slika 7.** Membrana bakterijske nanoceluloze korištena za previjanje rana razvijena na Institute of Technical Biochemistry na Lodz University of Technology: A) celulozne pelikule uzgajane na površini bakterijske kulture, B) pročišćena membrana BNC spremna za previjanje rane, C) *in vivo* primjena celuloznog hidrogela na opeklini

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. TIJEK ISTRAŽIVANJA



Slika 8. Shematski dijagram tijeka cjelokupnog istraživanja

## 3.2. MATERIJALI I METODE RADA

### 3.2.1. Priprava kulture *kombuche*

Komercijalna starter kultura *kombuche* je pripravljena s „majčinskom tekućinom“ u bijelom čaju uz dodatak 80 g/L saharoze. Uzgoj je trajao 8 dana u aseptičnim uvjetima pri 28 °C u termostatu.

### 3.2.2. Vrsta čaja

Uzgojena *kombucha* nacijepljena je na infuziju bijelog čaja, Pai Mu Tan, Nutrigold, Kina.

Sastav čaja: listići bijelog čaja biljke čajevac *Camellia sinensis*.

### 3.2.3. Priprava kompleksne podloge (bijeli čaj)

Infuzija bijelog čaja je pripravljena dodatkom 50 g čaja u 1 L vode zagrijane na 80 °C u koju je dodano 50, 70, 90 i 110 g/L saharoze (bijeli konzumni šećer). Nakon ekstrakcije koja je trajala 3 minute (prema naputku proizvođača), čaj je ohlađen na sobnu temperaturu. Infuzija bijelog čaja je prelivena u sterilne staklene posude za kućnu uporabu (1500, 720 i 370 mL), nakon čega su uzorci inokulirani sa svježe uzgojenom *kombucha* kulturom (30 % tež/vol). Nacijepljeni uzorci su inkubirani pri 25 °C (sobna temperatura) tijekom 12 dana, nakon čega je prevrela tekućina centrifugirana pri 2500 okr/min tijekom 10 minuta, a supernatant je uporabljen za daljnja određivanja. Kontrolni uzorak je bila neprevrela infuzija bijelog čaja pripravljena isti način, kao i prevrela.

### 3.2.4. Kemijski definirane podloge

Osnovna kemijski definirana podloga u istraživanjima je bila Hestrin-Schramm tekuća podloga (Hestrin i Schramm, 1954) sljedećeg sastava (g/L):

- glukoza 20
- pepton 5
- kvašćev ekstrakt 5
- dinatrijev fosfat 2,7

- limunska kiselina 1,15

Pripravljena osnovna podloga je sterilizirana u autoklavu tijekom 20 min na 121 °C, a pH prije sterilizacije je podešen na 5,0. Sterilizirana podloga (po 100 mL) je razlivena u 20 tikvica od 300 mL u koje su dodane različite koncentracije glukoze, galaktoze, fruktoze i glicerola.

1. podloga: 4 tikvice s dodatkom glukoze (1 - 5 % tež/vol);
2. podloga: 4 tikvice s dodatkom galaktoze (1 - 5 % tež/vol);
3. podloga: 4 tikvice s dodatkom fruktoze (1 - 5 % tež/vol);
4. podloga: 4 tikvice s dodatkom glicerola (1 - 5 % vol/vol);
5. podloga: 4 tikvice s osnovnom podlogom, uz različiti pH (3; 4; 5; 7).

Podloge su inokulirane s 10 % inokuluma (10 g/100 mL), nakon toga je proveden uzgoj 12 dana pri 25 °C (sobna temperatura). Prevrele podloge su centrifugirane pri 2500 okr/min tijekom 10 minuta, a supernatanti su uporabljeni za daljnja određivanja.

### 3.2.5. Određivanje pH vrijednosti

Uzorcima je pH vrijednost mjerena svaki dan tijekom 12 dana fermentacije. Mjerenja su provedena nakon pažljivog izuzimanja 5 mL uzorka pipetiranjem uz rub posuda, kako ne bi došlo do oštećenja nanocelulozne biomase koja pluta na površini uzorka. Mjerenja su provedena pomoću pH metra Hanna Industrial model HI 98103.

### 3.2.6. Određivanje koncentracije octene kiseline

U Erlenmeyer tikvicu od 200 mL stavljeno je 1 mL uzorka fermentiranog 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 (g/L) izračunata je prema izrazu:

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

gdje je:

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

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

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

### 3.2.7. Određivanje koncentracije glukonske kiseline

U Erlenmeyer tikvicu od 200 mL stavljeno je 20mL 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)

### 3.2.8. Određivanje alkohola kemijskom metodom

Udjel alkohola u fermentiranim uzorcima 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  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . 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 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 alkohola utrošen je jedan dio bikromata, dok je drugi dio ostao u suvišku. 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.

Tada dolazi do oksido-redukcijskog procesa između preostalog kalijevog bikromata i KI: krom se iz šesterovalentnog reducira u trovalentni, a jod iz KI se oksidira u elementarni jod, zbog čega otopina dobije tamnu boju. Pritom se elementarni jod 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 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:

$$\text{alkohol (vol \%)} = \left(10 - \frac{a}{6,9}\right) \cdot 2 \quad (3)$$

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

### 3.2.9. Izračunavanje mase i prinosa nanocelulozne biomase *kombuche*

Nakon 12 dana fermentacije, plutajući gelovi nanocelulozne biomase, koji su formirani na površini hranjivih podloga su pažljivo izvađeni iz staklenih posuda, oprani demineraliziranom vodom i ostavljeni preko noći u 1M NaOH na sobnoj temperaturi kako bi se uklonile stanice mikroorganizama i sastojci podloga. Nakon toga su gelovi bakterijske celuloze ispirani demineraliziranom vodom sve dok pH vode za ispiranje nije dostigao početnu vrijednost vode (Toda i sur., 1997). Oprani gelovi su uronjeni u 96 %-tni EtOH tijekom 2 sata, izvagani da bi se izmjerila masa vlažne nanocelulozne biomase i nakon toga stavljeni na sušenje u suhi sterilizator pri 50 °C/4 sata. Izmjerena je masa nanocelulozne biomase (g) prema sljedećoj formuli:

$$m_{cb} \text{ (g)} = m_{bt} - m_i \quad (4)$$

gdje je:

$m_{cb}$  = masa (vlažne/suhe) nanocelulozne biomase (g)

$m_{bt}$  = masa (vlažne/suhe) biomase na kraju fermentacije (g)

$m_i$  = masa inokuluma (g)

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

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

3.2.10. Određivanje utjecaja površine i dubine hranjive podloge na kinetiku sinteze bakterijske celuloze

Svi istraživani uzorci pripremljeni su u staklenim posudama sljedećih dimenzija:

a) Kemijski definirana podloga

- Erlenmeyer tikvice volumena 300 mL ( $d = 8,7$  cm;  $h = 15,6$  cm;  $a = 59,4$  cm<sup>2</sup>).

b) Kompleksna podloga (čaj)

- Staklena posuda volumena 720 mL ( $d = 9$  cm;  $h = 12$  cm;  $a = 77,1$  cm<sup>2</sup>).

- Staklena posuda volumena 370 mL ( $d = 10$  cm;  $h = 6,5$  cm;  $a = 33,2$  cm<sup>2</sup>).

- Staklena posuda volumena 1000 mL ( $d = 10$  cm;  $h = 18$  cm;  $a = 113,1$  cm<sup>2</sup>).

3.2.11. Određivanje kapaciteta zadržavanja vode (*eng.* Water-Holding Capacity; WHC)

Kapacitet zadržavanja vode bakterijske nanoceluloze određivan je nakon 12 dana fermentacije. Biomasa *kombuche* je iz prevrelih podloga izvađena pomoću plastične pincete, protresena da se ukloni višak tekućine i nakon toga izvagana. Nakon vaganja, nanocelulozna biomasa je ostavljena da se pokrivena filter papirom suši na sobnoj temperaturi 48 h (uklanjanje slobodne vode), nakon čega je sušena 12 h pri 60 °C u suhom sterilizatoru, kako bi se u potpunosti uklonila vezana voda. Kapacitet zadržavanja vode (WHC) je izračunat prema formuli (Shezad i sur., 2010):

$WHC = (\text{masa vode uklonjena tijekom sušenja (g)}/\text{suha tvar bakterijske celuloze (g)})$

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

Za određivanje brzine otpuštanja vode iz novo sintetizirane bakterijske nanoceluloze, mase vlažnih uzoraka su mjerene kontinuiranim vaganjem u određenim vremenskim razmacima do konstantne mase. Tijekom pokusa, uzorci su bili pohranjeni na sobnoj temperaturi u Petrijevoj zdjelici, pokriveni filter papirom (Shezad i sur., 2010). Rezultati su prikazani grafički kao odnos mase otpuštene vode u određenom vremenskom razmaku.

### 3.2.13. FT-IR spektroskopija

Svi uzorci bakterijske nanoceluloze su sušeni u suhom sterilizatoru pri 60 °C u Petrijevim zdjelicama u tankom sloju, a nakon toga usitnjeni u tarioniku do praha. IR spektri čvrstih uzoraka snimljeni su u kalijevu bromidu na IR-spektrofotometru Bruker, ALPHA-Transmittance FTIR Spectrometre pri rezoluciji od 2 cm<sup>-1</sup> u rangu od 4000 do 400 cm<sup>-1</sup>.

### 3.2.14. Pretražna elektronska mikroskopija (*eng.* Scanning Electron Microscopy; SEM)

Pretražna elektronska mikroskopija (SEM) napravljena je na instrumentu Tescan Vega 3 Easyprobe s volframovom žarnom niti, pri ubrzavajućem naponu 5 kV. Uzorci su prethodno napareni vodljivim slojem zlata i paladija.

### 3.2.15. Određivanje kristaliničnosti bakterijske celuloze (jodni broj)

Određivanje jodnog broja se izvodi putem metode koja se temelji na određivanju količine apsorbiranog joda u amorfnim područjima celuloze. Ta se količina određuje indirektno, titracijom preostalog joda u otopini s 0,01M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

#### Postupak:

Uzorak nanocelulozne biomase (0,3 g) stavljen je u Erlenmeyer tikvicu od 300 mL sa šlifom i prelije s 2 mL otopine joda (5 g I<sub>2</sub> + 40 g KI + 50 mL H<sub>2</sub>O). Reakcija je trajala 3 minute i nakon toga je u reakcijsku smjesu dodano 100 mL zasićene Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sve promiješano i ostavljeno na tamnom mjestu 1-4 h, uz miješanje (magnetna miješalica). Nakon toga je



preostali jod određen titracijom s 0,01 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> uz škrob kao indikator (na 50 mL otopine za pipetiranje dodano je 50 mL demineralizirane vode i 1 mL škroba (0,5 %-tna otopina).

Slijepa proba (sve isto osim nanoceluloze).

