

# Biotransformacija i antimikrobna aktivnost kombucha napitaka od aronije, kadulje i lista masline

---

Krizmanić, Tena

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

*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:159:886739>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-02**



*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija

**TENA KRIZMANIĆ**  
6626/BT

**BIOTRANSFORMACIJA I ANTIMIKROBNA AKTIVNOST  
*KOMBUCHA* NAPITAKA OD ARONIJE, KADULJE I LISTA  
MASLINE**

ZAVRŠNI RAD

Modul: Biotehnologija 2  
Mentor: Izv. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

Zagreb, 2016.

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

## DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo,  
Industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva

### BIOTRANSFORMACIJA I ANTIMIKROBNA AKTIVNOST *KOMBUCHA* NAPITAKA OD ARONIJE, KADULJE I LISTA MASLINE

Tena Krizmanić, 6626/BT

**Sažetak:** *Kombucha* je tradicionalni osvježavajući napitak koji se pripravlja fermentacijom čaja, uz dodatak šećera i simbiotički združene kulture bakterija octene kiseline i kvasaca. Ovaj se napitak stoljećima intenzivno konzumira diljem cijelog svijeta zbog svojih profilaktičkih i terapijskih svojstava. U ovom su radu pripremljene infuzije čaja aronije, kadulje i lista masline (40 g/L), zaslađene sa 70 g/L saharoze, te fermentirane pomoću *kombuche* tijekom 18 dana pri 25 °C. Uočeno je da su promjene pH vrijednosti bile povezane s simbiotskim metaboličkim aktivnostima kvasaca i bakterija octene kiseline. Debljina i prinos bakterijske celuloze povećala se tijekom fermentacije. Uočena je antimikrobna aktivnost *kombuche* na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije (*Streptococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Salmonella faecalis*), no ne i na kvasac *Candida albicans*.

**Ključne riječi:** fermentirani čaj, *kombucha*, antimikrobna aktivnost

**Rad sadrži:** 33 stranice, 14 slika, 3 tablice, 49 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Rad predan:** rujan, 2016.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

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

### BIOTRANSFORMATION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *KOMBUCHA* BEVERAGE PRODUCED WITH ARONIA, SAGE AND OLIVE LEAF

Tena Krizmanić, 6626/BT

**Abstract:** *Kombucha* is a traditional refreshing beverage obtained by the fermentation of sugared tea with a powerful symbiosis of acetic bacteria and yeasts. This drink has been intensively consumed during a long time worldwide for its prophylactic and therapeutic properties. In this present study, the tea broths produced with aronia, sage and olive leaf (40 g/L) were fermented naturally at 25 °C with *kombucha* over a period of up to 18 days in the presence of 70 g/L sucrose. Changes in pH were related to the symbiotic metabolic activities of yeasts and acetic acid bacteria. The thickness and yield of bacterial cellulose increased with fermentation time. Antimicrobial activities was observed in the fermented samples against the tested Gram-positive and Gram-negative organisms (*Streptococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella faecalis*), but *Candida albicans* was not inhibited by *kombucha*.

**Keywords:** *Fermented tea, Kombucha, Antimicrobial activity*

**Thesis contains:** 33 pages, 14 figures, 3 tables, 49 references

**Original in:** Croatian

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

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

**Final work delivered:** September, 2016

## SADRŽAJ

|                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. UVOD.....</b>                                                         | <b>1</b>  |
| <b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>                                               | <b>3</b>  |
| 2.1. Čaj – kemijski sastav i antimikrobno djelovanje .....                  | 3         |
| 2.2. <i>Kombucha</i> : priprava i fermentacija.....                         | 4         |
| 2.3. <i>Kombucha</i> : mikrobiološki sastav .....                           | 5         |
| 2.4. <i>Kombucha</i> i zdravlje .....                                       | 5         |
| 2.5. Antimikrobno djelovanje <i>kombuche</i> .....                          | 6         |
| 2.6. Bakterijska celuloza .....                                             | 7         |
| 2.7. Biosinteza bakterijske celuloze .....                                  | 7         |
| <b>3. MATERIJALI I METODE RADA.....</b>                                     | <b>11</b> |
| 3.1. Tijek istraživanja.....                                                | 11        |
| 3.2. Materijali i metode rada .....                                         | 12        |
| 3.2.1. Priprava kulture <i>kombuche</i> .....                               | 12        |
| 3.2.2. Uporabljene vrste čaja.....                                          | 12        |
| 3.2.3. Priprava fermentiranih čajeva .....                                  | 12        |
| 3.2.4. Određivanje pH vrijednosti .....                                     | 12        |
| 3.2.5. Određivanje koncentracije octene kiseline.....                       | 13        |
| 3.2.6. Određivanje koncentracije glukonske kiseline.....                    | 13        |
| 3.2.7. Određivanje alkohola kemijskom metodom .....                         | 13        |
| 3.2.8. Antimikrobna aktivnost <i>kombucha</i> čaja.....                     | 15        |
| 3.2.9. Izračunavanje mase i prinosa celulozne biomase <i>kombuche</i> ..... | 15        |
| <b>4. REZULTATI.....</b>                                                    | <b>16</b> |
| <b>5. RASPRAVA.....</b>                                                     | <b>25</b> |
| <b>6. ZAKLJUČCI.....</b>                                                    | <b>28</b> |
| <b>7. LITERATURNI NAVODI.....</b>                                           | <b>29</b> |

## **1. UVOD**

*Kombucha* je u Hrvatskoj još uvijek ne prepoznati napitak kojem se pristupa s „blagim ili potpunim nepovjerenjem“. Ovaj napitak se konzumira u mnogim državama stoljećima, no interes za njega raste zbog mnogih znanstvenih studija koje ukazuju na to kako utječe na poboljšanje zdravlja i sprječavanje kroničnih bolesti. Čaj su prvi put iz Kine u Europu donijeli portugalski i nizozemski istraživači kao medicinsku biljku (Hollman i sur., 1996). Tijekom godina, ispijanje čaja je postalo uobičajena životna navika kao i ispijanje kave ili bezalkoholnih pića, no nije se na pravi način ukazivalo na prednosti konzumiranja čaja. Sve duža životna dob i djelomična ograničenja moderne medicine doveli su do toga da su ljudi počeli tražiti nove načine kako bi poboljšali svoje zdravlje. Rezultati istraživanja ukazuju na to da čaj sadrži približno 4000 bioaktivnih supstancija, od kojih jednu trećinu čine polifenoli (Dufresne i Farnworth, 2000).

Kad proučavamo razvoj civilizacije i ulogu hrane i narodne medicine u ljudskom životu, često možemo uočiti da su mnoga pića i hrana korišteni zbog njihovih tobožnjih pozitivnih učinaka na zdravlje. Najstariji znani lijek je čaj. U Kini je čaj konzumiran prije 5000. godina zbog njegovih stimulirajućih i detoksifikacijskih svojstava u eliminaciji alkohola i toksina da bi poboljšao protok krvi i urina, ublažio bolove u zglobovima te poboljšao imunitet (Balentine i sur., 1997). Važnost čaja strmovito je rasla i do danas je ispijanje čaja postalo sastavni dio mnogih, diljem svijeta uvriježenih društvenih rituala, tako da je čaj postao drugo najpopularnije piće na svijetu, uz vodu (Yang i Wang, 1993).

*Kombucha* je napitak koji se dobiva fermentacijom zaslađenog čaja pomoću simbiotski združene kulture bakterija octene kiseline i kvasaca. Glavni metaboliti ove fermentacije su monosaharidi, nekoliko organskih kiselina, vitamini i veliki broj drugih supstancija koje su rezultat brojnih kemijskih reakcija (Balentine i sur., 1997). Posebno su važne organske kiseline, uglavnom octena i glukonska koje nastaju u većim koncentracijama, te glukuronska, mliječna i limunska, čije koncentracije ne prelaze 1 g/L (Jayabalan i sur., 2007), jer predstavljaju aktivne sastojke fermentiranog čaja i mogu imati blagotvoran utjecaj na ljudsko zdravlje (Greenwalt i sur., 1998; Jayabalan i sur., 2007). Usporedno s proizvodnjom organskih kiselina i etanola, na površini tekuće faze se stvara tanka celulozna opna, odnosno bakterijska celuloza koja s trajanjem fermentacije sve više dobiva na volumenu.



U ovom radu su tijekom fermentacije čajeva od aronije, kadulje i lista masline s *kombuchom* praćeni sljedeći parametri:

- utjecaj vrste čaja na brzinu fermentacije
- promjene pH vrijednosti, koncentracije etanola, octene i glukonske kiseline
- prinos bakterijske celuloze *kombuche* na kraju procesa fermentacije
- antimikrobna aktivnost *kombucha* čajeva.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. Čaj – kemijski sastav i antimikrobno djelovanje

Biljka čajevac pripada porodici Theaceae, a najpoznatije su dvije glavne sorte: *Camellia sinensis* var. *sinensis* koja se uzgaja u Kini i *Camellia sinensis* var. *assamica*, najčešće uzgajana u Indiji i Sri Lanki (Hara i sur., 1995a). Postoje tri glavne vrste čaja, a to su crni, zeleni i oolong (smeđi). Crni čaj je najpopularniji jer ga, prema literaturnim podacima, konzumira 80 % ljudi diljem svijeta (Dufresne i Farnworth, 2000).

Prvi apikalni listovi se beru sa zimzelenih grmova i mogu se obrađivati na različite načine. Zeleni čaj se zatim suši na zraku sa ili bez faze fiksacije zbog inaktivacije enzima (Hara i sur., 1995b). Crni čaj, najpopularniji predstavnik čajeva na svijetu dobiva se oksidacijom polifenola lista zelenog čaja multienzimskim procesom (Hara i sur., 1995c), pri čemu se stvaraju novi kompleksi polifenolnih molekula. Neki od glavnih sastojaka čaja su purinski alkaloidi: kafein, teaflavini, galotanini, triterpeni, saponini, flavonoidi, mineralni sastojci, ugljikohidrati i vitamini (Kaczmarczyk i Lochynski, 2004).

