

Fizikalna i antimikrobna karakterizacija bakterijske celuloze uzgojene u zelenom čaju

Besednik, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:587280>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

**FIZIKALNA I ANTIMIKROBNA KARAKTERIZACIJA
BAKTERIJSKE CELULOZE UZGOJENE U ZELENOM ČAJU**

Ana Besednik
6927/BT

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 2

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

Zagreb, 2017.

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

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

FIZIKALNA I ANTIMIKROBNA KARAKTERIZACIJA BAKTERIJSKE CELULOZE UZGOJENE U ZELENUM ČAJU

Ana Besednik, 6927/BT

Sažetak: *Kombucha* je osvježavajući napitak koji se dobiva fermentacijom zaslađenog čaja ili voćnih napitaka zahvaljujući snažnom simbiotskom djelovanju bakterija octene kiseline i kvasaca. U radu je proučavano nastajanje octene i glukonske kiseline, etanola i bakterijske celuloze biotransformacijom *kombuche* u zelenom čaju zaslađenim saharozom (60, 80 i 100 g/L). Promjene pH vrijednosti posljedica su simbiotske metaboličke aktivnosti osmofilnih kvasaca i bakterija octene kiseline i smanjivale su se s nastajanjem organskih kiselina. Analiziranjem uzoraka pomoću FT-IR spektroskopije, XRD analize i SEM pretraživanja, otkriveno je da su svi uzorci imali veći postotak amorfne strukture, a ne kristalične, kako je očekivano. Debljina i prinos bakterijske celuloze povećavali su se tijekom vremena fermentacije. Najveći prinos bakterijske celuloze bio je pri 100 g/L saharoze (143.66 %). Dobiveni rezultati ovog istraživanja ukazuju da maksimalni prinos bakterijske celuloze ovisi o mnogo čimbenika koje još treba dodatno optimizirati.

Ključne riječi: *kombucha*, bakterijska celuloza, organske kiseline, fizikalna svojstva, antimikrobna svojstva

Rad sadrži: 36 stranica, 14 slika, 5 tablica, 78 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Datum obrane: rujan 2017

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Biotechnology

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

PHYSICAL AND ANTIMICROBIAL CHARACTERIZATION OF BACTERIAL CELLULOSE OBTAINED BY GREEN TEA FERMENTATION

Ana Besednik, 6927/BT

Abstract: *Kombucha* is a traditional refreshing beverage obtained by the fermentation of sweetened tea with a powerful symbiosis of acetic bacteria and yeasts. The production of acetic and gluconic acids, ethanol and bacterial cellulose by biotransformation of *kombucha*, in green tea sweetened with sucrose (60, 80 and 100 g/L) was studied. Changes in pH were related to the symbiotic metabolic activities of yeasts and acetic acid bacteria, and it is decreased by the formation of organic acids. Analysing samples by FT-IR spectroscopy, XRD analysis and scanning electron microscopy, it was detected that all the samples had higher percentage of amorphous regions, than crystalline regions, as it was expected. The thickness and yield of bacterial cellulose increased with fermentation time. The highest yield of bacterial cellulose obtained was 120,27% (100 g/L). Findings from this study suggest that the yield of cellulose depends on many factors that need to be optimized to achieve maximum yield.

Keywords: *kombucha*, bacterial cellulose, organic acids, physical properties, antimicrobial properties

Thesis contains: 36 pages, 14 figures, 5 tables, 78 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *Sunčica Beluhan, PhD, Associate Professor*