Količina apsorbiranog joda je izračunata prema jednadžbi:

$$I \text{ broj} = \frac{(a-b) \cdot 2,04 \cdot 2,54}{m \cdot \left(1 - \frac{w}{100}\right)} (\text{mg I}_2/\text{g celuloze}) \quad (6)$$

gdje je:

a – volumen 0,01 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> utrošen za slijepu probu (mL)

b - volumen 0,01 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> utrošen za titraciju uzorka (mL)

m – masa uzorka (g)

w – udjel vlage (%)

Apsorpcija joda može poslužiti za određivanje indeksa kristaliničnosti jer se događa u amorfnim dijelovima molekule nanoceluloze. Inverzna vrijednost jodnog broja razmjerna je kristaliničnim dijelovima nanoceluloze i izražava se kao indeks kristaliničnosti prema jednadžbi koju su predložili Nelson i sur. (1970):

$$\text{Cr I} = 100 - (I \text{ broj} / 412 \cdot 100) (\%) \quad (7)$$

### 3.2.16. Određivanje antimikrobne aktivnosti *kombucha* bijelog čaja

Antimikrobna aktivnost inhibicije rasta odabranih test mikroorganizama, bakterija vrsta *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas sp.* i *Vibrio cholerea*, kao i kvasca *Candida albicans*, određivana je disk-difuzijskom metodom. Kao test mikroorganizmi korišteni su sojevi bakterijskih kultura iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu. Na površinu čvrste hranjive podloge u Petrijevoj zdjelici, na koju je prethodno naciepljen test-mikroorganizam, postavljeni su diskovi s određenim antimikrobnim agensom. Tijekom inkubacije spoj je difundirao radijalno iz diska u agar tvoreći gradijent koncentracije i ovisno o njegovim antimikrobnom djelovanju inhibirao rast mikroorganizma u okolini diska. Prozirna zona u kojoj nema vidljivog rasta naziva se zona inhibicije (ZI) i indikacija je osjetljivosti mikroorganizma prema mikroorganizmu s antimikrobnim djelovanjem.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Razvoj procesa za proizvodnju i primjenu biorazgradivih materijala jedan je od ciljeva zelene kemije i smatra se jednim od načina povećanja učinkovitosti konvencionalnih procesa, kako bi se očuvala sigurnost okoliša. Među tim biorazgradivim materijalima, bakterijska nanoceluloza (BNC) je vrlo lako dostupan ugljikohidratni polimer koji je pokazao potencijal za primjenu u različitim granama industrije (Panesar i sur., 2012; Wu i sur., 2013).

*Kombucha* je jedno od najpopularnijih fermentiranih tradicionalnih napitaka koji se konzumira zbog unaprjeđenja zdravlja. Potvrđeno je da se konzumacijom *kombuche* liječe ili umanjuju simptomi bolesti poput artritisa, loše probave, različitih tipova karcinoma, hepatotoksičnost i dr. (Sreeramulu i sur., 2000; Pauline i sur., 2001; Hiremath i sur., 2002). Fermentaciju *kombuche* provode simbiotski povezane vrste kvasaca i bakterija octene kiseline (Teoh i sur., 2004), koje je, kao starter kulture, proglasio sigurnima US Food and Drug Administration (CDC, 1996).

Celuloza je najzastupljeniji prirodni polisaharid i sastavni je dio većine biljnih materijala. No, komercijalno dostupna biljna celuloza je nečista zbog prisutnosti velikih količina lignina i hemiceluloze, koji se moraju uklanjati kemijskim putem kako bi se dobila čista celuloza. U usporedbi s biljnom celulozom, bakterijska nanoceluloza (BNC) može se sintetizirati ekstracelularno pomoću bakterija, kao što su *Gluconacetobacter xylinus* i *Sarcinia*. Istraživanjima je dokazano da BNC posjeduje nekoliko prednosti, kao što su: visoka čistoća i mehanička snaga u vlažnom stanju, visoki stupanj kristaliničnosti, biokompatibilnost, netoksičnost, vrlo veliku poroznost i hidrofilnost, ultrafinu mrežu vlakana, selektivnu permeabilnost i vrlo visok kapacitet zadržavanja vode a sve s istom kemijskom strukturom kao i biljna celuloza (Yoshinada i sur., 1997; Phisalaphong i Jatupaiboon, 2008; Pecoraro i sur., 2008). Ova svojstva čine BNC materijalom primjerenim za tehnološke primjene u bioenergiji, bioplastici, biomaterijalima, nanotehnologiji, razvoju lijekova, prehrani, kemiji, farmaciji, medicini i tekstilu (Chawla i sur., 2009; Shah i sur., 2013; Shi i sur., 2014). Uzimajući u obzir ove činjenice, nužno je provesti karakterizaciju bakterijske nanoceluloze (BNC) proizvedene s *kombuchom* za komercijalno korištenje i primjenu.

## 4.1. pH VRIJEDNOST, ORGANSKE KISELINE I ETANOL

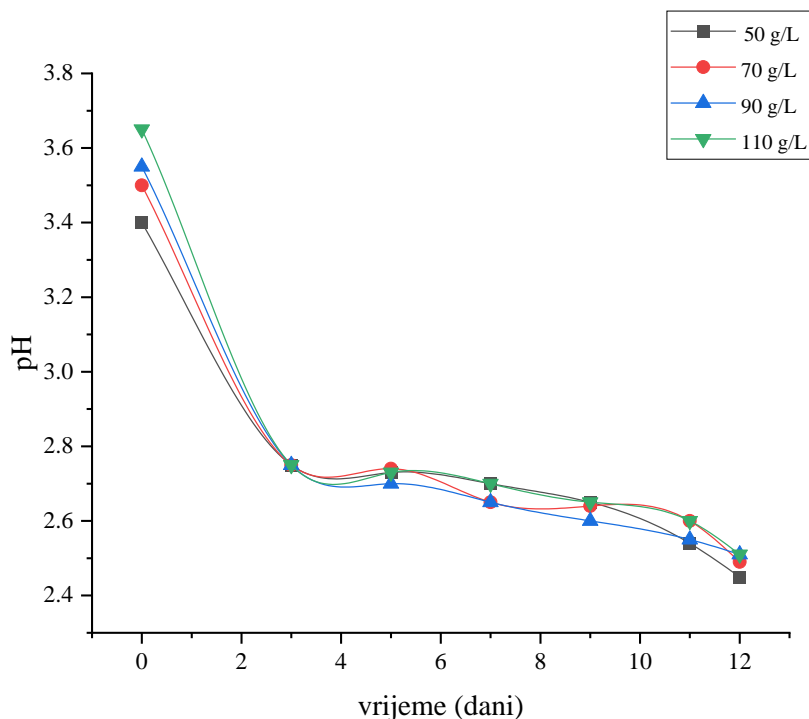
### 4.1.1. Kompleksna podloga – bijeli čaj

#### 4.1.1.1. pH vrijednost

Mjerenje pH vrijednosti je parametar kojim se kontrolira tijek fermentacije i koristi se za određivanje završetka procesa (Malbaša i sur., 2011). Nadalje, koncentracija vodikovih iona je faktor koji može aktivirati ili inhibirati rast i razmnožavanje pojedinih vrsta mikroorganizama u hrani. Bakterije octene kiseline podnose aktivnu kiselost okoliša u pH području od 3,6 do 6,3, a vrijednosti koje nisu niže od 5,4 pospješuju njihovo razmnožavanje. Optimalna pH vrijednost za kvasce ovisi o vrsti i soju, no prosječno se kreće u području od 4,5 do 6,5 (Antolak i Kręgiel, 2015). Tijekom analiziranog procesa fermentacije, pH u *kombucha* napitku smanjio se sa 3 na 2,6 jedinica. Takve niske pH vrijednosti mogu doprinijeti smanjenju opće senzoričke kakvoće čaja sve do nedopustive razine (Chu i Chen, 2006).

Početni pH nakon inokulacije je bio prosječno oko 3,6 (Slika 9) i bio je niži nego što su zabilježili Kallel i sur. (2012). U njihovom istraživanju na zaslađenom čaju, uočeno je smanjenje pH vrijednosti s 5,5 na 3,8 odmah nakon inokulacije *kombuche* u čaj. U istraživanju koje su proveli Cretović i sur. (2008), pH vrijednost zaslađenog čaja odmah nakon inokulacije bila je 4,7, no nakon trećeg dana fermentacije, koncentracije octene i limunske kiseline su počele rasti. Unatoč stalnom rastu koncentracije organskih kiselina tijekom fermentacije, autori nisu uočili značajnije promjene pH vrijednosti. To se može objasniti puferskim kapacitetom fermentiranog čaja (Cretović i sur., 2008).

Tijekom procesa fermentacije zaslađene infuzije čaja, disaharidi podliježu hidrolizi do monosaharida pod utjecajem enzima i kiselina. Uloga kvasaca tijekom fermentacije je da previru šećere do alkohola i CO<sub>2</sub>. Za razliku od kvasaca, bakterije octene kiseline nastanjuju celulozni dio *kombucha* starter kulture. One imaju vitalnu ulogu u procesu fermentacije zbog toga što su odgovorne za stvaranje novog sloja celulozne pelikule i metaboliziraju alkohol koji je kvasac proizveo, do organskih kiselina.

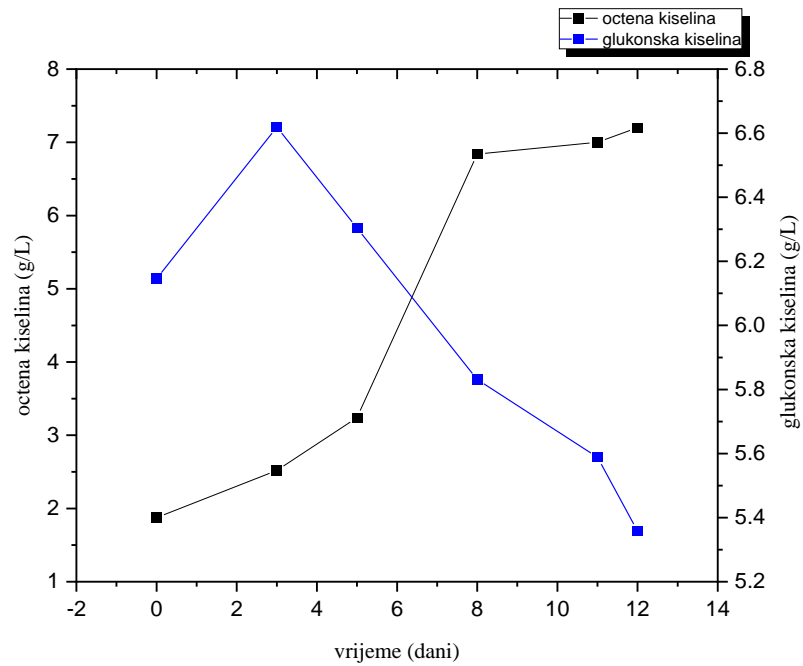


**Slika 9.** Promjena pH vrijednosti bijelog čaja tijekom 12 dana fermentacije s *kombuchom*

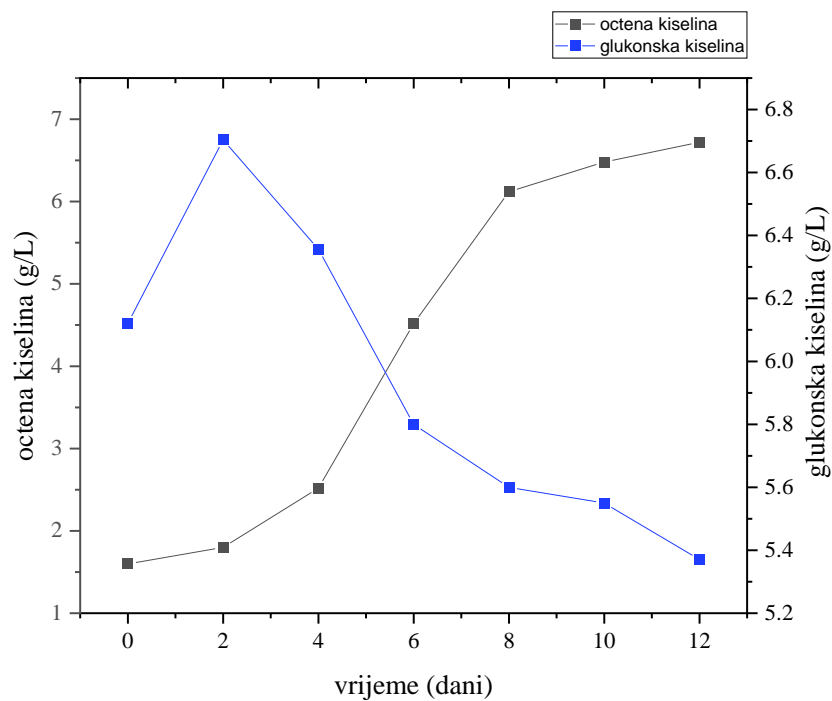
#### 4.1.1.2. Organske kiseline

Unatoč nastajanju organskih kiselina, temeljni metaboliti tijekom fermentacije *kombuche* su jednostavni šećeri, CO<sub>2</sub> i etanol (Chakravorty i sur., 2016). Prema Chen i Liu (2000), Lončar i sur. (2000), Malbaša i sur. (2002) i Jayabalan i sur. (2007), octena, glukuronska i glukonska kiselina su glavni zdravi proizvodi *kombucha* napitka koji se proizvodi iz zaslađenog čaja u kontroliranim i optimiranim uvjetima fermentacije. Nguyen i sur. (2015) smatraju da pravi izbor *kombucha* starter kulture omogućava proizvodnju napitka s najvećim udjelom zdravih organskih kiselina. Koncentracija sintetiziranih organskih kiselina, octene i glukonske, mijenjala se tijekom vremena trajanja fermentacije što je prikazano na Slikama 10-13. Glavna organska kiselina u fermentiranom bijelom čaju bila je octena kiselina, čija se koncentracija povećavala tijekom istraživanog vremena. Zabilježen je konstantni rast sve do 8. dana fermentacije (Slike 10 i 11), nakon čega se koncentracija nije značajnije mijenjala i bila je relativno niska, u području od 1,85 do 7,1 g/L (50 i 70 g/L dodane saharoze). Ove vrijednosti se mogu objasniti nedovoljnom količinom glukoze potrebne za sintezu octene kiseline. Dio glukoze je vjerojatno potrošen za sintezu celuloze tijekom fermentacije. Dobiveni rezultati su

u suglasju s rezultatima koje su objavili Kallel i sur. (2012) (5,4-8 g/L) nakon 14 dana fermentacije.