Katehini čaja pokazali su antimikrobnu aktivnost protiv gram pozitivnih i gram negativnih bakterija koje mogu biti štetne za čovjeka. Ekstrakti čaja inhibiraju enterobakterije, kao što su *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *Plesiomonas shigelloides* (Toda i sur., 1989), *Salmonella typhi*, *S. tiphimurium*, *S. enteridis*, *Shigella flexneri*, *S. dysenteriae* i *Vibrio cholerae*. *V. parahaemolyticus* (Mitscher i sur., 1997; Toda, i sur., 1991), *Campylobacter jejuni* i *C. coli* (Dikter i sur., 1994), ali ne djeluju na bakterije vrsta *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ili *Aeromonas hydrophila* (Toda i sur., 1989). Ekstrakti crnog i zelenog čaja također mogu djelovati na *Helicobacter pylori* koja se povezuje sa želučanim, peptičnim i duodenalnim čirevima (Diker i Hascelik, 1994). Međutim, važno je napomenuti da su koncentracije čaja korištene u ovim istraživanjima puno veće od uobičajenih koncentracija pri svakodnevnom konzumiranju čaja. Polifenoli čaja mogu selektivno inhibirati rast klostridija i pogodovati rastu bifidobakterija u ljudskom debelom crijevu. Ravnoteža bakterija u crijevnoj mikroflori može biti važna za sprječavanje raka debelog crijeva (Okubo i Juneja, 1997).

Dokazana je antimikrobna aktivnost protiv kariogenih i parodontnih bakterija. Polifenoli čaja inhibiraju *Streptococcus mutans* (Sakanaka i sur., 1989), *S. sobrinus* (Sakanaka i sur., 1990) i *Porphyromonas gingivalis*, bakterije odgovorne za stvaranje karijesa (Kakuda i sur., 1994; Sakanaka i sur., 1996). Nerolidol iz hlapljivih frakcija zelenog čaja i fluoridi prisutni u

zelenom čaju pridonose antibakterijskoj aktivnosti ekstrakata čaja protiv vrste *Streptococcus mutans* (Antony i Shankaranaryana, 1997). Polifenoli i seskveterpeni čaja imaju sinergistički učinak na antibakterijsku aktivnost i antikariogena svojstva čaja (Kakuda i sur., 1994). Bakterije koje uzrokuju karijes proizvode mliječnu kiselinu koja uništava zubnu caklinu, no čaj može povećati otpornost zuba na kiseline (Gutman i Ryu, 1996). Zaštita protiv karijesa čajevim polifenolima je potvrđena istraživanjima na štakorima (Antony i Shankaaranaryana, 1997).

Neki rezultati ukazuju na to da su katehini čaja potencijalni antivirusni agensi (Gutman i Ryu, 1996). EGCG aglutinira i inhibira viruse A i B gripe u životinjskim staničnim kulturama. Antivirusna aktivnost dokazana je protiv enzima HIV virusa i protiv rotavirusa i enterovirusa u staničnim kulturama majmuna koji su prethodni tretirani s EGCG (Mitscher i sur., 1997).

## **2.2. Kombucha: priprava i fermentacija**

Tradicionalno su crni i zeleni čaj, uz dodatak različitih masenih koncentracija konzumnog šećera (saharoze), najčešći supstrati za pripremu *kombuche*, no u posljednje se vrijeme različite vrste biljnih čajeva, kao i infuzije začinskog bilja koriste za pripremu ovog napitka (Reiss, 1994). Čajni listići dodaju se u kipuću vodu zaslađenu s određenom koncentracijom saharoze (od 50 do 100 g/L), ekstrahiraju 10-15 minuta, a nakon toga se čaj procijedi i stavlja na hlađenje. Procijeđeni čaj se ulijeva u čistu staklenu ili porculansku (glaziranu) posudu sa širokim otvorom i zakiseljava s već pripremljenim *kombucha* napitkom. Nakon toga se na površinu čaja pažljivo dodaje „majčinska“ kultura *kombuche* iz prošlog uzgoja i posuda se prekriva sa čistom pamučnom tkaninom ili gazom. Fermentacija se odvija na sobnoj temperaturi (između 20 i 30 °C) tijekom 2-8 tjedana. Tijekom fermentacije, stanice „kćeri“ *kombuche* sintetiziraju bakterijsku celulozu (tanke opne biomase) na površini čaja. Po završetku fermentacije, bakterijska celuloza *kombuche* se pažljivo uklanja s površine i skladišti pri +4 °C u malom volumenu fermentiranog čaja do novog naciepljivanja. Fermentirani čaj se kroz gazu procijedi u boce s čepovima i skladišti do konzumacije u hladnjaku pri +4 °C. Okus *kombuche* se mijenja tijekom fermentacije, ovisno o vrsti čaja, od ugodno voćno-kiselkasto pjenušavog okusa nakon par dana, do srednje octenog okusa nakon dužeg uzgoja (Blanc, 1996).

### 2.3. *Kombucha*: mikrobiološki sastav

*Kombucha* je simbiotički združena kultura bakterija octene kiseline i osmofilnih kvasaca. Vrste glavnih bakterija octene kiseline izolirane iz čajne gljive su *Acetobacter xylinum* (Balentine, 1997), *A. xylinodes*, *Bacterium gluconicum* (Reiss, 1994), *A. aceti*, *A. pasteurianus* (Liu i sur., 1996). Identificirani kvasci su vrste *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces ludwigii*, *S. cerevisiae*, *Kloackera apiculata*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Brettanomyces bruxellensis*, *B. lambicus*, *B. custersii*, *Candida* i *Pichia* (Balentine, 1997; Liu i sur., 1996; Mayser i sur., 1995). Istraživanja ovakve „bliske suradnje mikroorganizama“ koji čine *kombuchu* te njihova interakcija sa supstratima fermentacije predmet su brojnih istraživanja (Balentine, 1997; Sievers i sur., 1995; Yurkevich i Kutysenko, 1998). *Acetobacter xylinum* posjeduje mogućnost sinteze plutajuće celulozne mreže (matriksa) u kojoj su bakterije octene kiseline imobilizirane, dok su kvasci najčešće na površini matriksa (Balentine i sur., 1997). Glavni metaboliti pronađeni u fermentiranom čaju su: octena, mliječna, glukonska i glukoronska kiselina, etanol i glicerol (Blanc, 1996; Liu i sur., 1996). Kvaščeve stanice hidroliziraju saharozu do glukoze i fruktoze pomoću ekstracelularnog enzima invertaze i proizvode etanol putem glikolize, a bakterije octene kiseline koriste glukozu za proizvodnju glukonske kiseline i etanol za proizvodnju octene kiseline (Reiss, 1994; Sievers i sur., 1995). Kofein i srodni ksantini čaja stimuliraju sintezu bakterijske celuloze pomoću bakterija (Balentine i sur., 1997). Octena kiselina potiče kvasac da proizvodi etanol koji pogoduje rastu bakterija octene kiseline te sintezi octene kiseline. Etanol i octena kiselina posjeduju antimikrobnu aktivnost protiv patogenih bakterija i na taj način zaštićuju *kombuchu* od mogućih kontaminacija (Liu i sur., 1996).

### 2.4. *Kombucha* i zdravlje

Poznato je da *kombucha* napitak posjeduje mnoga profilaktička i terapijska svojstva. Smatra se da pomaže probavi, olakšava tegobe s artritismom, djeluje kao laksativ, prevenira mikrobne infekcije, smanjuje simptome stresa, smanjuje razinu kolesterola i poboljšava izlučivanje toksina iz tijela (Malbaša i sur., 2011; Jayabalan i sur., 2014; Dufresne i Farnworth, 2000). Ovaj napitak također utječe na ljudsku gastrointestinalnu mikrobnu floru, djelujući kao probiotik i pomažući u poboljšanju ravnoteže intestinalne mikroflore (Sreeramulu i sur., 2001). Poznato je da poboljšava zdravlje kose, kože i noktiju, smanjuje stres i ublažava

živčane poremećaje, smanjuje pojavu insomnije, ublažava glavobolje, smanjuje potrebu za alkoholom i prevenira nastajanje mokraćnih infekcija (Jayabalan i sur., 2014).

Konsumacija *kombuche* obično ne izaziva nikakve nepovoljne sporedne učinke, no zabilježena su izvješća u kojima je ukazano na moguće zdravstvene poteškoće ako se napitak konzumira prečesto (više od dva puta na dan) i u velikim količinama. Simptomi, kao što su želučane tegobe, neke alergijske reakcije, posebice za one predisponirane za osjetljivost na kiseline i insuficijencija bubrega obično prestaju konzumacijom napitka u preporučenim dozama, a to je 0,5 dL ujutro i navečer (Frank, 1998).

## 2.5. Antimikrobno djelovanje *kombuche*

*Kombuchu* su kao čaj ili napitak proučavali mnogi znanstvenici zbog njenih inhibicijskih aktivnosti prema patogenim mikroorganizmima. Prema Greenwaldu i suradnicima (1998), *kombucha* čaj koji sadrži 33 g/L ukupnih kiselina (7 g/L octene kiseline) djelovao je antimikrobno prema *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus cereus*, *Salmonella choleraesuis serotype Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*, ali ne i prema *Candida albicans*. *Kombucha* čaj može inhibirati rast patogenih bakterija vrste *Entamoeba cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *B. cereus*, *E. coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus epidermis*, *Leuconostoc monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *S. aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* i *C. albicans* (Sreeramulu i sur., 2000, 2001). Također, pripravljen je iz različitih vrsta čaja, kao što su dudov čaj, japanski crni čaj, čaj od jasmína, oolong i crni čaj i testiran na patogenim bakterijama ljudi i račića. Rezultati su pokazali da je *kombucha* crni čaj imao najveću sposobnost inhibicije rasta patogenih mikroorganizama (Talawat i sur., 2006). Battikh i sur. (2012) su izvjestili da *kombucha* pripremljena iz zelenog i crnog čaja ima antimikrobni potencijal prema testiranim ljudskim patogenim mikroorganizmima, osim *C. krusei*, a *kombucha* zelenog čaja je pokazala najviši antimikrobni potencijal.

Istraživanje na *kombuchi* je pokazalo njezinu antimikrobnu učinkovitost i prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim patogenim mikroorganizmima. Antimikrobna aktivnost *kombucha* čaja se u velikoj mjeri može pripisati prisutnosti organskih kiselina, posebno octenoj kiselini, velikim proteinima i katehinima. Octena kiselina i katehini su poznati po tome da inhibiraju brojne Gram-pozitivne i Gram-negativne mikroorganizme (Sreeramulu i sur., 2000).