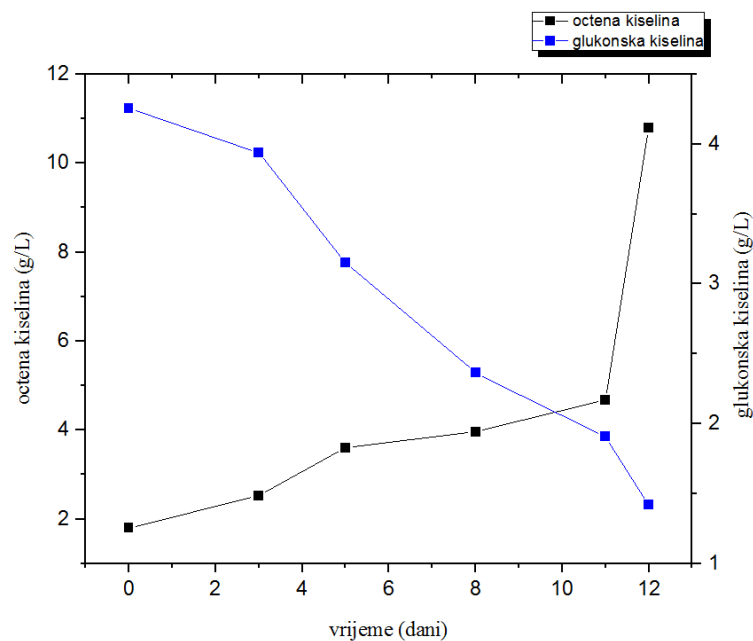


**Slika 10.** Kinetika nastajanja octene i glukonske kiseline tijekom 12 dana fermentacije *kombucha* bijelog čaja (50 g/L)



**Slika 11.** Kinetika nastajanja octene i glukonske kiseline tijekom 12 dana fermentacije *kombucha* bijelog čaja (70 g/L)

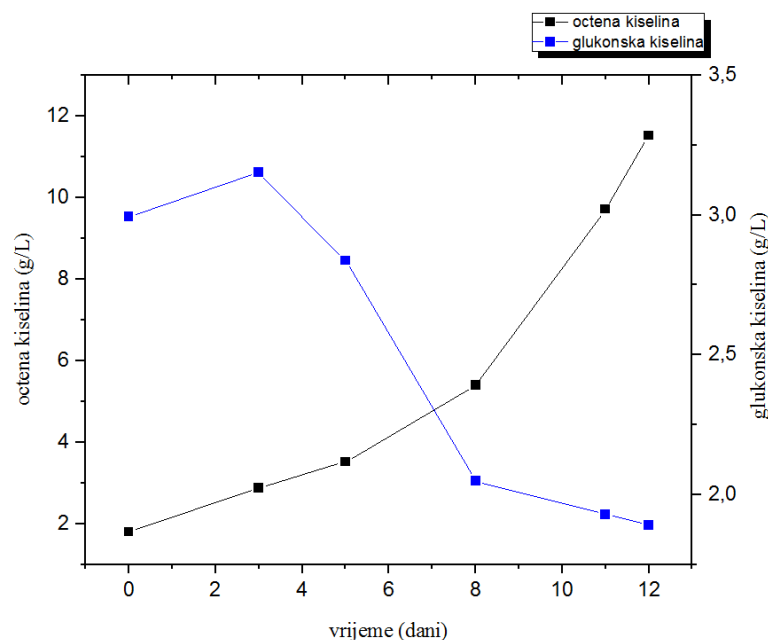
Pri koncentraciji od 90 g/L primijećen je blagi linearni rast koncentracije octene kiseline do 11. dana fermentacije (od 1,75 do 4,1 g/L), nakon čega je koncentracija naglo porasla do 11,1 g/L (Slika 12). Dodatkom 110 g/L šećera u infuziju bijelog čaja izmjerena je najveća koncentracija octene kiseline od 11,52 g/L u 12. danu fermentacije nakon linearnog rasta tijekom cijelog procesa (Slika 13). Uz sposobnost sinteze relativno visokih koncentracija octene kiseline, bakterije octene kiseline pokazuju i toleranciju na kiselost, koja je rijetka među aerobnim homotrofima i heterotrofima. Ovo im svojstvo omogućava rast na hranjivoj podlozi koja već na početku uzgoja ima pH vrijednost nižu od 4,5 (Malbaša i sur., 2008), a u ovom radu je početna koncentracija octene kiseline bila 1,8 jer je s bakterijskom celulozom uzgojenom u bijelom čaju dodan i majčinski fermentirani čaj koji je sadržavao octenu kiselinu.



**Slika 12.** Kinetika nastajanja octene i glukonske kiseline tijekom 12 dana fermentacije *kombucha* bijelog čaja (90 g/L)

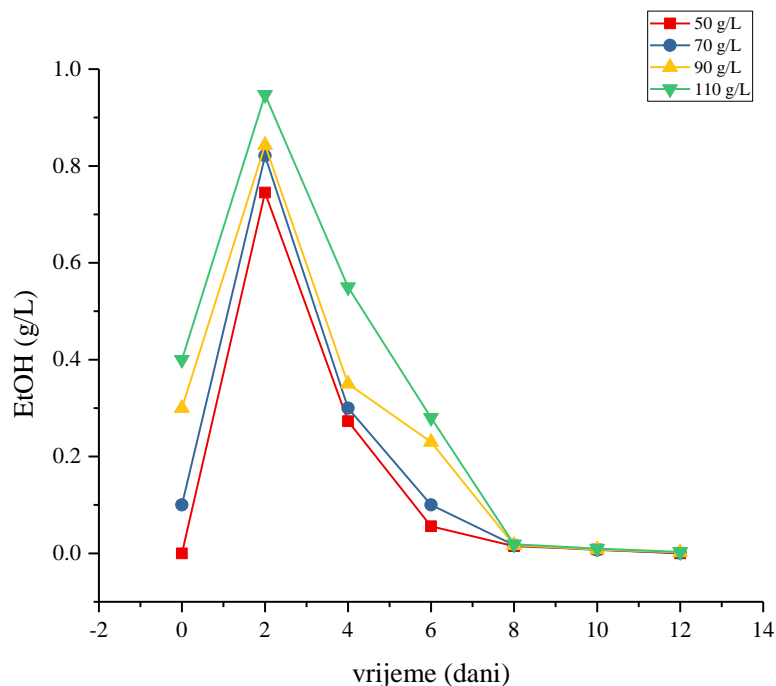
Bakterije octene kiseline glukozu oksidiraju do glukonske kiseline. Glukonska kiselina je druga glavna organska kiselina koja nastaje kao posljedica metabolizma *kombuche*. Kao što je vidljivo na Slikama 10-13, koncentracija glukonske kiseline tijekom fermentacije bijelog čaja linearno se smanjivala i bila je niža od koncentracije octene kiseline, no samo pri koncentraciji od 70 g/L je zabilježen linearni rast u početku fermentacije, od 3,45 g/L do 5,85 g/L u 4. danu istraživanja, da bi nakon toga opadala sve do 3,6 g/L (Slika 11). Kod koncentracije šećera od 90 g/L, uočen je linearni pad koncentracije glukonske kiseline do

kraja fermentacije bijelog čaja, što je u konačnici rezultiralo najnižom izmjerenom koncentracijom, koja je iznosila 1,4 g/L. I kod koncentracije od 110 g/L uočen je blagi rast koncentracije glukonske kiseline do 3. dana uzgoja (3,2 g/L), nakon čega je uslijedio pad vrijednosti sve do 1,95 g/L (8. dan fermentacije) i samo blago smanjenje koncentracije glukonske kiseline do kraja fermentacije (Slika 13).



**Slika 13.** Kinetika nastajanja octene i glukonske kiseline tijekom 12 dana fermentacije *kombucha* bijelog čaja (110 g/L)

Prema većini autora, koncentracija etanola u *kombucha* napitcima nije veća od 1% (vol/vol) (Teoh i sur., 2004). Sievers i sur. (1995) su nakon 10 dana fermentacije izmjerili 0,36 g/L EtOH, uz početnih 70 g/L sahara u hranjivoj podlozi. U ovom radu je u bijeli čaj dodano 50, 70, 90 i 110 g/L sahara (konzumni bijeli šećer) i već u 2.danu fermentacije, izmjerena je maksimalna koncentracija etanola, 0,95 g/L (110 g/ L šećera), koja se u 8. danu smanjila na 0,01 g/L, a nakon toga se nije mijenjala do kraja fermentacije (Slika 14). Pri drugim koncentracijama šećera uočen je ujednačen usporedni pad vrijednosti etanola od početnih vrijednosti 0,75 g/Lu 2. danu do 0,1 g/L u 8. danu, nakon čega su vrijednosti koncentracije EtOH pale na 0,005 g/L i u potpunosti se izjednačile s vrijednostima postignutim pri koncentraciji šećera od 110 g/L (Slika 14).



**Slika 14.** Kinetika nastajanja etanola tijekom 12 dana fermentacije *kombucha* bijelog čaja

#### 4.1.2. Kemijski definirane podloge

Proces biosinteze bakterijske nanoceluloze (BNC) je kompleksan i posljedica je mnogih čimbenika. Pojačano izlučivanje BNC može ovisiti o učinkovitom trošenju izvora ugljika. Bakterijske vrste koje sudjeluju u sintezi BNC imaju različite enzimske sustave i metaboličke putove, te izvore ugljika dodane u hranjive podloge koriste na različiti način za svoj rast i sintezu BNC s različitom učinkovitošću. Izvor ugljikaje ključni prekursor potreban za sintezu glukoze preko dva glavna metabolička puta: pentoza fosfatnog puta i Krebsovog ciklusa (Zhong i sur., 2013).

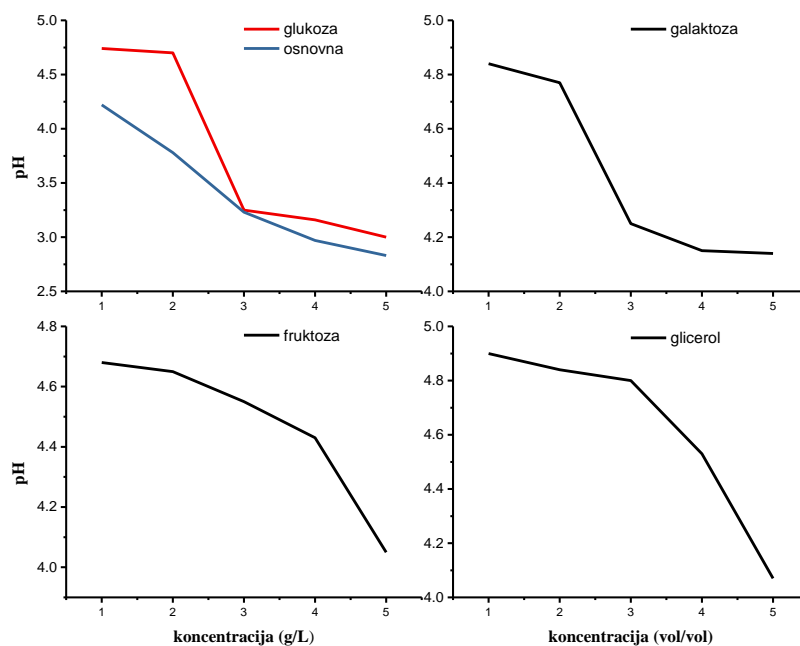
Glukoza se vrlo lako transportira kroz staničnu membranu i uvodi u put biosintezenanoceluloze. Glavnina te glukoze se konvertira u glukonsku kiselinu, pri čemu dolazi do smanjenja pH vrijednosti podloge, a posljedica toga je smanjenje sinteze BNC. Za razliku od glukoze, glicerol izaziva prebacivanje pentoza fosfatnog puta na Krebsov ciklus, pri čemu dolazi do daljnje sinteze BNC bez dodatnog nastajanja glukonske kiseline (Zhong i sur., 2013). Ovom se pojavom može objasniti povećana učinkovitost sinteze BNC i smanjenje fluktuacije pH vrijednosti kada se glicerol koristi kao glavni izvor ugljika, u usporedbi s glukozom. Jung i sur. (2010) su objavili da se u podlogama u kojima su glicerol i fruktoza



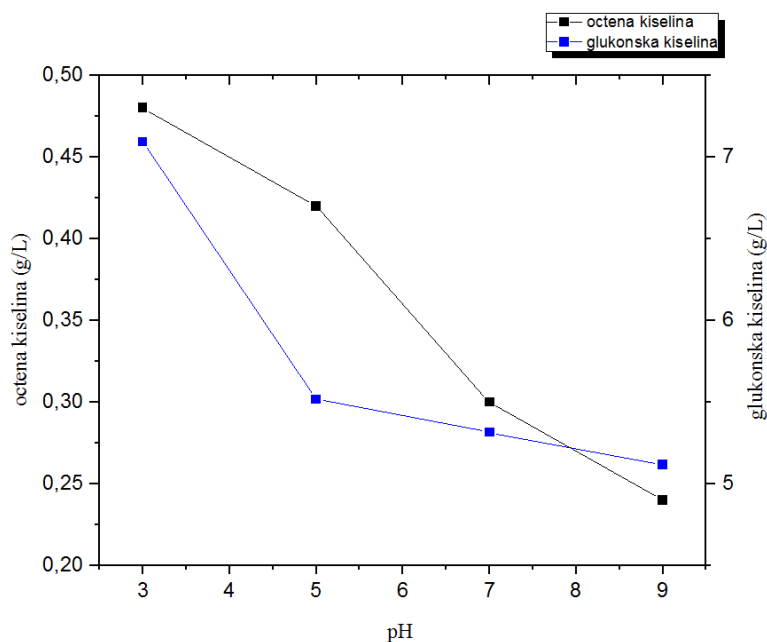
glavni izvori ugljika, kiseli sastojci hranjivih podloga troše putem Krebsovog ciklusa, čime dolazi do nakupljanja energije i poboljšanja rasta i razmnožavanja stanica mikroorganizama, kao i sinteze BNC (Jung i sur., 2010). Kao i glicerol, fruktoza putem pentoza fosfatnog puta i glukoneogeneze na jednostavan način nakuplja UDP-glukozu, potrebnu za sintezu BNC (Zhong i sur., 2013).

Promjena pH vrijednosti tijekom uzgoja *kombuche* u kompleksnim podlogama odvija se ovisno o koncentraciji nastalih organskih kiselina (Mikkelsen i sur., 2009). U ovom radu željelo se istražiti kako pH vrijednost hranjivih kemijski definiranih podloga može utjecati na nastajanje octene i glukonske kiseline (Slike 15 i 16). Istraživanjima je dokazano je da optimalna pH vrijednost za proizvodnju bakterijske celuloze ovisi o vrsti bakterija octene kiseline, no interval u kojem se te vrijednosti kreću je između 4 i 7, a prema Son i sur. (2001), najbolji rezultati su dobiveni pri pH 6,5. U ovom radu se pH vrijednost 5,0 pokazala najboljom za uzgoj i proizvodnju bakterijske nanoceluloze (Slika 16). Iz slike je vidljivo da su podjednaki rezultati postignuti pri pH 3 i pH 7, dakle i pri kiselom i neutralnom pH okruženju, bakterijska je celuloza sintetizirana podjednako. No, pri 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). 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.

Na Slici 16 je vidljivo da je najveća koncentracija octene kiseline (0,47 g/L) izmjerena pri niskoj pH vrijednost podloge (pH 3,0), jedva zamjetno manja koncentracija (0,43 g/L) dobivena je fermentacijom pri pH 5, a nakon toga je linearno padala sve do 0,24 g/L pri pH 9. Koncentracija glukonske kiseline pri pH 3 je također najviša (7,1 g/L), no već kod pH 5 je određena najniža koncentracija od 5,36 g/L, dok je pri pH 9 izmjerena koncentracija glukonske kiseline bila 5,1 g/L (Slika 16).



**Slika 15.** Promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije *kombuche* u kemijski definiranim podlogama



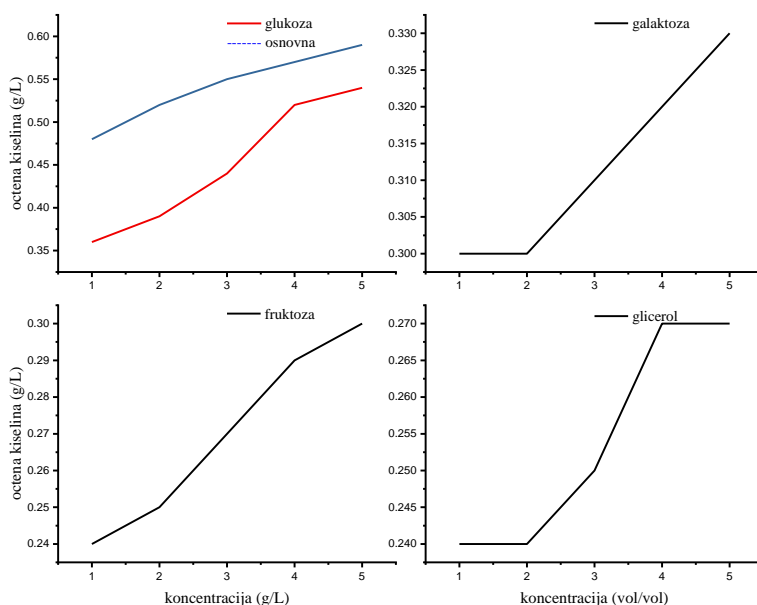
**Slika 16.** Utjecaj pH vrijednosti kemijski definirane HS osnovne podloge (20 g/L glukoze) na nastajanje octene i glukonske kiseline

Kada se saharoza koristi kao jedini izvor ugljika, rast bakterija i prinos BNC je ograničena u usporedbi s drugim dodanim izvorima ugljika . Saharozu je disaharid i zahtijeva više enzima i

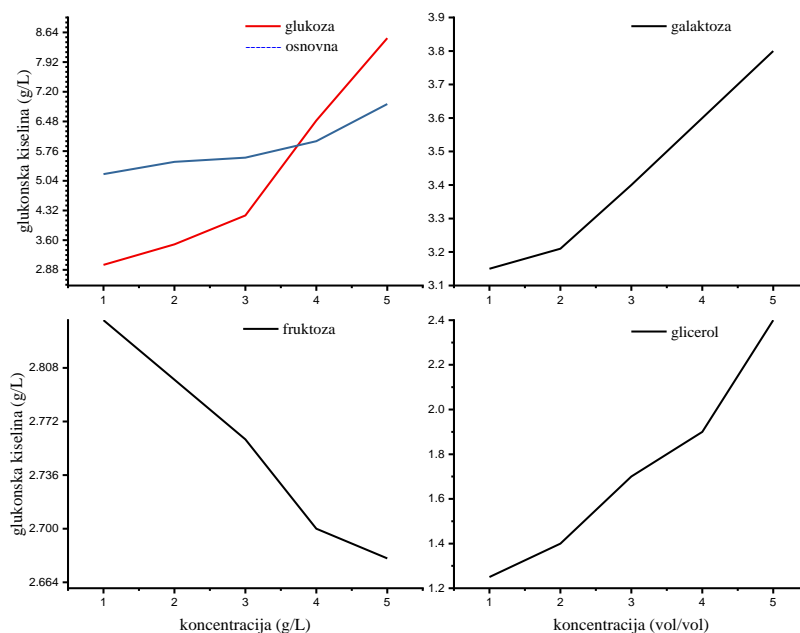
više kompleksnih procesa da se potroši, pa se time dobiva manje mikrofibriila, što može biti objašnjenje za manje osušenu BNC s većom poroznošću, a samim time i većim udjelom vode u sintetiziranoj BNC.

Za razliku od podloge sa saharozom, glicerol se može koristiti preko dva metabolička puta, pospješuje rast bakterija i rezultira gušćom (čvršćom) retikuliranom strukturom sa smanjenom poroznošću. Ovi su rezultati u suglasju s provedenim istraživanjima (Jung i sur., 2010; Jonas i Farah, 1998; Tang i sur., 2010). Al-Shamary i sur. (2013) su objavili da kad je saharoza jedini izvor ugljika, poroznost BNC pelikule postiže 80 %, dok je kod glukoze, fruktoze i glicerola bila manja (70 %, 66 % i 65 %).

Kako bi se osigurali optimalni uvjeti za rast bakterije *G. xylinus*, provedeni su pokusi s različitim izvorima ugljika: glukozom, galaktozom, fruktozom i glicerolom, dodanim u osnovnu HS podlogu u različitim koncentracijama (Slike 17-18). Ovime se željelo aklimatizirati inokulum simbiotičke kulture bakterija i kvasaca iz majčinske kulture kombuche u modificiranim HS podlogama, kako bi se minimalizirao metabolički šok mikroorganizama da su naglo izloženi različitim izvorima ugljika (osim glukoze u HS podlozi) tijekom scale-up faze eksperimenta.



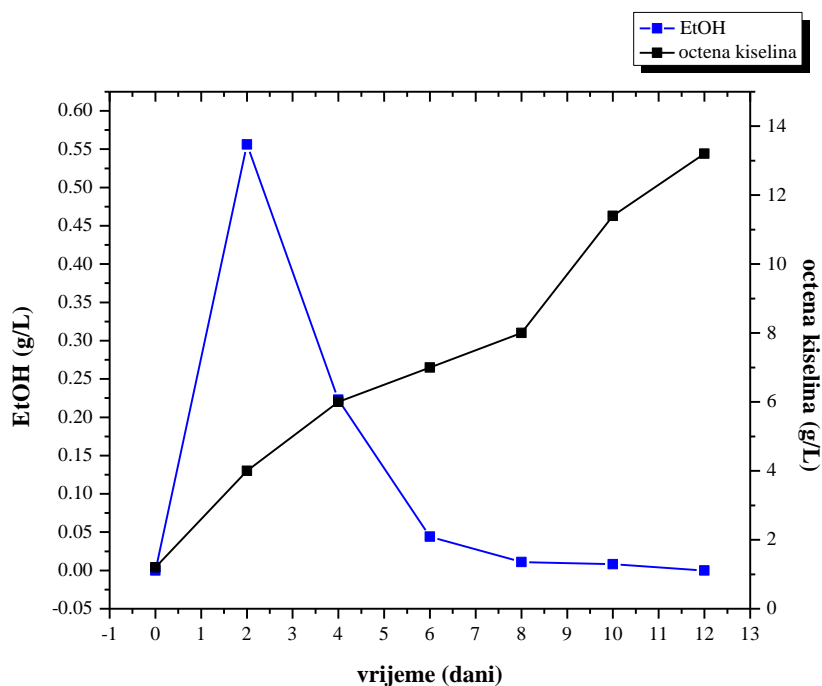
**Slika 17.** Utjecaj koncentracije izvora ugljika u kemijski definiranim podlogama na nastajanje octene kiseline



**Slika 18.** Utjecaj koncentracije izvora ugljika u kemijski definiranim podlogama na nastajanje glukonske kiseline

Budući da cijena izvora ugljika ima glavnu ulogu u procjeni isplativosti industrijske proizvodnje BNC, jeftiniji izvori ugljika, kao što je glicerol koji se dobiva kao sporedni proizvod pri proizvodnji biodizela, mogu biti obećavajući i lako dostupni izvori ugljika za industrijsku proizvodnju BNC. Proizvodnjom biodizela iz životinjskih masti i biljnih ulja dobiva se oko 10 % (tež/vol) glicerola kao glavnog sporednog proizvoda koji može izazvati brojne okolišne probleme (Paulo da Silva i sur., 2009), dok biokonverzija glicerola do visokovrijednih proizvoda, kao što je BNC, može biti financijski isplativa i ekološki prihvatljiva.