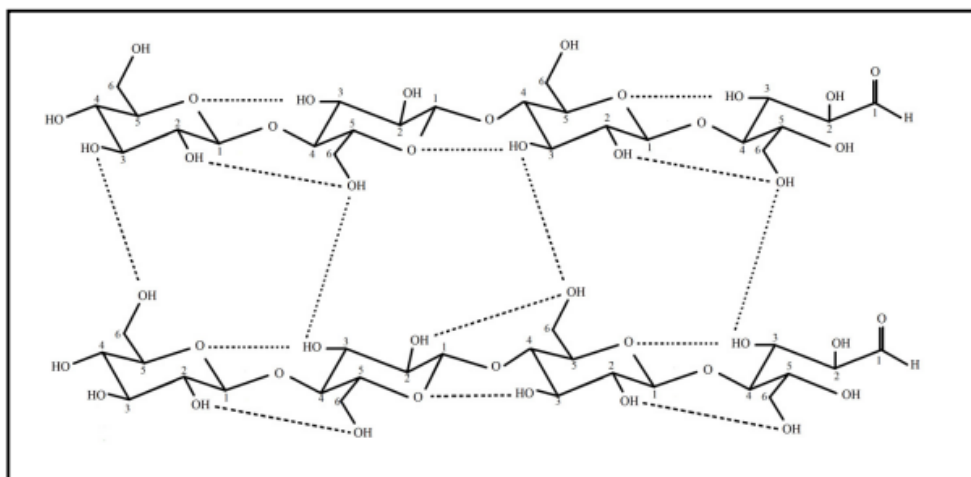
## 2.6. Bakterijska celuloza

Celuloza je najrašireniji biopolimer na zemlji, glavni je sastojak biljne biomase, ali i predstavnik mikrobnih ekstracelularnih polimera. Bakterijska celuloza (BC) pripada specifičnim proizvodima primarnog metabolizma. Sintetiziraju ju bakterije koje pripadaju rodovima *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* i *Sarcina* (Jonas i Farah, 1998). Najučinkovitiji proizvođač bakterijske celuloze je Gram-negativna bakterija octene kiseline vrste *Acetobacter xylinum* (prema novijoj klasifikaciji *Gluconacetobacter xylinus*; Yamada i sur., 1997), koja predstavlja modelni mikroorganizam za temeljna i primijenjena istraživanja celuloze (Yamada, 2000). Ta su istraživanja usmjerena na mehanizam sinteze ovog biopolimera, kao i na njegovu strukturu i svojstva koja ukazuju na praktičnu uporabu (Ross i sur., 1991). Jedno od najvažnijih svojstava bakterijske celuloze je kemijska čistoća, koja ju razlikuje od biljne celuloze, obavijene hemicelulozom i ligninom, čije je uklanjanje dugotrajni i često ekonomski neisplativi postupak.

Upravo zbog svojih jedinstvenih svojstava koja su posljedica izrazito tanke mrežne strukture, bakterijska celuloza ima višestruku primjenu u papirnoj, tekstilnoj i prehrambenoj industriji, a kao biomaterial se upotrebljava u pripravi kozmetičkih pripravaka i biomedicini (Ring i sur., 1986).

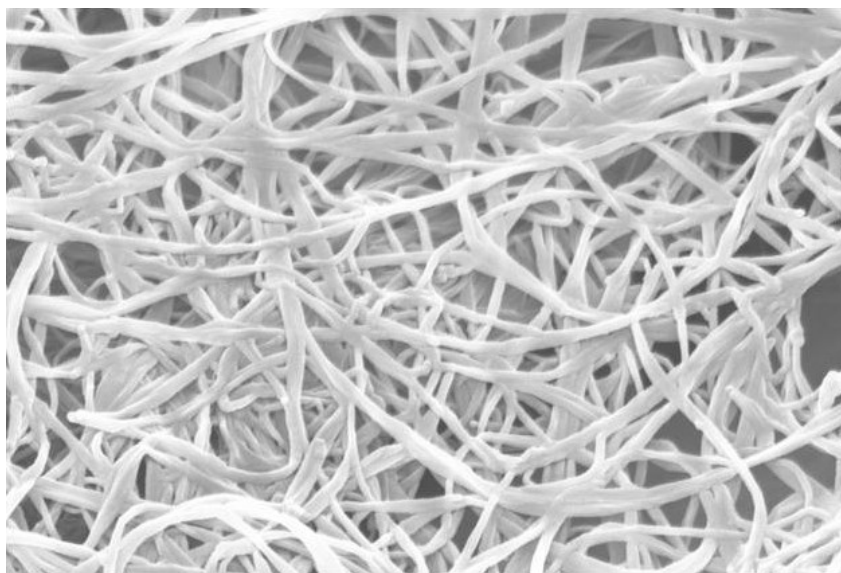
## 2.7. Biosinteza bakterijske celuloze

Celuloza je nerazgranati polimer glukoze vezane u čvrstu strukturu  $\beta$ -1,4-glikozidnim vezama (Slika 1). Istraživanja provedena na strukturi bakterijske celuloze su pokazala da je kemijski potpuno identična biljnoj celulozi, ali potpuno različita prema makromolekularnoj strukturi i svojstvima. Usporedni lanci bakterijske celuloze oblikuju podvlakna širine do 1,5 nm i predstavljaju najtanja prirodno stvorena vlakna, koja se mogu usporediti samo s vlaknima celuloze iz godova drveta (Kudlicka i Brown, 1997).



**Slika 1.** Kemijska struktura bakterijske celuloze ((Ul-Islam i sur., 2012)

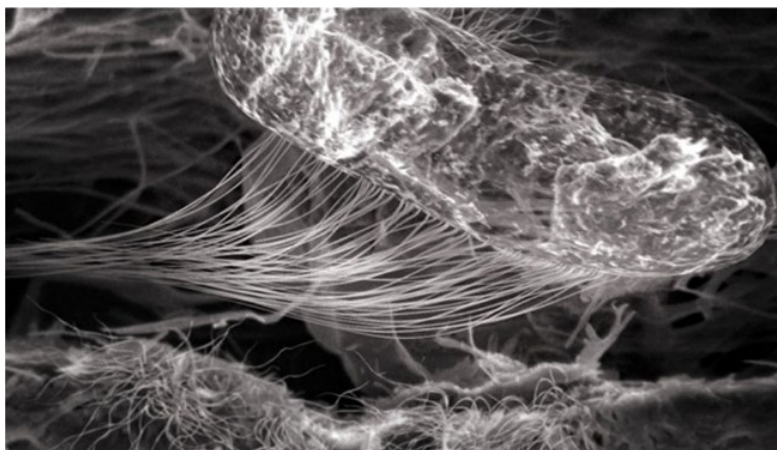
Bakterijska celuloza prvo kristalizira do strukture mikrovlakana (Jonas i Farah, 1998), nakon toga se povezuje u snopove, te, u konačnici, u trake dimenzija  $4,1 \cdot 117$  nm (Yamanaka i sur., 2000). Ovakve posebno tanke trake bakterijske celuloze, čija se dužina kreće od 1 do 9  $\mu$ m, čine zbog vodikovih veza čvrstu strukturu (Slika 2).



**Slika 2.** SEM snimka uzorka bakterijske celuloze koja prikazuje povezanu 3-D mrežu celuloznih vlakana (Torres i sur., 2012)

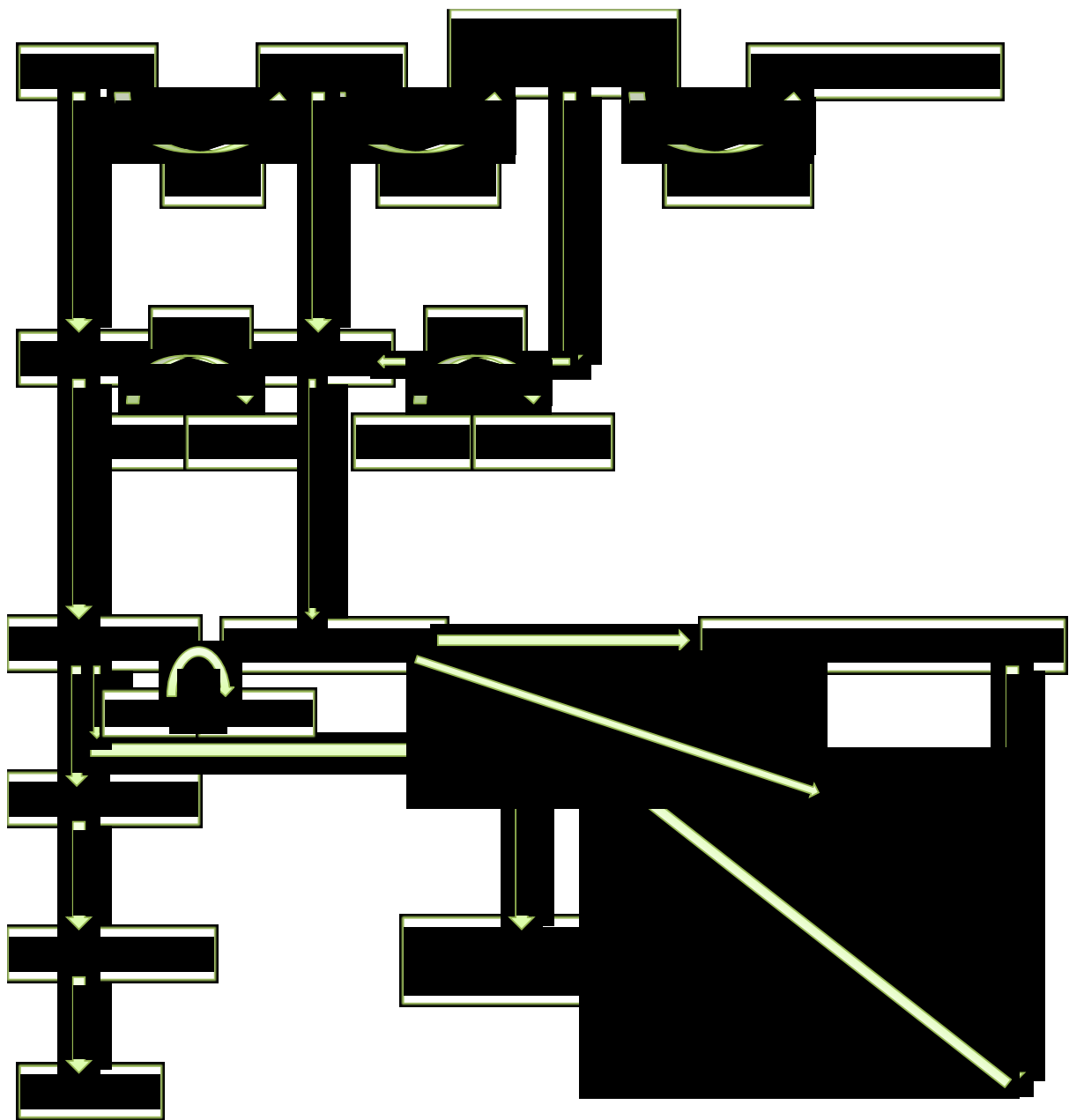


Bakterijska celuloza se razlikuje od biljne po svojoj kristalichnoj strukturi (60 %) i stupnju polimerizacije koji je obično između 2 000 i 6 000, no ponekad može biti i 20 000, dok je stupanj polimerizacije kod biljnih celuloza najčešće 16 000 (Watanabe i sur., 1998). Makroskopska morfologija bakterijske celuloze ovisi izričito o uvjetima uzgoja (Yamanaka i sur., 2000). Pri statičnom uzgoju radna kultura bakterija sintetizira celuloznu opnu (pelikulu) na površini hranjive podloge koja je bogata atmosferskim kisikom. Celulozna podvlakna usporedno se sintetiziraju i „izlaze“ s površine bakterijske stanice (Slika 3), kristaliziraju u obliku mikrovlakana i povećavaju obujam bakterijske celulozne opne. Takva struktura opne, koja je vrlo slična ljudskoj koži, sastoji se od međusobno preklapljenih i isprekrižanih celuloznih traka koje čine usporednu, no ne u potpunosti organiziranu površinu (Keshk, 2014).