Reiss (1994) je ispitivao utjecaje različitih izvora ugljika (saharoza, laktoza, glucoza i fruktoza) na metabolizam *kombuche*, te uočio da koncentracija proizvedenog etanola ovisi o vrsti i količini dodanog šećera.

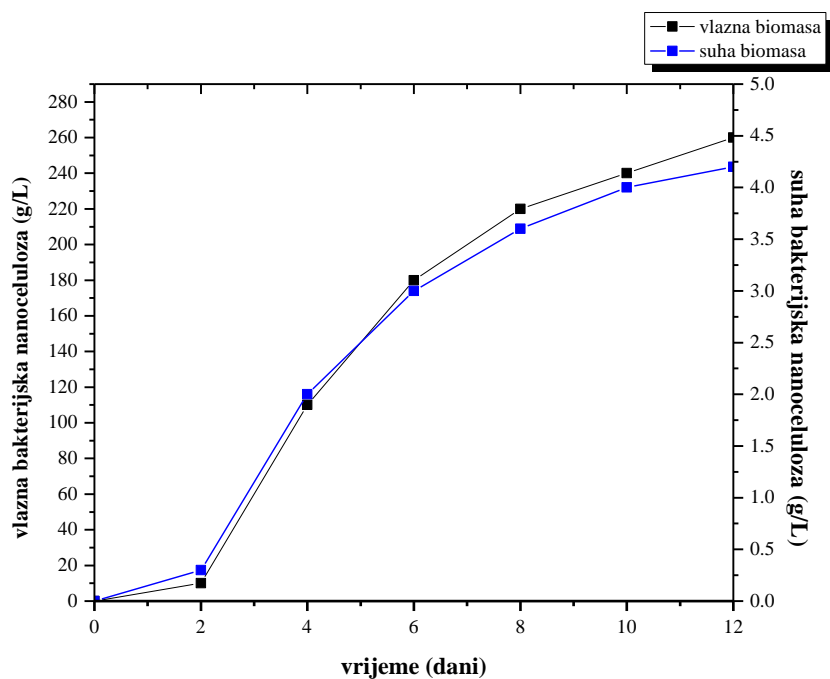


**Slika 19.** Kinetika nastajanja etanola i biooksidacije do octene kiseline fermentacijom bijelog čaja s kombuchom

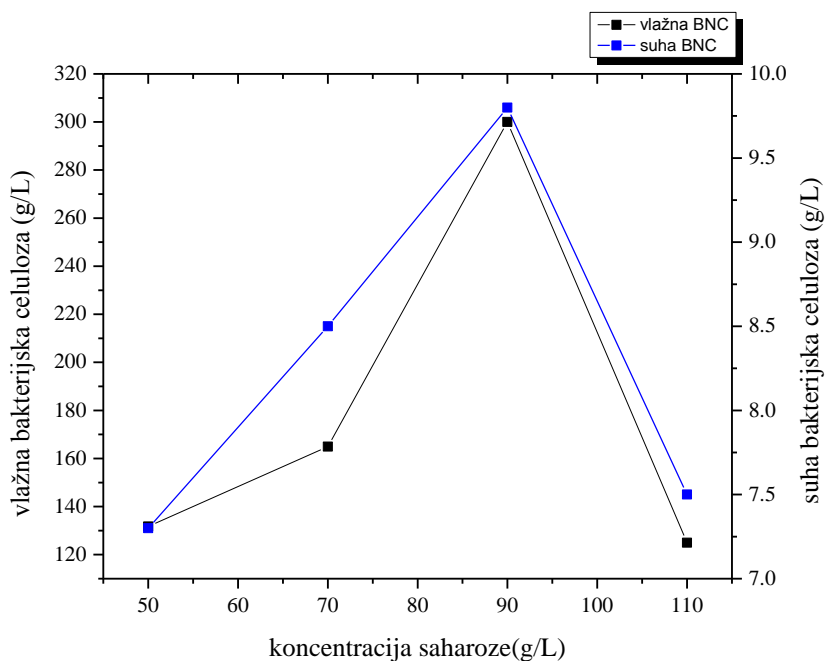
#### 4.2. SINTEZA BAKTERIJSKE NANOCELULOZE (BNC)

Biotransformacijom zaslađenog bijelog čaja tijekom fermentacije nastala je celulozna pelikula koja se u tankom sloju oblikovala na površini tekućine. 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 (Sievers i sur., 1995; Malbaša i sur., 2008). Na Slici 20. 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 (90 g/L) je izvrsni supstrat jer je nakon 12 dana fermentacije izmjereno 260 g/L vlažne bakterijske celuloze, odnosno 4,5 g/L suhe bakterijske biomase (Slika 20).

Maksimalni udjel vlage u biomasi je uočen kada je u hranjivu podlogu dodana saharoza kao izvor ugljika (Slika 21). Suprotno očekivanjima, dok je maksimum masa BNC pelikule postignuta u podlozi s glukozom i fruktozom, ta je BNC imala manji udjel vlage nego BNC sintetizirane u drugim podlogama, pri čemu se može zaključiti da je ta pelikula imala manju poroznost (Slika 22).

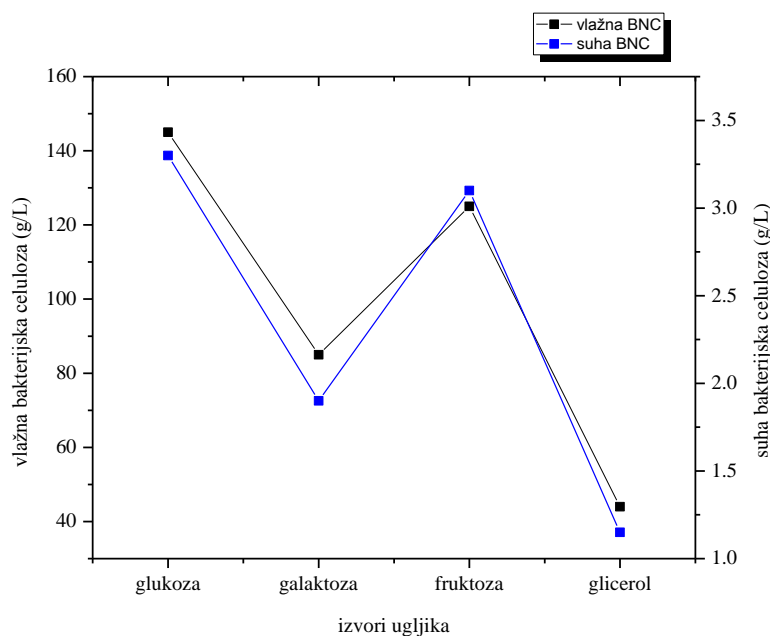


**Slika 20.** Utjecaj trajanja fermentacije na sintezu BNC u bijelom čaju (90 g/L saharoze)



**Slika 21.** Odnos vlažne i suhe BNC sintetizirane nakon 12 dana fermentacije bijelog čaja s različitim koncentracijama saharoze

Posljednjih dva desetljeća intenzivno su proučavani sastavi hranjivih podloga u kojima se postižu maksimalni prinosi bakterijske celuloze pomoću različitih sojeva bakterije *G. xylinus* (*A. xylinum*). Ta su se istraživanja većinom odnosila na izvore ugljika, koji mogu biti monosaharidi, disaharidi, oligosaharidi, alkoholi, šećerni alkoholi i organske kiseline (Keshk i Sameshima, 2006). Prinos bakterijske celuloze rezultat je sposobnosti bakterija octene kiseline da apsorbiraju glukozu iz različitih supstrata s ugljikom, nakon čega polimeriziraju glukozu do celuloze. Bakterije octene kiseline posjeduju dva glavna operativna amfibolička puta: pentoza fosfatni put za oksidaciju ugljikohidrata i Krebsov ciklus za oksidaciju organskih kiselina i sličnih spojeva (Ross i sur., 1991). Na Slici 22 prikazani su rezultati prinosa bakterijske celuloze ovisno o izvorima ugljika u hranjivim podlogama. Prema dobivenim rezultatima, glukoza se pokazala najboljim izvorom ugljika jer je izmjeren i najveći prinos vlažne biomase (142 g/L). Nakon glukoze, u podlozi s fruktozom je zabilježen prinos od 130 g/L, dok su galaktoza (82 g/L) i glicerol sa samo 45 g/L imali daleko manje prinose bakterijske celuloze. Zbog toga je vrlo važno u začetku odrediti potencijalnu primjenu BNC, a promjene i primjene optimirati izborom izvora ugljika. Razlike u masi se mogu objasniti različitim strukturama BNC, sintetiziranim u različitim hranjivim podlogama (izvor ugljika). Udjel vlage (% tež/tež) i sintetiziranoj BNC bio je 90-97,6 % (Slika 22).



**Slika 22.** Utjecaj različitih izvora ugljika u kemijski definiranim podlogama u koncentracijama: glukoza, galaktoza i fruktoza (25 g/L), glicerol (3 % vol/vol) na nastajanje BNC

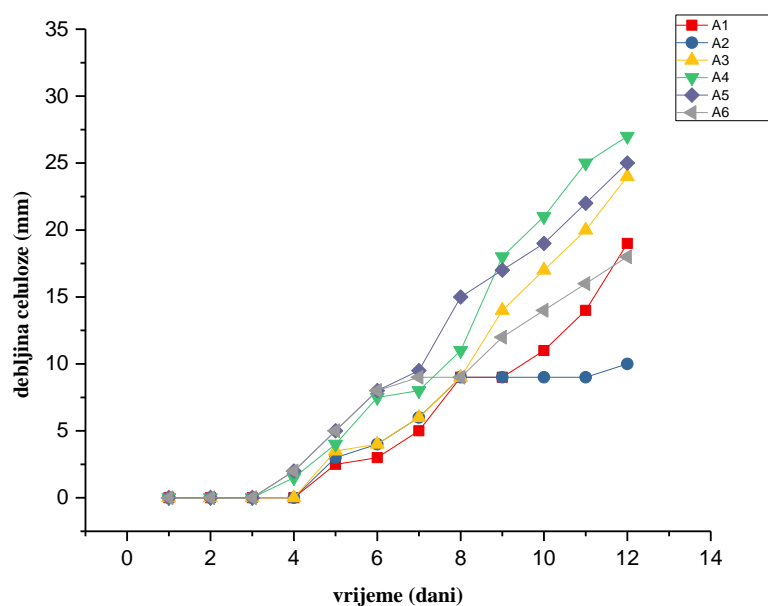
### 4.3. UTJECAJ POVRŠINE I DUBINE HRANJIVE PODLOGE NA PROIZVODNJU BAKTERIJSKE NANOCELULOZE (BNC)

Za sintezu BNC nisu samo važni sastav podloge, pH i temperatura fermentacije kao parametri koji utječu na prinos biopolimera. Čimbenici poput oblika bioreaktora, površine, volumena hranjive podloge za statični uzgoj, te intenzitet miješanja ili trešnje kod protrešenog uzgoja jednako su važni. Ruka i sur. (2012) su proveli istraživanje s *G. xylinus* ATCC 53524 uzgojenog na 5 različitih hranjivih podloga s različitim izvorima ugljika (glukoza, fruktoza, saharoza, manitol i glicerol). Uočili su da je u kemijski definiranoj podlozi koju su predložili Son i sur. (2001) postignut veći prinos BNC s glukozom i glicerolom, nego što je to postignuto u HS podlozi. Daljnji pokusi pokazali su da odgovarajući odnos površine hranjive podloge i volumena (računajući na dubinu tekuće podloge ispod BNC membrane) je također vrlo važan parametar za uspješnu proizvodnju nanoceluloze. Rezultati istraživanja koja su provedena u ovom radu (Tablica 3) u suglasju su s rezultatima Ruka i sur. (2012), koji su pokazali da je za proizvodnju BNC optimalni odnos površine/volumena 0,7. Nadalje, niti masa inokuluma niti kisik ne utječu na prinos BNC (Ruka i sur., 2012).