**Slika 3.** Sinteza bakterijske celuloze na površini bakterijske stanice (Keshk, 2014)

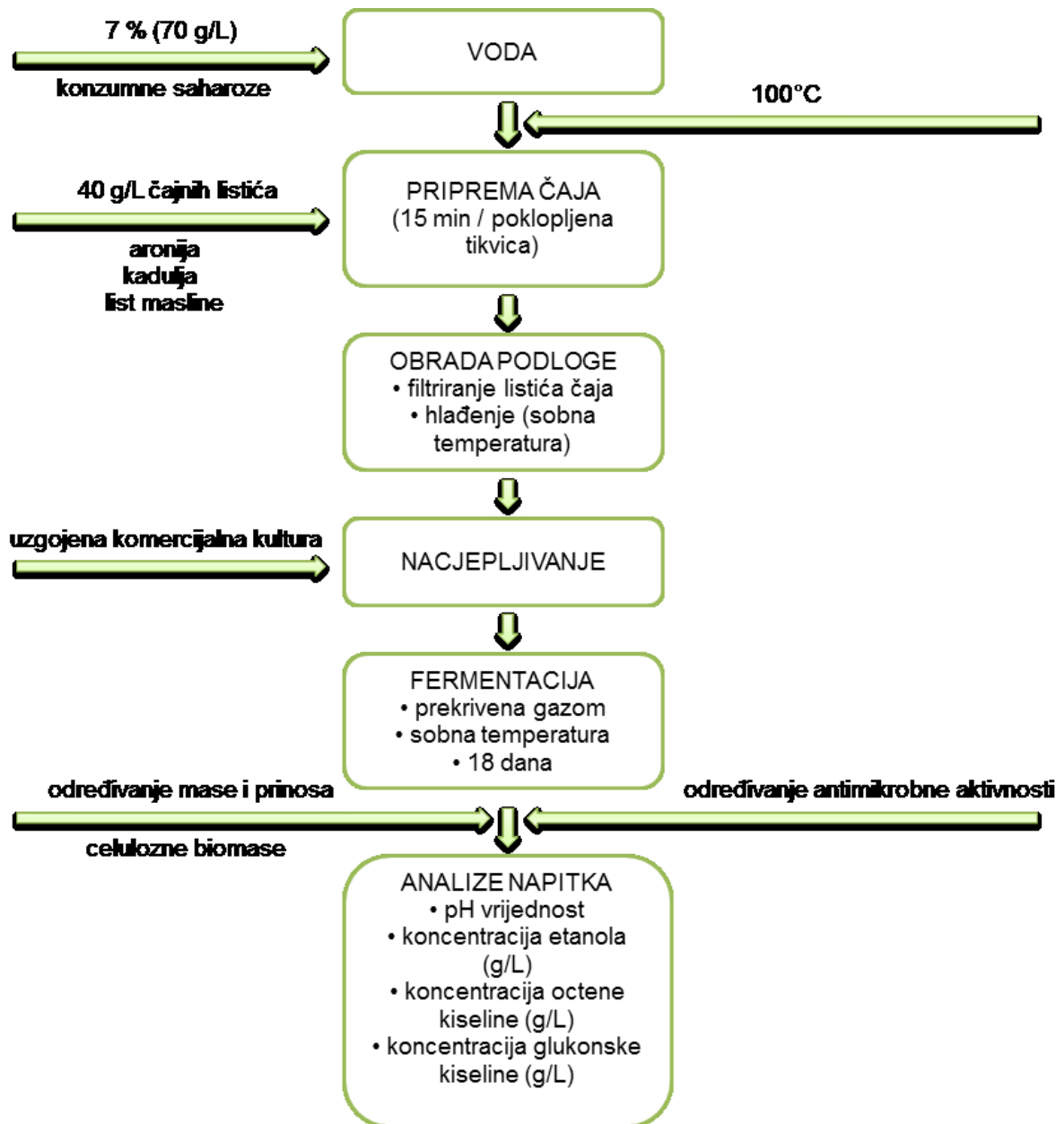
Metabolički put konverzije izvora ugljika u celulozu odvija se u četiri koraka. Sve započinje konverzijom glukoze u glukoza-6-fosfat djelovanjem glukonaze, nakon čega slijedi izomerizacija fosfo-glukomutazom do glukoza-1-fosfata. Treći korak je konverzija glukoza-1-fosfata u uridin-difosfat glukoze (UDPG) pomoću UDPG-pirofosforilaze. Konačno, u četvrtom koraku se UDPG polimerizira u celulozu djelovanjem celuloza sintaze (Tal i sur., 1998). Cijeli sustav metabolizma ugljika do celuloze u *A. xylinum* je prikazan na Slici 4.



Slika 4. Biokemijski put sinteze bakterijske celuloze s *A. xylinum* (Tal i sur., 1998)

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Tijek istraživanja



Slika 5. Shematski prikaz cjelokupnog istraživanja

## 3.2. Materijali i metode rada

### 3.2.1. Priprava kulture *kombuche*

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

### 3.2.2. Uporabljene vrste čaja

Uzgojena *kombucha* nacijepljena je na 3 vrste čaja:

- **aronija** – *Aronia melanocarpa*, Darvitalis, Zagreb
- **kadulja** – *Salvia officinalis*, Argistar d.o.o., Višnjevac
- **list masline** – *Folium olivae*, Jurin Dvor d.o.o., Šestanovac

### 3.2.3. Priprava fermentiranih čajeva

Infuzije čaja od aronije, kadulje i lista masline su pripravljene dodatkom 40 g listića pojedinog čaja u 1 L kipuće vode u koju je dodano 70 g/L saharoze (bijeli konzumni šećer). Nakon ekstrakcije koja je trajala 15 minuta, čaj je ohlađen na sobnu temperaturu i filtrirani su čajni listići. Bistri filtrat je preliven u sterilne Erlenmeyer tikvice od 1 L korisnog volumena i inokuliran sa svježe ugojenom *kombucha* kulturom. Nacijepljeni uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi tijekom 18 dana, nakon čega je prevrela tekućina centrifugirana pri 2500 o/min tijekom 10 minuta, a supernatant je uporabljen za daljnja određivanja. Kontrolni uzorak je bila neprevrela infuzija istraživanih vrsta čaja.

### 3.2.4. Određivanje pH vrijednosti

Prije, tijekom i na kraju fermentacije je infuziji čajeva određivana pH vrijednost pomoću pH metra Hanna Industrial model HI 98103.

### 3.2.5. Određivanje koncentracije octene kiseline

U Erlenmeyer tikvicu od 200 mL stavljeno je 1 mL uzorka fermentiranog čaja, 20 mL vode i doda 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:

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

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 (mL)

### 3.2.6. Određivanje koncentracije glukonske kiseline

U Erlenmeyer tikvicu od 200 mL stavljeno je 5 mL uzorka fermentiranog čaja 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)

### 3.2.7. 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. 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 (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), 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:

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

a = utrošak 0.1 M otopine Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (mL)

### 3.2.8. Antimikrobna aktivnost *kombucha* čaja

Antimikrobna aktivnost *kombucha* čaja određivana je metodom radijalne difuzije (Sreeramulu i sur., 2001), mjerenjem zona inhibicije rasta testiranih mikroorganizama: bakterija *S. aureus*, *S. typhimurium* i *E. coli*, te kvasca *C. albicans*.

Suspenzije stanica bakterija i kvasca ( $10^8$ /mL) nacijepljene su na hranjive podloge te im je u izbušene rupice u podlozi (visina 3 mm, promjer 4 mm) pipetom dodano 100  $\mu$ L fermentiranog čaja. Podloge su stavljene na inkubaciju 24 h pri 28 °C (kvasac) i 37 °C (bakterije). Nakon toga su očitani rezultati pokusa, pri čemu je zamjećivano postoji li zona inhibicije, je li područje zamućeno ili čisto, te su mjereni promjeri nastalih zona. Svi pokusi su provedeni u trima paralelama, te je izračunata srednja vrijednost dobivenih rezultata.

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

Nakon 18-og dana fermentacije, izmjerena je masa celulozne biomase (g) prema sljedećoj formuli:

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

gdje je:

$m_{cb}$  = masa celulozne biomase (g)

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

$m_i$  = masa inokuluma (g)

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

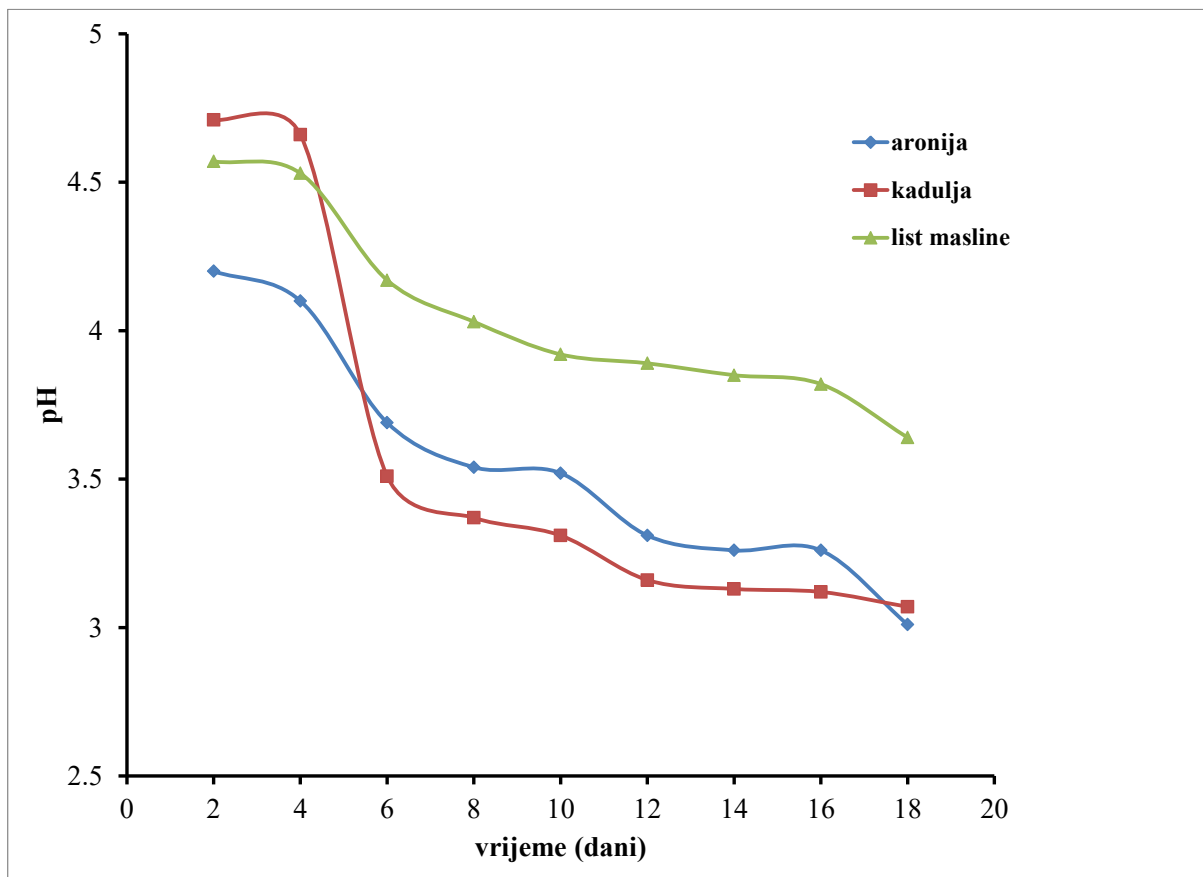
$$Y_{cb} \text{ (\%)} = (\gamma \text{ biomase nakon fermentacije} / \gamma \text{ saharoze na početku procesa}) \times 100$$



## **4. REZULTATI**

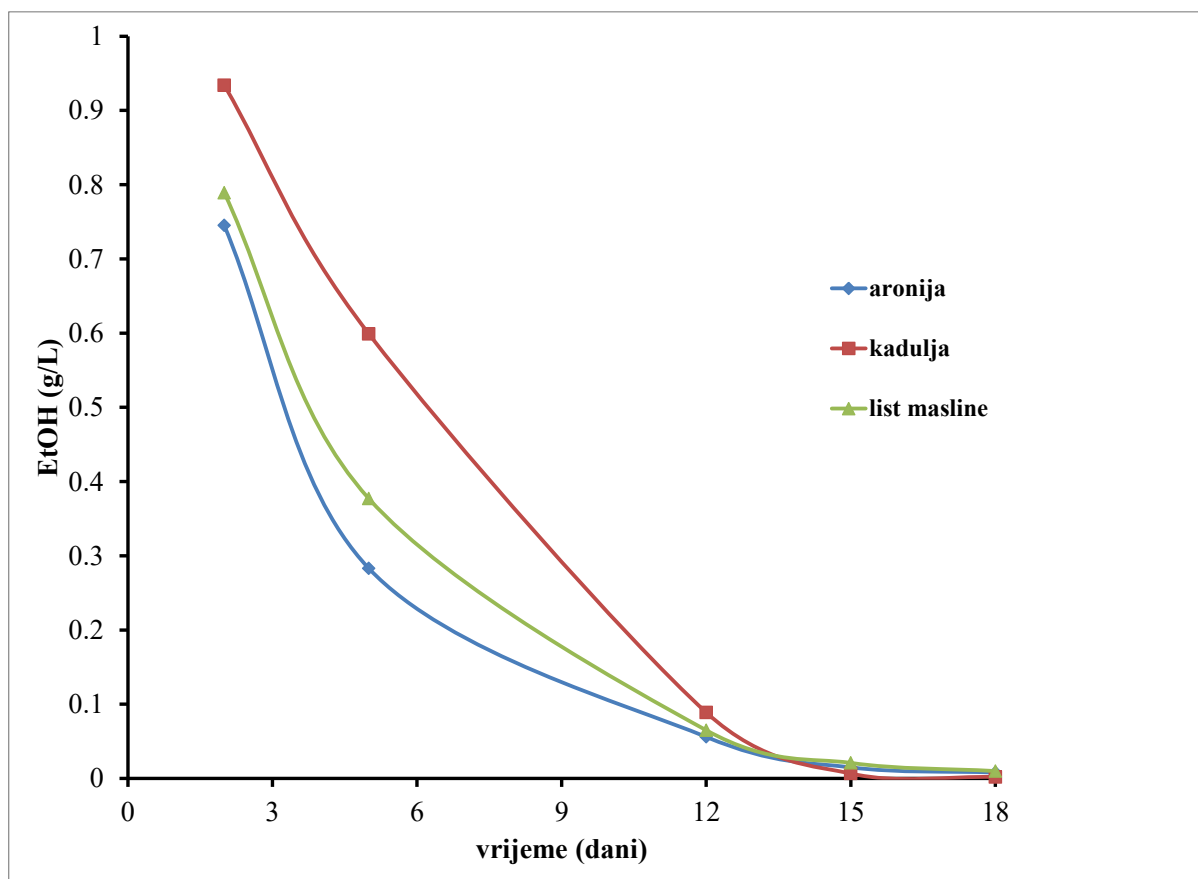
U ovom je radu proučavana fermentacija tri različite vrste čaja: aronije, kadulje i lista masline sa združenom kulturom bakterija octene kiseline i kvasaca, u javnosti poznatoj kao *kombucha* ili „čajna gljiva“.

Tijekom 18 dana fermentacije na sobnoj temperaturi, praćene su pH vrijednosti fermentiranih čajeva (Slika 6). Nastajanje kiselina tijekom fermentacije rezultiralo je padom pH vrijednosti infuzija čajeva, od početnih 4,2 (aronija), 4,71 (kadulja) i 4,57 (list masline) do konačnih 3,01 (aronija), 3,07 (kadulja) i 3,64 (list masline). Najmanja promjena pH vrijednosti primijećena je tijekom 18- dnevne fermentacije čaja s listom masline, za manje od 1 pH jedinice, a najveća u čaju od kadulje, gdje je izmjerena promjena bila 1,7 pH jedinica. Tijekom fermentacije čaja s aronijom, pH vrijednost se promijenila za 1,2 pH jedinice (Slika 6).



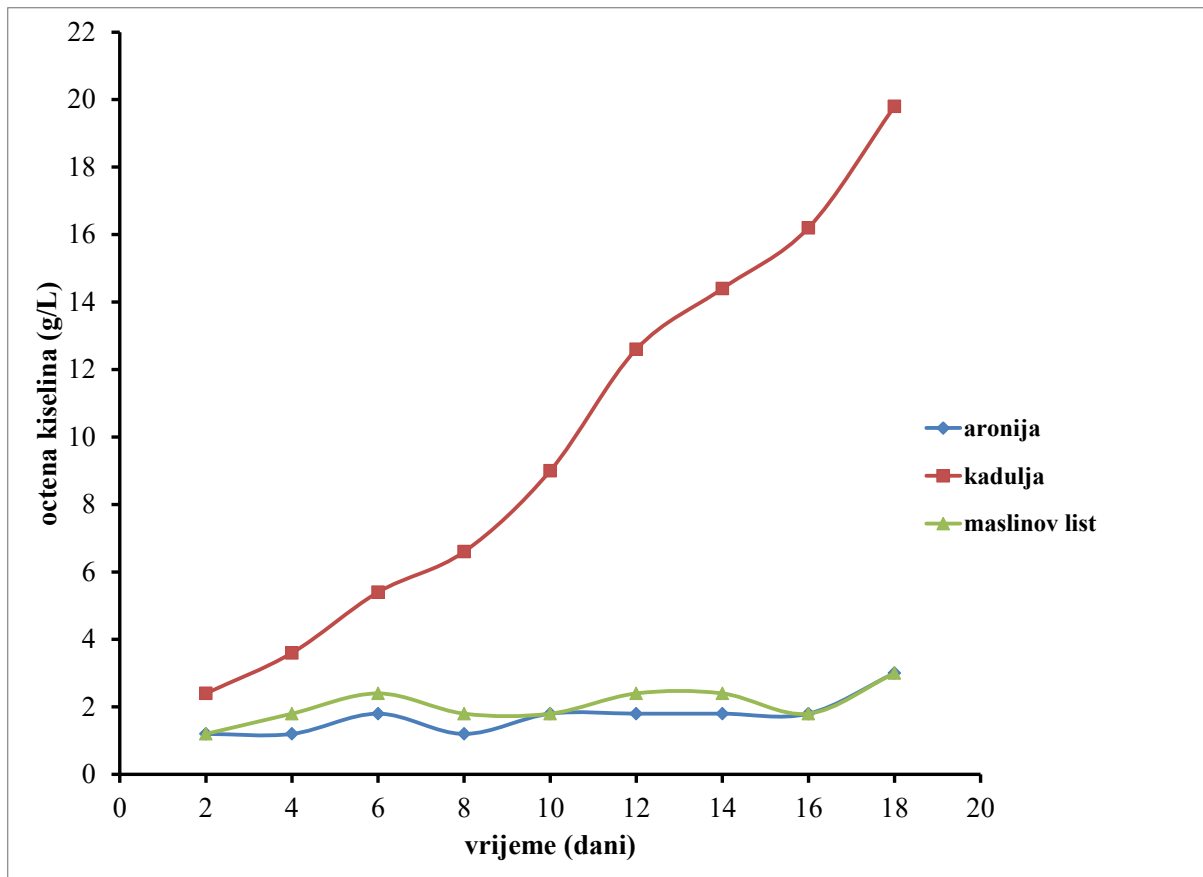
**Slika 6.** Promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije različitih vrsta čaja s *kombuchom*

Koncentracija etanola u *kombuchi*, prema većini autora ne prelazi koncentraciju od 10 g/L (Sievers i sur., 1995). U ovom radu su početne koncentracije etanola bile vrlo niske i u svim su se čajevima nakon 24 h fermentacije kretale od 0.66 do 0.93 g/L, da bi nakon 18 dana uzgoja pale na 0.015 g/L (Slika 7).