**Tablica 3.** Utjecaj površine posude i dubine hranjive podloge na sintezu bakterijske nanoceluloze nakon 12 dana fermentacije bijelog čaja

Posuda	Volumen (mL) V	Konc. (g/L) c	Promjer (cm) d	Dubina (cm) h	Površina (cm <sup>2</sup> ) a	Odnos a/h	Debljina bakterijske nanoceluloze (mm)
A1	720	50	9	12	77,10	6,425	24
A2	370	50	10	6,5	33,18	5,105	8
A3	1000	50	10	8	78,54	9,817	28
A4	1000	70	10	8	78,54	9,817	31
A5	1000	90	10	8	78,54	9,817	30
A6	1000	110	10	8	78,54	9,817	21





**Slika 23.** Kinetika sinteze bakterijske celuloze u bijelom čaju u posudama različitih dubina, volumena i koncentracija šećera

#### 4.4. KAPACITET ZADRŽAVANJA I KINETIKA OTPUŠTANJA VODE (ENG. WHC I WRR)

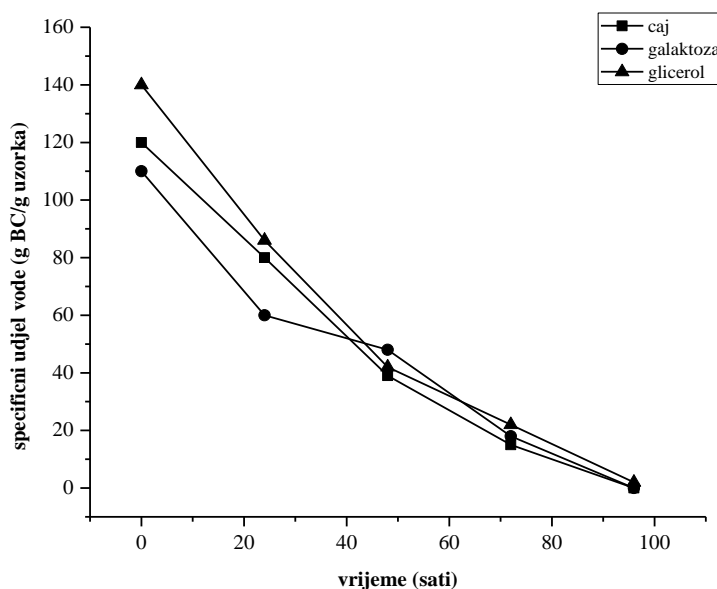
Promjene u fizikalnoj strukturi bakterijske nanoceluloze rezultiraju i promjenama u fizikalnim svojstvima. Kapacitet zadržavanja vode (WHC) i brzina otpuštanja vode (WRR) su najvažnija svojstva bakterijske nanoceluloze jer su izravno odgovorni za njenu biomedicinsku primjenu kao pokrovnog materijala na ranama. Zadovoljavajući udjel vlage u takvom pokrovnom materijalu ubrzava zacjeljivanje rana i štiti od mogućih kontaminacija (Ul-Islam i sur. (2012). Također, omogućava ulazak aktivnih supstancija u ranu, čime je omogućeno lakše i bezbolnije prekrivanje oštećenog područja kože bez oštećenja na novonastaloj koži (Shezad i sur., 2010).

U ovom su radu provedeni testovi kojima su mjereni WHS i WHR kapaciteti sintetizirane bakterijske nanoceluloze uzgojene u bijelom čaju. U Tablici 4 prikazani su rezultati mjerenja kapaciteta zadržavanja vode u uzorcima bakterijskih nanoceluloza dobivenih uzgojem u staklenim posudama različitih promjera.

**Tablica 4.** Kapacitet zadržavanja vode u bakterijskoj nanocelulozi (BNC) ovisno o specifičnoj površini posuda u kojima je proveden uzgoj

Uzorak	Masa vlažne BC (g)	Specifična površina BC (cm <sup>2</sup> /g)	WHC (g vode/ g uzorka)
tegla	150	1,79	109,63
teglica	120	1,35	91,84
tegla	200	1,68	100,36

Sposobnost otpuštanja vode izrazito je važno svojstvo BNC za biomedicinsku primjenu kao pokrovnog materijala na ranama. Na Slici 24 je prikazana kinetika otpuštanja vode iz uzoraka sintetiziranih u bijelom čaju tijekom 96 sati pokusa. Iz Slike je vidljivo da je izmjereni specifični udjel vode u početku bio najveći u uzorku s kemijski definiranom podlogom uz dodatak glicerola (5 % vol/vol), slijedio je bijeli čaj s 90 g/L saharoze, a najmanja vrijednost je izmjerena u uzorcima s 5 % (tež/vol) galaktoze. Apsorbirana voda je za 6 dana iz uzoraka potpuno evaporirala (ishlapila), dok je u uzorku BNC iz podloge s 110 g/L ostalo 2 % vode vezane u matriksu pelikule.



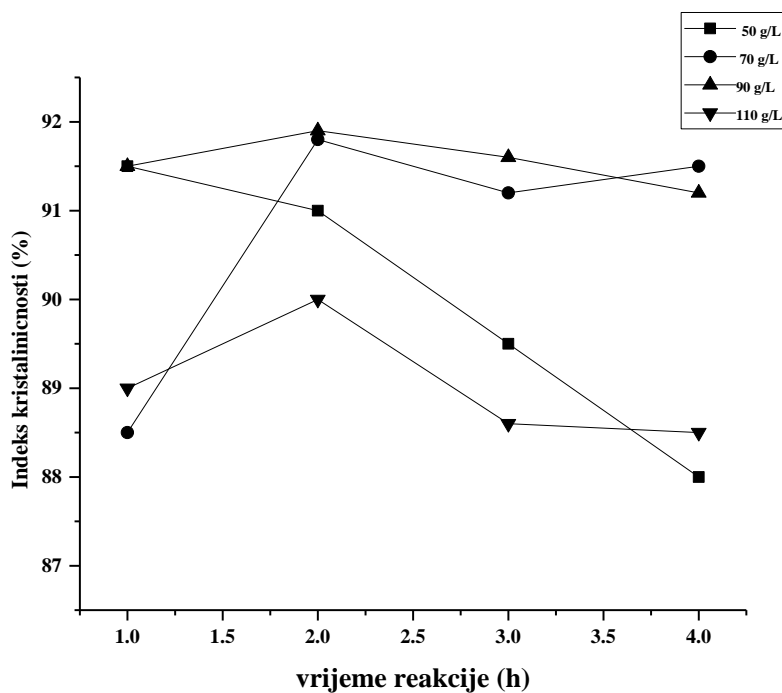
**Slika 24.** Kinetika otpuštanja vode (WRR) tijekom 96 sati iz uzoraka BNC nakon 12 dana fermentacije u bijelom čaju (kompleksna podloga) i u kemijski definiranoj podlozi s dodatkom 5 % (tež/vol) galaktoze i 5 % (vol/vol) glicerola

#### 4.5. KRISTALINIČNOST I MORFOLOGIJA POVRŠINE BAKTERIJSKE NANOCELULOZE (BNC)

Dobro je znano da je BNC koju izlučuje *G. xylinus* strukturno građena od dvije kristalinične faze, celuloze  $I_\alpha$  i  $I_\beta$  ( $I_\alpha/I_\beta = 65/35$ ) (Son i sur., 2003).

Kristalinična struktura je jedno od najvažnijih svojstava bakterijske celuloze koja posjeduje bolja mehanička i međufazna svojstva od biljne celuloze. Ta je struktura sastavljena od  $I_\alpha$  i  $I_\beta$  tipova celuloze, pri čemu udjel bilo kojeg tipa varira ovisno o uvjetima uzgoja, različitosti hranjivih podloga, obliku i veličini posude ili reaktora u kojima se provodi uzgoj, pH vrijednosti hranjive podloge, a posebice o rodu, vrsti ili soju bakterija octene kiseline.

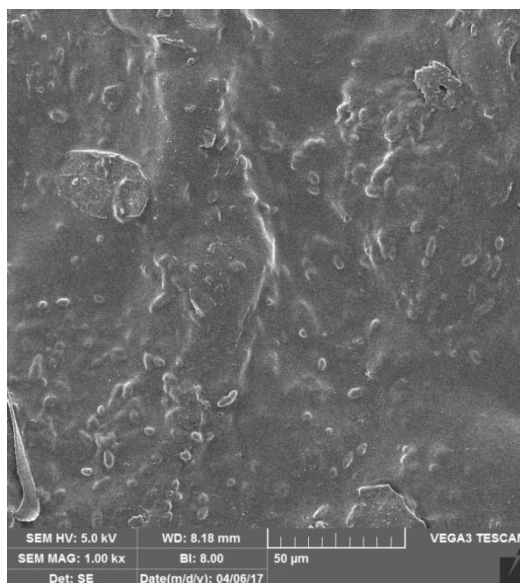
Test s jodnim brojem se općenito koristi kao osnovna empirijska metoda za mjerenje pristupačnosti amorfnih dijelova celuloze prema vodenim otopinama. S obzirom da se jod inkorporira u amorfne dijelove molekule nanoceluloze, inverzna vrijednost jodnog broja je razmjerna kristalnim dijelovima celuloze i izražava se kao indeks kristaliničnosti (Kreze i sur., 2005). Indeks kristaliničnosti bakterijske celuloze uzgojene u bijelom čaju prikazan je na Slici 25. Dobiveni rezultati pokazuju da kristaliničnost bakterijske celuloze varira ovisno o koncentraciji dodane saharoze u podlogu.



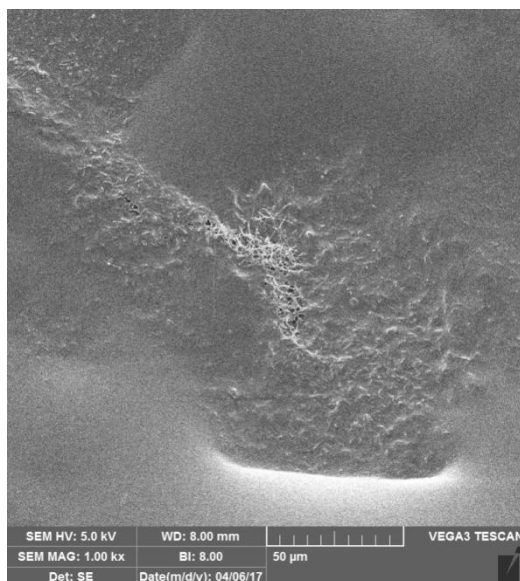
**Slika 25.** Kristaliničnost uzgojenih BNC u bijelom čaju

#### 4.6. PRETRAŽNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (eng. SEM)

Površina i struktura mikrovlakana bakterijske nanoceluloze (BNC) snimane su pretražnim elektronskim mikroskopom (Slike 26 i 27). Na Slici 26 vidljive stanice bakterija i kvasaca na površini pelikule bakterijske celuloze, a na Slici 27 isprepletenost mikrovlakana sintetizirane nanoceluloze.