**Slika 7.** Promjena koncentracije etanola tijekom fermentacije različitih vrsta čaja s *kombuchom*

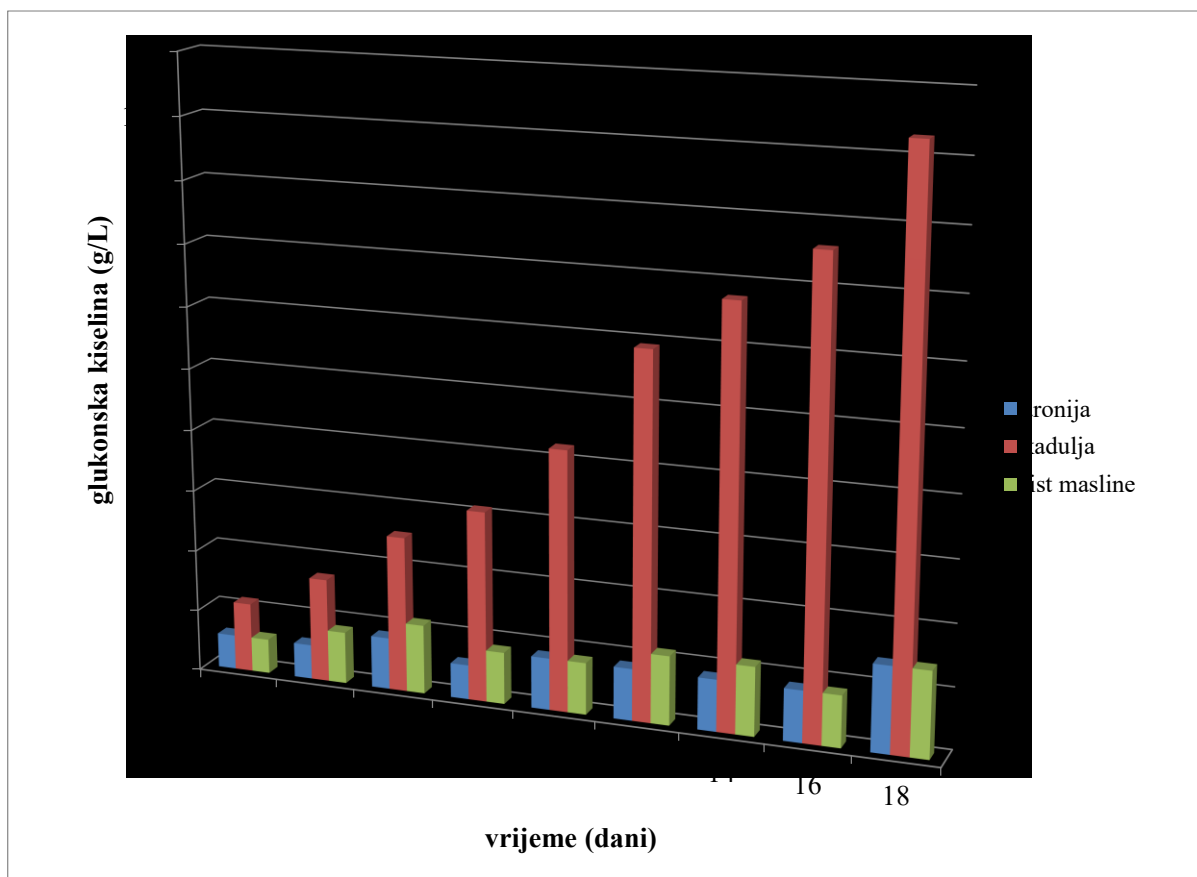
Dominantna organska kiselina u fermentiranim čajevima je octena kiselina, čija se masena koncentracija tijekom fermentacije u čaju kadulje linearno povećavala (Slika 8). Koncentracije octene kiseline nakon 48 sati fermentacije bile su potpuno iste u infuzijama aronije i lista masline (1,2 g/L). Dvostruko veća koncentracije izmjerena je u infuziji kadulje, 2,4 g/L. Nakon 18 dana fermentacije, najveća koncentracija octene kiseline ponovno je izmjerena u čaju s kaduljom (19,8 g/L), a u čajevima aronije i lista masline, kao i na početku fermentacije, masena koncentracije octene kiseline je bila potpuno ista i iznosila je 3 g/L (Slika 8).



**Slika 8.** Promjena koncentracije octene kiseline tijekom fermentacije različitih vrsta čaja s *kombuchom*

Glukozu bakterije octene kiseline oksidiraju u glukonsku kiselinu. Glukonska kiselina je druga glavna organska kiselina koja nastaje kao posljedica metabolizma *kombuche*. Kao što je vidljivo na Slici 9, koncentracija glukonske kiseline bila je manja 10 puta od koncentracije octene kiseline, no zabilježen je linearni rast tijekom cijelog vremena fermentacije *kombuche* u čaju kadulje, od 0,2 g/L na početku, do 1,84 g/L na kraju istraživanja.

Ovisno o tome što se želi proizvoditi, fermentirani *kombucha* napitak ili bakterijska celuloza, upravo učinak početne koncentracije glukoze u podlozi je izrazito važan jer nastajanje glukonske kiseline kao sporednog proizvoda, snižava pH hranjive podloge, a samim tim smanjuje brzinu i produktivnost sinteze bakterijske celuloze (Masaoka i sur., 1993).



**Slika 9.** Promjena koncentracije glukonske kiseline tijekom fermentacije različitih vrsta čaja s kombuchom

Jedan od prvih i vidljivih produkata biotransformacije zaslađenog čaja je celulozna biomasa koja se u obliku tankog sloja oblikuje na površini tekućine (Slika 10). Celuloznu biomasu na površini održava CO<sub>2</sub> nastao fermentativnom aktivnošću kvasaca (Markov i sur., 2003). Mikroskopskom analizom celuloznog sloja dokazano je da se po njoj površini nalazi veliki broj bakterija, kojima je, kao striktnim aerobima potreban atmosferski kisik. S donje strane celulozne opne je nakupina kvasaca, fakultativno anaerobnih mikroorganizama. Općenito prihvaćen termin čajna gljiva najvjerojatnije potječe od celuloznog sloja koji svojim izgledom podsjeća na *pileus* (klobuk) viših gljiva (Blanc, 1996).



**Slika 10.** Izgled celulozne biomase *kombuche* nakon 18 dana fermentacije u čaju od lista masline

**Tablica 1.** Prinos celulozne biomase *kombuche* nakon 18 dana fermentacije različitih vrsta čaja

| Vrsta čaja   | $\gamma$ inokuluma (g/L) | $\gamma$ celulozne biomase (g/L) | Prinos (%) |
|--------------|--------------------------|----------------------------------|------------|
| aronija      | 18,65                    | 67,23                            | 69,40      |
| kadulja      | 18,78                    | 63,19                            | 63,44      |
| list masline | 19,93                    | 31,45                            | 17,88      |

Iako nakon 45. dana uzgoja *kombuche* nisu ispitivani osnovni parametri: pH vrijednost čaja, maseni udjeli etanola i octene kiseline, nastavljena su istraživanja izgleda (Slika 11) i prinosa celulozne biomase (Tablica 4).



**Slika 11.** Izgled celulozne biomase *kombuche* nakon 45 dana fermentacije čaja od aronije

**Tablica 2.** Prinos celulozne biomase *kombuche* nakon 45 dana fermentacije različitih vrsta čaja

| Vrsta čaja   | $\gamma$ inokuluma (g/L) | $\gamma$ celulozne biomase (g/L) | Prinos (%) |
|--------------|--------------------------|----------------------------------|------------|
| aronija      | 18,65                    | 139,89                           | 273,20     |
| kadulja      | 18,78                    | 142,32                           | 76,48      |
| list masline | 19,93                    | 52,18                            | 147,50     |

Bakterijska celuloza se sintetizira u slojevima, tako da svaki ciklus sinteze rezultira novim slojem (Slike 12 i 13). Ovisno o sobnoj temperaturi stvara se tanji ili deblji sloj, tanji pri nižoj temperaturi, a deblji pri višoj (Slika 13).