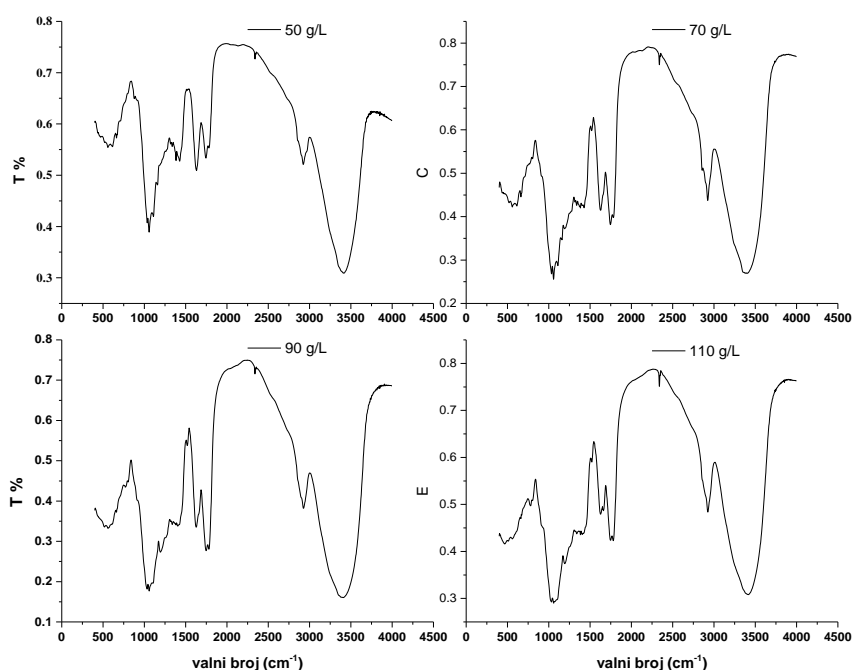
**Slika 26.** SEM snimka površine bakterijske nanoceluloze (BNC) nakon 12 dana uzgoja u bijelom čaju(koncentracija saharoze 90 g/L)



**Slika 27.** SEM snimka mreže mikrovlakana bakterijske nanoceluloze (BNC nakon 12 dana uzgoja u bijelom čaju(koncentracija saharoze 90 g/L).

## 4.7. FT-IR SPEKTROSKOPSKA ANALIZA

Jedna od najvažnijih analitičkih tehnika za karakterizaciju polimera je infracrvena spektroskopija (IR). Glavna prednost ove tehnike je mogućnost testiranja uzoraka u bilo kojem obliku (tekućine, paste, otopine, filmovi, prahovi, vlakna). IR spektroskopija je tehnika koja se temelji na vibracijama atoma u molekuli. Infracrveni spektar se dobiva prolaskom infracrvenih zraka kroz uzorak i određivanjem frakcije koja je apsorbirana pri određenoj energiji. Energija pri kojoj se očitava pojedini pik u apsorpcijskom spektru, odgovara frekvenciji vibracija dijela molekule uzorka. FT-IR analiza omogućava istraživačima dodatne informacije o super-molekularnoj strukturi i može se, također, koristiti za određivanje kemijskog sastava prirodnih i modificiranih vlakana. C-O-C vibracije pojavljuju se na valnim duljinama blizu  $1600$  i  $900\text{ cm}^{-1}$ , O-H na  $3500$  do  $3300\text{ cm}^{-1}$ , a C-H vibracije se pojavljuju između  $1430$  i  $1290\text{ cm}^{-1}$ . Na Slici 28 prikazani su spektri karakteristični za celulozu sintetiziranu pri različitim koncentracijama dodanog šećera, s izraženim pikovima kod  $3400$ ,  $2880$  i  $1110\text{ cm}^{-1}$ . Ovi su pikovi rezultat vibracija O-H, C-H i C-O-C grupa u celuloznoj strukturi, što ukazuje na pretežito kristaličnu strukturu BNC i u skladu je s istraživanjima koje su proveli Chen i sur. (2010).



**Slika 28.** FT-IR spektri BNC sintetizirane u bijelom čaju s različitim koncentracijama dodanog šećera

#### 4.8. ANTIMIKROBNO DJELOVANJE *KOMBUCHA* BIJELOG ČAJA

Bijeli čaj dobiven nakon fermentacije *kombuche*, pokazao je antimikrobna svojstva koja se smatraju rezultatom prisutnosti polifenola u čaju. Stupanj ove aktivnosti ovisi o vrstama bakterija i strukturi polifenola. Antimikrobna nefermentiranog čaja (bijeli čaj) je značajno veća od aktivnosti postignute s polufermentiranim (zeleni čaj) ili fermentiranim čajem (crni čaj). Nadalje, najveća antimikrobna aktivnost je zabilježena u uzorcima s najvećom koncentracijom polifenola (Pawar, 2018).

U ovom radu je antimikrobna aktivnost fermentiranog bijelog čaja s *kombuchom* ispitivana na pet testnih mikroorganizma; bakterije vrsta *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp. i *Vibrio cholerae*, te kvascem *C. albicans*. Rezultati prikazani u Tablici 5 ukazali su na izvrsno antimikrobno djelovanje na bakteriju *E. coli* i vrlo dobro djelovanje na *S. typhimurium* i *Pseudomonas* sp., dok su u prisutnosti *V. cholerae* uočene zamućene zone inhibicije bez jasnih granica. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je dvostruko veća antimikrobna aktivnost postignuta prema istraživanim bakterijama, nego prema kvascu *C. albicans*. Također je uočeno da je fermentirani bijeli čaj, pripremljen uz dodatak 50 g/L saharoze imao najveće antimikrobno djelovanje jer je djelovao i na kvasac *C. albicans* (Tablica 5).

**Tablica 5.** Antimikrobna aktivnost fermentiranog *kombucha* bijelog čaja s različitim koncentracijama konzumnog bijelog šećera

Koncentracija saharoze (g/L)	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>C. albicans</i>
	Zone inhibicije (cm)				
50	2,2	2,3	0*	2,5	1,4
70	1,7	2,0	0*	1,6	1,3
90	1,5	1,8	0*	2,4	1,1
110	2,4	2,3	0*	2,7	-

0\* - blago zamućenje, bez zona inhibicije

## 5. ZAKLJUČCI

1. *Kombucha* je nutritivno vrijedni napitak vrlo složenog sastava, a glavni proizvodi koji nastaju kao posljedica biotransformacije su organske kiseline i mali udjel etanola, te bakterijska nanoceluloza (BNC), koja se u obliku tanke opne oblikuje na površini napitka.
2. Uzgoj *kombuche* proveden je u kompleksnoj podlozi s dodatkom 50, 70, 90 i 110 g/L saharoze kao jedinim izvorom ugljika (bijeli čaj) i kemijski definiranim podlogama s različitim koncentracijama izvora ugljika: glukozi, galaktozi, fruktozi (1-5 % tež/vol) i glicerolu (1-5 % vol/vol).
3. U svim je uzorcima pad pH vrijednosti i koncentracije etanola bio u korelaciji s povećanjem koncentracije octene i glukonske kiseline.
4. Površina posude za uzgoj i dubina hranjive podloge značajno utječe na prinos bakterijske nanoceluloze (BNC). Optimalni uvjeti za fermentacija su u plitkim posudama sa širokim grlom, zbog što boljeg pristupa kisika bakterijama octene kiseline, koje su odgovorne za sintezu bakterijske nanoceluloze.
5. Sposobnost bakterijske nanoceluloze da apsorbira ili otpusti velike količine vode izričito je ovisna o strukturnim značajkama, posebice o specifičnoj površini i ukupnom volumenu same pelikule nanoceluloze, te poroznosti strukture.
6. FT-IR spektroskopskom analizom je dokazana pretežito kristalinična struktura bakterijske nanoceluloze uzgojene u bijelom čaju pri svim koncentracijama dodanog šećera.
7. Antimikrobna aktivnost ispitivana je mjerenjem zona inhibicije rasta bakterija *S. typhimurium*, *E.coli*, *V. cholerae* i *Pseudomonas* sp., te kvasca *C. albicans*. Fermentirani bijeli čaj je pokazao izvrsnu antimikrobnu aktivnost prema tri bakterijske kulture, kao i na kulturu kvasca *C. albicans*, no nije pokazao inhibicijsko djelovanje na bakteriju *V. cholerae*.

## 6. LITERATURA

Al-Shamary, E. E., Al-Darwash, A. K. (2013) Influence of fermentation condition and alkali treatment on the porosity and thickness of bacterial cellulose membranes. *Outline J. Sci. Technol.* **3**, 194-203.

Antolak, H., Kręgiel, D. (2015) Acetic acid bacteria – taxonomy, ecology, and industrial application. *Zywnosc Nauka Technologia Jakosc*, **4**, 21–35.

Bielecki, S., Kalinowska, H., Krystynowicz, A. (2013) Wound Dressings and Cosmetic Materials from Bacterial Nanocellulose U: Bacterial Nanocellulose: A sophisticated multifunctional material (Gama, M., Gatenholm, P., Klemm, D., ured), CRC Press, Boca Raton, str. 157–174.

Bielecki, S., Krystynowicz, A., Turkiewicz, M., Kalinowska, H. (2002) Bacterial Cellulose U: Biopolymers: Polysaccharides I. (Einbuchel, A., ured.), Wiley-VCH, Verlag GmbH, Munster, Germany, str. 37-90 .

Campano, C., Balea, A., Blanco, A., Negro, C. (2016) Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review. *Cellulose* **23**, 57-91.

CDC (1996) CDC Editorial Note. *J. Amer. Med. Assoc.* **275**, 97-98.

Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakravorty, W., Bhattacharya, D., Gachhui, R. (2016) Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *Int. J. Food Microbiol.* **220**, 63–72.

Chambionnat, M. (1952) Contribution à l'étude du champignon japonais. *Bull. Soc. Hist. Nat. Maroc.* **22**, 3-8.

Chawla, P. R., Bajaj, I. B., Survase, S. A., Singhal, R. S. (2009) Microbial Cellulose. Fermentative Production and Applications. *Food Technol. Biotechnol.* **47**, 107-112.



Chen, C., Liu, B. Y. (2000) Changes in major components of tea fungus metanolites during prolonged fermentation. *J. Appl. Microbiol.* **89**, 834-839.

Chen, P., Cho, S. Y., Jin, H. J. (2010) Modification and applications of bacterial celluloses in polymer science. *Macromol. Res.* **18**, 309–320.

Chu, S, Chen, C. (2006) Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of Kombucha. *Food Chem.* **98**, 502–507.

Cretović, D., Markov, S., Djurić, M., Savić, D., Velićanski., A. (2008) Specific interfacial area as a key variable in scaling-up Kombucha fermentation. *J. Food Eng.* **85**, 387–392.

Clark, R., Comfort, S.F., Evans, J.M., Shanahan, C.M., Zadnis, D.A. (1997) Food Products Containing Bacterial Cellulose, PCT/US1997/009, 834.

Coton, M., Pawtowski, A., Taminau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloume-Labarthe, L., Fall A., Daube G., Coton, E. (2017) Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* **93**, 1-15.

de Oliveira Barud, H.G., da Silva, R.R., da Silva Barud, H., Tercjak, A., Gutierrez, J., Lustri, W.R., de Oliveira, O.B., Ribeiro, S.J.L. (2016) A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose. *Carbohydr. Polym.* **153**, 406-420.

Dikin, D., Kohlhaas, K., Dommett, G., Stankovich, S., Ruoff, R. (2006) Scanning electron microscopy methods for analysis of polymer nanocomposites. *Micros. Microanal.* **12**, 674-675.