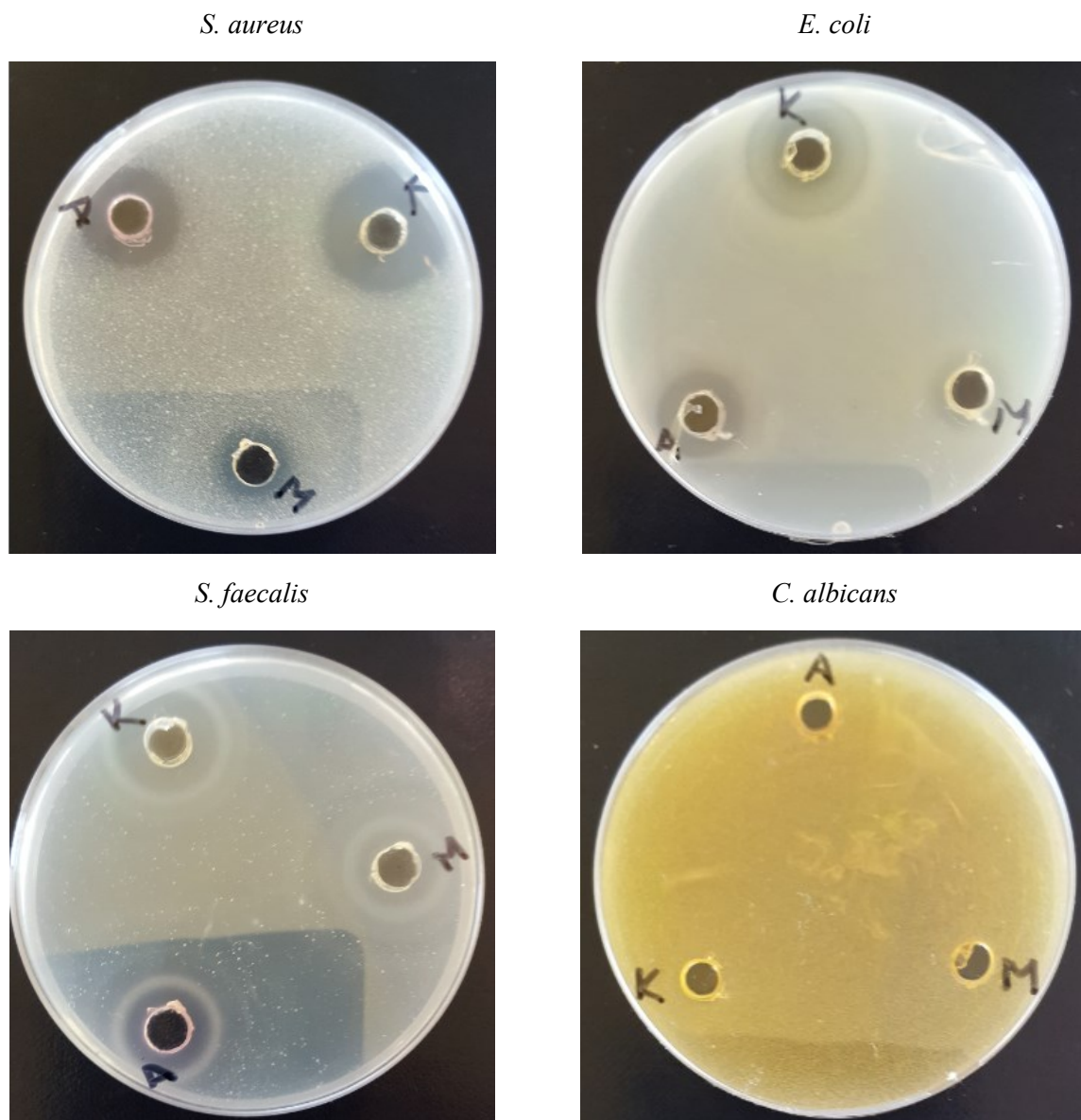
**Slika 12.** Slojevi bakterijske celuloze nastali tijekom 45 dana fermentacije u čaju od aronije



**Slika 13.** Debljina slojeva bakterijske celuloze nakon 45 dana fermentacije u čaju od aronije



Na antimikrobna svojstva *kombuche* više je puta ukazivano i raznim metodama potvrđeno (Greenwalt i sur., 1998). U ovom radu je antimikrobna aktivnost fermentiranih čajeva *kombuche* ispitivana sa četiri testna mikroorganizma; bakterije vrsta *S. aureus*, *E. coli* i *S. faecalis* i kvascem *C. albicans* (Slika 14). Rezultati prikazani u Tablici 5 ukazuju na izvrsno antimikrobno djelovanje na bakterije *S. faecalis* i vrlo dobro djelovanje na *S. aureus* i *E. coli*, dok u prisutnosti *C. albicans* nisu uočene zone inhibicije. Također je uočeno da je fermentirani čaj pripravljen od kadulje pokazao najveće antimikrobno djelovanje kod svih ispitivanih vrsta bakterija (Tablica 5).



**Slika 14.** Zone inhibicije rasta testnih mikroorganizama; A-aronija, K-kadulja, M-maslina

**Tablica 3.** Antimikrobno djelovanje različitih vrsta *kombucha* čaja

| Zone inhibicije<br>(mm) | <i>Staphylococcus<br/>aureus</i> | <i>Escherichia<br/>coli</i> | <i>Streptococcus<br/>faecalis</i> | <i>Candida albicans</i> |
|-------------------------|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| Vrsta čaja              |                                  |                             |                                   |                         |
| aronija                 | 22                               | 16                          | 34                                | -                       |
| kadulja                 | 30                               | 26                          | 30                                | -                       |
| list masline            | 15*                              | 10                          | 26                                | -                       |

\*zamućena zona

## **5. RASPRAVA**

*Kombucha* je visokovrijedni nutritivni napitak koji se dobiva fermentacijom zaslađenog čaja (običnim konzumnim šećerom; saharozom ili nekim drugim izvorom ugljika) pomoću združene kulture bakterija octene kiseline i raznih vrsta kvasaca, koja se popularno naziva „čajna gljiva“. Napitak je slatkast, blago kiseli i pjenušav, te nutritivno i biološki vrlo vrijedan zbog čega se i preporučuje njegovo svakodnevno konzumiranje u malim količinama (Greenwalt i sur., 2000; Dufresne i Farnworth, 2000).

Koncentracija i životnost čajne gljive (majčinska kultura bakterijske celuloze) može varirati od uzgoja do uzgoja. Bakterije octene kiseline sintetiziraju plutajuću biomasu *kombuche* na površini infuzije čaja, čime se pojačava združivanje bakterija i kvasaca (Balentine i sur., 1997), a kvasci previru saharozu u fruktozu i glukozu, proizvodeći etanol (Reiss, 1994). Udjel mikroorganizama u strukturi bakterijske celuloze je vrlo kompleksan (Anken i Kappel, 1992).

Svaki mikroorganizam za svoj rast i metabolizam ima svoj optimalni pH interval, tako da pH vrijednost hranjive podloge ima važnu ulogu u mikrobnom rastu i sintezi bakterijske celuloze (Sinclair, 1987). Tijekom 18 dana fermentacije, pH vrijednosti infuzija čajeva se razmjerno smanjivala bez obzira na vrstu čaja (Slika 6). Najveća promjena pH vrijednosti zabilježena je u čaju s kaduljom (za 2,3 pH jedinica), a najmanja u čaju od lista masline (1 pH jedinica). Tijekom fermentacije čaja aronije pH vrijednosti su se postupno smanjivale od 4,3 do 3,1 jedinica. Dobiveni rezultati su u suglasju s istraživanjima Hwanga i sur. (1999), koji su zaključili da prijetvorba glukoze u glukonsku kiselinu rezultira značajnim padom pH vrijednosti tijekom fermentacije.

Prema dostupnim literaturnim podacima, masena koncentracija etanola u *kombucha* pripravcima ne prelazi koncentraciju od 1 % (vol/vol) (Markov i sur., 2003). Sievers i sur. (1995) su objavili da su nakon 10 dana fermentacije *kombuche* u crnom čaju izmjerili maksimalnu masenu koncentraciju etanola od 3.6 g/L. U ovom radu su se koncentracije etanola nakon 24 h fermentacije kretale između 0,75 i 0.96 g/L, a nakon 18 dana fermentacije su u svim uzorcima smanjene na 0.012 g/l (Slika 7).

Iako tijekom fermentacije s *kombuchom* najviše nastaje octena kiselina, metabolizmom nastaju i druge organske kiseline: glukonska, glukuronska i mliječna kiselina (Dufresne i Farnworth, 2000). Rezultati dobiveni ovim istraživanjem pokazali su da je najveća koncentracija octene kiseline nakon 18 dana fermentacije postignuta u čaju od kadulje (21.6 g/L), puno manje koncentracije izmjerene u čaju od aronije i maslinovog lista (oko 2 g/L) (Slika 8). Glukozu bakterije octene kiseline oksidiraju u glukonsku kiselinu. Glukonska kiselina je druga glavna organska kiselina koja nastaje kao posljedica metabolizma

*kombuche*. Kao što je vidljivo na Slici 9, koncentracija glukonske kiseline bila je manja 10 puta od koncentracije octene kiseline, no zabilježen je linearni rast u svim uzorcima tijekom cijelog vremena fermentacije, a najveći u uzorku čaja s kaduljom od 0,2 g/L na početku, do 1,85 g/L na kraju istraživanja. U čaju od aronije i lista masline, nakon 18 dana fermentacije, izmjerena je ista koncentracija glukonske kiseline, 0,28 g/L.

Tijekom fermentacije čaja pomoću *kombuche*, već nakon 24 h je vidljivo stvaranje prozirne opne na površini tekućine, koja s vremenom fermentacije postaje sve deblja i želatinoznija (Slika 11). Prema istraživanjima Goha i sur. (2012), koji su pratili prinos biomase *kombuche* ovisno o koncentraciji šećera (od 50 do 250 g/L), uočeno je da se prinos biomase povećavao do 90 g/L (66.7 %), a nakon toga se naglo smanjivao, te je pri najvećoj koncentraciji od 250 g/L bio samo 9.9 %. U ovom su radu tri infuzije različitih vrsta čaja obogaćene dodatkom 70 g/L saharoze. Ovisno o vrsti čaja postignuti su različiti prinosi celulozne biomase, pri čemu je najveći prinos postignut nakon 18 dana uzgoja u čaju od aronije (69,409 %), a najmanji u čaju s listom masline (17,88 %), dok je uzgojem u čaju od kadulje postignut prinos od 63,44 % celulozne biomase (Tablica 3). Istraživanje prinosa celulozne biomase je nastavljeno do 43-og dana fermentacije. Dobiveni rezultati su pokazali da je u naknadnih 25 dana fermentacije prinos celulozne biomase u čaju aronije iznosio 273,20 %, kadulje 76,48 %, a u čaju od lista masline 147,50 % (Tablica 4).

Na Slici 11 jasno je vidljivo da je bakterijska celuloza nakon 45 dana fermentacije sintetizirana višekратно jer se sastoji od nekoliko slojeva koji se vrlo jednostavno mogu odvojiti poput listova papira (Slika 12). S obzirom da je ovo istraživanje provedeno na sobnoj temperaturi, uz dnevne fluktuacije, na Slici 13 se može opaziti da nisu svi slojevi jednake debljine. Uočeno je da debljina sloja može ovisiti o temperaturi i da su deblji slojevi sintetizirani pri višim temperaturama okoline, koja nije prelazila 28 °C u prostoriji u kojoj je istraživanje provedeno.

Inokulacija čajne gljive zajedno s prethodno fermentiranim čajem (10 % v/v), ne samo da osigurava brzi početak fermentacije (Sievers i sur., 1995), nego i štiti od naseljavanja plijesni, kao i drugih neželjenih mikroorganizama (Frank, 1999). Ovo zapažanje su naknadno potvrdili Greenwalt i sur. (2000), uz objašnjenje da je smanjenjem pH infuzija čaja s prethodno fermentiranim čajem mogućnost kontaminacije drugim mikroorganizmima značajno smanjeno.

Antimikrobna aktivnost fermentiranih uzoraka čajeva kvantitativno je praćena mjerenjem prisutnosti ili odsustva zona inhibicije rasta testiranih vrsta bakterija i kvasaca (*S. aureus*, *S. faecalis*, *E. coli* i *C. albicans*), te pojave zamućenih zona, kojima se može objasniti

djelomična inhibicija rasta mikroorganizama (Slika 14, Tablica 5). Dobiveni rezultati su pokazali da je rast *S. aureus* bio djelomično inhibiran samo dodatkom čaja s listom masline, gdje su primijećene zamućene, a ne čiste zone inhibicije. Rast *E. coli* nije inhibirao niti jedan od istraživanih čajeva, dok je kod *S. faecalis* zabilježena najveća antimikrobna aktivnost. Niti jedan fermentirani čaj nije inhibirao rast kvasca *C. albicans* (Slika 14, Tablica 5). Ovi se rezultati mogu djelomično usporediti s rezultatima koje su dobili Battikh i sur. (2012), koji su istraživali antimikrobne učinke fermentacije infuzija začinskog bilja s *kombuchom*. Do sada nisu objavljeni bilo kakvi rezultati istraživanja provedenih na fermentaciji ovih vrsta čaja s *kombuchom* koje su istraživane u ovom radu.

## **6. ZAKLJUČCI**

### **Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti:**

1. *Kombucha* je nutritivno vrijedni napitak dobiven fermentacijom saharozom zaslađenog čaja pomoću simbiotski združene kulture bakterija octene kiseline i raznih vrsta kvasaca. U ovom radu su istraživane fermentacije *kombuche* na infuzijama plodova aronije, lista masline i kadulji.

2. Tijekom 18 dana fermentacije, istraživane su koncentracije nastalih organskih kiselina (octene i glukonske) i etanola s komercijalnom kulturom *kombuche* pri sobnoj temperaturi, uz dodatak 70 g/L saharoze. Koncentracije octene i glukonske kiseline su linearno rastle u čaju kadulje, dok je kod čaja od aronije i listu masline blagi porast zabilježen tek pri kraju fermentacije.

3. U svim je uzorcima tijekom fermentacije pad pH vrijednosti i koncentracije etanola bio u korelaciji s povećanjem koncentracije octene kiseline.

4. Najveći prinos celulozne biomase nakon 18 dana fermentacije izmjeren je u čaju aronije (69,40 %), malo manji u čaju kadulje (63,44 %), dok je prinos u čaju od lista masline bio samo 17,88 %.

5. Debljina pojedinog sloja sintetizirane bakterijske celuloze mijenjala se tijekom fermentacije ovisno o okolišnoj temperaturi (25 do 28 °C).

6. Antimikrobna aktivnost ispitivana je mjerenjem zona inhibicije rasta bakterija *S. aureus*, *S. faecalis* i *E. coli*, te kvasca *C. albicans*. Fermentirane vrste čaja su pokazale izvrsnu antimikrobnu aktivnost prema bakterijskim kulturama, no rast kvasca *C. albicans* nije bio inhibiran.



## **7. LITERATURNI NAVODI**

- Anken, R. H., Kappel, T. (1992). Histochemical and anatomical observations upon the tea fungus. *Europ. Arch. Biol.* **103**, 219-222.
- Antony, J.I.X., Shankaranaryana, M.L. (1997) Polyphenols of green tea. *Int. Food Ingrid.* **5**, 47-50.
- Balentine, D.A., Wiseman, S.A., Bouwens, L.C. (1997) The chemistry of tea flavonoids. *Crit. Rev. Food. Sci.* **37**, 693-704.
- Battikh, H., Chaieb, K., Bakhrouf, A., Ammar, E. (2012). Antibacterial and antifungal activities of black and green kombucha teas. *J. Food. Biochem.* **37**, 231–236.
- Blanc, P.J. (1996) Characterization of the tea fungus metabolites. *Biotechnol. Lett.* **18**, 139-142.
- Diker, K.,S., Hascelik, G. (1994) The bacterial activity of tea against *Helicobacter pylori*. *Lett. Appl. Microbiol.* **19**, 299-300.
- Dufresne, C., Farnworth, E. (2000) Tea, kombucha and health: a review. *Food Res. Int.* **33**, 409-421.
- Frank, G.W. (1998) Does Kombucha have any side effects? <http://bawue.de/~kombucha/side-effects.htm>. Pristupljeno 16. 07. 2016.
- Goh, W.N., Rosmaa, A., Kaur., B., Fazilah., A., Karim, A.A., Bhat, R. (2012) Fermentation of black tea broth (Kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose. *Int. Food. Res. J.* **19**, 109-117.
- 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.
- Gutman, R.L., Ryu, B.-H. (1996) Rediscovering tea. An exploration of the scientific literature. *HerbalGram*, **37**, 33-48.

Hara, Y., Luo, S.-J., Wickremashinghe, R.L., Yamanishi, T. (1995a) Botany (of tea). *Food Rev. Int.* **11**, 371-374.

Hara, Y., Luo, S.-J., Wickremashinghe, R.L., Yamanishi, T. (1995b) Processing tea. *Food Rev. Int.* **11**, 409-434.

Hara, Y., Luo, S.-J., Wickremashinghe, R.L., Yamanishi, T. (1995c) Chemical composition of tea. *Food Rev. Int.* **11**, 527-542..

Hollman, P.C.H., Tijburg, L.B.M., Yang, C.S. (1997) Bioavailability of flavonoids from tea. *Crit. Rev. Food. Sci.* **37**, 719-738.

Hwang, J.W., Yang, Y.K., Hwang, J.K., Pynu, Y.R., Kim, Y.S. (1999) Effect of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* RBC5 in agitated culture. *J. Sci. Bioeng.* **88**, 183-188.

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

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

Kaczmarczyk, D., Lochynski, S. (2014) Products of biotransformation of tea infusion – properties and applications. *Pol. J. Natur. Sc.* **29**, 381-392.

Kakuda, T., Sakane, I., Takihara, T., Tsukamoto, S., Kanegae, T., Nagoya, T. (1996) Effects of tea (*Camellia sinensis*) chemical compounds on ethanol metabolism in ICR mice. *Biosci. Biotech. Bioch.* **60**, 1450-1454.

Kakuda, T., Takihara, T., Sakane, I., Mortelmans, K. (1994) Antimicrobial activity of tea extracts against periodontopathic bacteria. *Nippon Nogei. Kaishi (Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan)* **68**, 241-243.

- Keshk, S.M.A.S. (2014) Bacterial cellulose production and its industrial applications. *J. Bioprocess Biotech.* **4**, 1-10.
- Kudlicka, K., Brown, R.M. (1997) Cellulose and cellose biosynthesis in higher plants. *Plant Physiol.* **115**, 643-656.
- 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.
- 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.
- Markov, S. L., Malbaša, R. V., Hauk, M. J., Cvetković, D. D. (2001). Investigation of tea fungus microbe associations. The yeasts. *Acta. Period. Technol.* **32**, 133–138.
- Masaoka, S., Ohe, T., Sakota, N. (1993) Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. *J. Ferment. Bioeng.* **75**, 18-22.
- Mayser, P., Fromme, S., Leitzmann, C., Grunder, K. (1995) The yeast spectrum of the „the fungus Kombucha“. *Mycoses* **38**, 289-295.
- Mitscher, L.A., Jung, M., Shankel, D., Dou, J.-H., Steele, L., Pillai, S. (1997) Chemoprotection: a review of the potential therapeutic antioxidant properties of green tea (*Cemellia sinensis*) and certain of its constituents. *Med. Res. Rev.* **17**, 327-365.
- Okubo, T., Juneja, R. (1997) Effects of green tea polyphenols on human intestinal microflora. U: T. Yamamoto, L. R. Juneja, D.-C. Chu, M. Kim, Chemistry and Applications of Green Tea (pp. 109-122). Salem: CRC Press LLC.
- Reiss, J. (1994) Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Z. Lebensm. Unters. For.* **198**, 258-261.

Ring, D., Nashed, W., Dow, T. (1986) Liquid loaded pad for medical applications. US Patent 4,588,400.

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

Sakanaka, S., Kim, M., Taniguchi, M., Yamamoto, T. (1989) Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. *Agr. Biol. Chem. Tokyo*, **53**, 2307-2311.

Sakanaka, S., Sato, T., Kim, M., Yamamoto (1990). Inhibitory effects of green tea polyphenols on glucan synthesis and cellular adherence of cariogenic *Streptococci*. *Agr. Biol. Chem. Tokyo*, **54**, 2925-2929.

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.

Sinclair, C. G. (1987). Microbial process kinetics. U: Basic Biotechnology. Bullock, J., Kristiansen, B. (ured.). Academic Press, London, str. 75-127.

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

Tal, R., Wong, H. C., Calhoon, R. (1998). Three cdg operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J. Bacteriol.* **180**, 4416-4425.

Talawat, S., Ahantharik, P., Laohawiwattanukul, S., Premasuk, A., Ratanapo, S. (2006) Efficacy of fermented teas in antibacterial activity. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* **40**, 925-933.

Tariq, A., Bashir, I., Khan, K.I., Majeed, I., Zafar, N., Sajid, I. (2014) Structural components of gastro-retentive drug delivery systems. *IAJPR.* **4**, 3863-3870.

Toda, M., Okubo, S., Hiyoshi, R., Tadakatsu, S. (1989) The bactericidal activity of tea and coffee. *Lett. Appl. Microbiol.* **8**, 123-125.

Toda, M., Okubo, S., Ikigai, H., Suzuki, T., Suzukim Y., Shimamura, T. (1991). The protective activity of tea against infection by *Vibrio cholerae* 01. *J. Appl. Bacteriol.* **70**, 109-112.

Watanabe, K., Tabuchi, M., Morinaga, Y., Yoshinaga, F. (1998) Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. *Cellulose* **5**, 187–200.

Yamada, Y., Hoshino, K., Ishikawa, T. (1997) The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconacetobacter* to the generic level. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 1244–1251.

Yamada, Y., Katsura, K., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., Uchimura, T., Komagata, K. (2000) *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the Proteobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 823–829.

Yamanaka, S., Ishihara, M., Sugiyama, J. (2000) Structural modification of bacterial cellulose. *Cellulose* **7**, 213–225.

Yang, C.S., Wang, Z.-Y. (1993) Tea and cancer: review. *J. Natl. Cancer I.* **85**, 1038-1049.

Yurkevich, D.I., Kutysenko, V.P. (1998) Study of glucose utilisation during the growth of tea fungus by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Biofizika+* **43**, 319-322.