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

Dussap, C. G., Poughon, L. (2017) Microbiology of Alcoholic Fermentation. U: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering (Pandey, A., Angeles Sanroman, M., Du, G., Soccol, C.R., Dussap, C.G., red.), Elsevier, Amsterdam, str. 263–279.

El-Salam, S. S. A. (2012) 16S rRNA gene sequence detection of acetic acid bacteria isolated from tea Kombucha. *N. Y. Sci. J.* **5**, 55-61.

Greenwalt, C. J., Steinkraus, K. H., Ledford, R. A. (2000) Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects. *J. Food. Protect.* **63**, 976-981.

Grubb, D.T., Sawyer, L.C. (1996) *Polymer Microscopy*, drugo izd., Chapman and Hall, London.

Hestrin, S., Schramm, M. (1954) Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochem. J.* **58**, 345-352.

Hiremath, U. S., Vaidehi, M. P., Mushtari, B. J., (2002) Effect of fermented tea on the blood sugar levels of NIDDM subjects. *Ind. Praction.* **55**, 423-425.

Hong, F., Yang, G. (2013) High-Dietary-Fiber Biscuit Containing Bacterial Cellulose and Preparation Method Thereof, CN 101919431 A.

Islam, M. U., Ullah, M. W., Khan, S., Shah, N., Park, J. K. (2017): Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose. *Int. J. Biol. Macromol.* **102**, 1166-1173.

Jayabalan, R., Marimuthu, S., Swaminathan, K. (2007). Changes in content of organics acids and tea polyphenols during Kombucha tea fermentation. *Food Chem.* **102**, 392–398.

Jayabalan, R., Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., Sathishkumar, M. (2014) A review on kombuchatea—microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive Rev. Food Sci. Food Saf.* **13**, 538-550.

Jonas, R., Farah, L.F. (1998) Production and application of microbial cellulose. *Polym. Degrad. Stabil.* **59**, 101-106.

Jung, H. I., Jeong, J. H., Lee, O. M., Park, G. T., Kim, K. K., Park, H. C., Lee, S. M., Kim, Y. G., Son, H. J. (2010) Influence of glycerol on production and structural-physical properties of cellulose from *Acetobacter* sp. V6 cultured in shake flasks. *Bioresour. Technol.* **101**, 3602-3608.

Kallel, L., Desseaux, V., Hamdi, M., Stocker, P., Ajandouz, E. (2012) Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. *Food Res. Int.* **49**, 226–232.

Kappel, T., Anken, R. H. (1993) The tea-mushroom. *Mycologist* **7**, 12-13.

Kerstens, K., Lisdiyanti, P., Komagata, K., Swings, J. (2006) The family Acetobacteraceae: the genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, and *Kozakia*. U: The Prokaryotes, (Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E., ured.), Springer, New York, str, 163-200.

Keshk, S., Sameshima, K. (2006) Influence of lignosulfonate on crystal structure and productivity of bacterial cellulose in a static culture, *Enzyme Microb. Tech.* **40**, 4-8.

Khan, T., Park, J.K., Kwon, J.H. (2007) Functional biopolymers produced by biochemical technology considering applications in food engineering. *Korean J. Chem. Eng.* **24**, 816.

Komagata K., Iino T., Yamada Y. (2014) The Family *Acetobacteraceae*. U: The Prokaryotes, (Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F., ured.), Springer, Berlin/Heidelberg, str. 3-78.

Kreze, T., Jeler, S., Strnad, S. (2005) Correlation between structure characteristics and adsorption properties of regenerated cellulose fibers. *Materials Res. Innovat.* **5**, 277-283.

Lapuz, M. M., Gallardo, E. G., Palo, M. A. (1967) The nata organism: cultural requirements, characteristics and identity. *Philipp. J. Sci.* **96**, 91-111.

Lavefve, L., Marasini, D., Carbonero, F. (2019) Microbial Ecology of Fermented Vegetables and Non-Alcoholic Drinks and Current Knowledge on Their Impact on Human Health. *Adv. Food Nutr. Res.* **87**, 147.

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 Microbiol.* **13**, 407-415.

Lončar, E.S., Petrović, S.E., Malbaša, R.V., & Verac, R.M. (2000). Biosynthesis of glucuronic acid by means of tea fungus. *Die Nahrung* **44**, 138–139.

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.

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

Malbaša, R.V., Lončar, E. S., Kolarov, L.J. A. (2002) Sucrose and inulin balance during tea fungus fermentation. *Roum. Biotechnol. Lett.* **7**, 573–576.

Marques, W. L., Raghavendran, V., Stambuk, B. U., Gombert, A. K. (2016) Sucrose and *Saccharomyces cerevisiae*: a relationship most sweet. *FEMS Yeast Res.* **16**,1-16.

Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P., Cotter, P. D. (2014) Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiol.* **38**, 171-178.

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 ATTC 53524. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 576-583.

Nelson, M.L., Rousselle, M.A., Cangemi, S.J., Trouard, P. (1970) The Iodine Sorption Test, Factors Affecting Reproducibility and a Semi-micro Adaptation, *Textile Res. J.* **40**, 870-880.

Ng, C. C., Shyu, Y. T. (2004) Development and production of cholesterol-lowering Monascus-nata complex. *World J. Microb. Biot.* **20**, 875-879.

Nguyen, K.N., Nguyen, P.B., Nguyen, H.T., Le, P.H. (2015) Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic bacteria strain from traditional Kombucha for high-level production of glucuronic acid. *LWT – Food Sci. Technol.* **64**, 1149–1155.

Nixon, W.C., Huxley H. E., Klug A. (1971) The general principles of scanning electron microscopy. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **261**, 45–50.

Okiyama, A., Motoki, M., Yamanka, S. M. (1993) Bacterial cellulose III. Development of a new form of cellulose. *Food Hydrocoll.* **6**, 493-501.

Okiyama, A., Shirae, H., Kano, H., Yamanaka, S. (1992) Bacterial cellulose. Two-stage fermentation process for cellulose production by *Acetobacter aceti*. *Food Hydrocoll.* **6**, 471-477.

Panesar, P. S., Chavan, Y., Chopra, H. K., Kennedy, J. F. (2012) Production of microbial cellulose. Response surface methodology approach. *Carbohydr.Polym.* **87(1)**, 930-935.

Pauline, T., Dipti, P., Anju, B., Kavimani, S., Sharma, S. K., Kain, A. K., Sarada, S. K. S., Sairam, M., Ilavazhagan, G., Kumar, D., Selvamurthy, W. (2001) Studies on toxicity; anti-stress and hepatoprotective properties of Kombucha tea. *Biomed. Environ. Sci.* **14**, 207-213.

Paulo da Silva, G., Mack, M., Contiero, A. (2009) A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotech. Adv.* **27(1)**, 30-39.

Pawar, H. A. (2018) White tea a day keeps disease away: A review. *Curr. Trends Biomedical. Eng. Biosci.* **15(5)**, 555-560.

Pecoraro, E., Manzani, D., Messaddeq, Y., Ribeiro, S. J. L. (2008). Monomers, polymers and composites from renewable resources. Bacterial Cellulose from *Glucanacetobacter xylinus*. Preparation, Properties and Applications. Elsevier, Amsterdam, str. 369-383.

Phisalaphong, M., Jatupaiboon, N. (2008) Biosynthesis and characterization of bacteria cellulose-chitosan film. *Carbohydr. Polym.* **74**, 482-488.

Ray, R. C., Joshi, V.K. (2014) *Fermented Foods: Past, Present and Future*. U: Microorganisms and fermentation of traditional foods, (Ray, R.C., Didier, M., ured.), CRC Press, Boca Raton, SAD, str. 1-36.

Reid, N. (1974) U: *Practical Methods in Electron Microscopy*, (Glauert, A., ured.), North Holland Publishing Company, Amsterdam, str. 217–347.

Reiss, J. (1994) Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Z. Lebensm. Unters. For.*, **198**, 258–261.

Ross, P., Mayer. R., Benziman, M. (1991) Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol. Rev.* **55**, 35-58.

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

Sabu, T., Visakh, A. P., Mathew, A. P. (2012) U: *Advances in natural polymers, composites and nanocomposites*. Springer Scienceand Business Media, USA.

Sengun, I. Y., Karabiyikli, S. (2011) Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control* **22**, 647-656.

Shezad, O., Khan, S., Khan, T., Park, J. K. (2010) Physicochemical and mechanical characterization of bacterial cellulose produced with an excellent productivity in static conditions using a simplefed-batch cultivation strategy. *Carbohydr. Polym.* **82**, 173–180.

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. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**, 590-594.

Shah, N., Ul-Islam, M., Khattak, W.A., Park, J. K. (2013) Overview of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material. *Carbohydr.Polym.* **98(2)**, 1585-1581.

Shi, Z., Zhang, Y., Phillips, G. O., Yang, G. (2014) Utilization of bacterial cellulose in food. *Food Hydrocoll.* **35**, 539-544.

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*. *Biotech. Appl. Biochem.* **33**, 1-5.

Son, Y. W., Han, S., Ihm, J. (2003) Electronic structure and the field emission mechanism of MgO-coated carbon nanotubes. *New J. Phys.* **5**, 152.

Sreeramulu, G., Zhu, Y., Knol, W. (2000) Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2589-2594.

Tang, W. H., Jia, S. R., Jia, Y. Y., Yang, H. J. (2010) The influence of fermentation conditions and post-treatment methods on porosity of bacterial cellulose membrane. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 125-131.

Teoh, A. L., Heard, G., Cox, J. (2004) Yeast ecology of Kombucha fermentation. *Int. J. Food Microb.* **95**, 119-126.

Torres, F. G., Troncoso, O.P., Torres, C., Grande, C.J. (2013) Cellulose Based Blends, Composites and Nanocomposites U: Advances in natural polymers, Composites and Nanocomposites (Sabu, T., Visakh, P.M., Mathew, A.P., ured.), Springer Science & Business Media, USA, str. 21-54.

Ullah, M. W., Ul-Islam, M., Khan, S., Kim, Y., Park, J. K. (2016) Structural and physico-mechanical characterization of bio-cellulose produced by a cell-free system. *Carbohydr. Polym.* **136**, 908–916.

- Velasco-Bedran, H., Lopez-Isunza, F. (2007) The unified metabolism of *Gluconacetobacter entanii* in continuous and batch processes. *Process Biochem.* **42**, 1180-1190.
- Vidra, A., Németh, Á. (2018) Bio-produced Acetic Acid: A Review. *Period. Polytech. Chem.* **62**, 245-256.
- Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J. P., Taillandier, P. (2018) Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *J. Food. Sci.* **83**, 580-588.
- Walker, G. (1998) *Yeast - Physiology and Biotechnology*. John Wiley & Sons, New York.
- Watanabe, K., Tabuchi, M., Morinaga, Y., Yoshinaga, F. (1998) Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. *Cellulose* **5**, 187–200.
- Wu, Z. Y., Li, C., Liang, H. W., Chen, J. F., Yu, S. H. (2013) Ultralight, flexible, and fire-resistant carbon nanofiber aerogels from bacterial cellulose. *Angew. Chem. Int. Edit.* **52**, 2925-2931.
- Yoshinada, F., Tonouchi, N., Watanabe, K. (1997) Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its application as a new industrial material. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 219-224.
- Zhong, C., Zhang, G. C., Liu, M., Zheng, X. T., Han, P.P., Jia, S. R. (2013) Metabolic flux analysis of *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 6189-6199.
- Zhou, T., Chen, D., Jiu, J., Nge, T. T., Sugahara, T., Nagao, S., Koga, H., Nogi, M., Suganuma, K., Wang, X., Liu, X., Cheng, P., Wang, T., Xiong, D. (2013) Electrically conductive bacterial cellulose composite membranes produced by the incorporation of graphite nanoplatelets in pristine bacterial cellulose membranes. *Express Polym. Lett.* **7**, 756-766.
- Zottner, G. (1952) Note de bactériologie à propos du champignon japonais. *Bull. Soc. Hist. Nat. Maroc.* **33**, 9-11.



## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

*Trava Kralić*

Ime i prezime studenta