Defence date: September 2017

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. <i>Kombucha</i>	2
2.2. Zeleni čaj.....	3
2.3. Bakterijska celuloza	4
2.4. Primjena bakterijske celuloze u kozmetičkim i farmaceutskim proizvodima.....	6
2.5. Primjena u prehrani.....	7
2.6. Antibakterijska aktivnost.....	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1. Materijali i metode	11
3.1.1. Priprava kulture <i>kombuche</i>	11
3.2. Hranjiva podloga.....	11
3.2.1. Vrsta čaja.....	11
3.2.2. Priprava kompleksne podloge (zeleni čaj)	11
3.3. Određivanje pH vrijednosti	11
3.4. Određivanje koncentracije octene kiseline	12
3.5. Određivanje koncentracije glukonske kiseline.....	12
3.6. Određivanje alkohola kemijskom metodom	12
3.7. FT-IR spektroskopija (<i>eng.</i> Fourier Transform Infrared Spectroscopy)	13
3.8. Difrakcija rentgenskim zrakama (<i>eng.</i> X Ray Diffraction; XRD).....	13
3.9. Pretražna elektronska mikroskopija (<i>eng.</i> Scanning Electron Microscopy; SEM).....	14
3.10. Izračunavanje mase i prinosa bakterijske celuloze	14
3.11. Određivanje kapaciteta zadržavanja vode (<i>eng.</i> Water-Holding Capacity; WHC)	15
3.12. Određivanje brzine otpuštanja vode (<i>eng.</i> Water-Release Rate; WRR).....	15
3.13. Određivanje antimikrobnih svojstava bakterijske celuloze	15
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	17
4.1. Promjena pH vrijednosti	17
4.2. Etanol, octena i glukonska kiselina	18
4.3. Sinteza bakterijske celuloze	20
4.4. Kapacitet zadržavanja i otpuštanja vode	21
4.5. FT-IR spektroskopska analiza.....	22
4.6. Difrakcija rentgenskih zraka.....	23
4.7. Pretražna elektronska mikroskopija	24
4.8. Antimikrobno djelovanje	26
5. ZAKLJUČCI.....	27
6. LITERATURA	28

1.UVOD

Proučavanjem uloge pića i hrane u narodnoj medicini, uočeno je da su mnoga pića i hrana korišteni zbog njihovih pozitivnih učinaka na zdravlje. Najstariji znani lijek je čaj koji je u Kini konzumiran još 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). Tijekom prošlih stoljeća, kultura ispijanja čaja je postupno rasla i postala sastavnim dijelom mnogih, diljem svijeta uvriježenih društvenih rituala, tako da je danas čaj postao drugo najpopularnije piće na svijetu nakon vode (Yang i Wang, 1993).

Kombucha čaj je bezalkoholni blago pjenušav fermentirani napitak, osvježavajuće slatkastog i blago kiselog okusa, a zbog njegovih nutritivnih, bioloških i ekoloških vrijednosti, preporučuje se svakodnevna konzumacija u malim volumenima (Blanc, 1996). Tradicionalno se proizvodi sa crnim ili zelenim čajem zaslađenim saharozom u koji se, kao starter kultura, naciepljuje združena, odnosno simbiotska kultura bakterija octene kiseline i raznih vrsta kvasaca, a fermentacija se provodi tijekom 10-14 dana (Teoh i sur., 2004). Danas *kombucha* predstavlja komercijalni proizvod novije generacije koji se može pronaći u prodavaonicama zdrave hrane širom Europe i Amerike (Malbaša i sur., 2008).

Celuloza koja je sintetizirana u biljkama ili ekstracelularno pomoću bakterija predstavlja neiscrpn i izvor organskog polimera na Zemlji i ima globalnu ekonomsku važnost (Kim i sur., 2006). Procijenjeno je da je godišnja proizvodnja ili sinteza celuloze veća od 150 milijardi tona (Huang i sur., 2014). Ovaj se prirodni polimer koristi u različitim područjima, od industrije papira, tekstilne industrije, a ima svoju primjenu i u biomedicinskoj i farmaceutskoj, kao i u prehrambenoj industriji (Wu i sur., 2007).

Bakterijska celuloza (BC) je fascinantni biopolimer s različitim svojstvima, kao što su visoka sposobnost zadržavanja vode, kristaliničnost, čvrstoća, ultratanka mreža vlakana i sposobnost oblikovanja trodimenzionalne (3D) strukture tijekom sinteze (Choi i sur., 2009; Li i sur., 2011; Nasab i Yousef, 2010).

U ovom radu su praćeni i određivani sljedeći parametri:

- promjena pH vrijednosti i koncentracija octene i glukonske kiseline, te etanola tijekom 11 dana fermentacije *kombuche* u zelenom čaju,
- prinos sintetizirane bakterijske celuloze,
- kapacitet zadržavanja i otpuštanja vode,
- kristaliničnosti bakterijske celuloze,
- antimikrobno djelovanje *kombucha* fermentiranog zelenog čaja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. *Kombucha*

Kombucha je fermentirani napitak s poviješću starom nekoliko tisuća godina, ishodište joj je u Aziji, a posljednjih tri desetljeća postala je vrlo popularni napitak u zapadnim zemljama (Kaufman, 1995). Fermentirani proizvod je blago pjenušav i slatkasto-kiselkast. Najčešće se proizvodi fermentacijom infuzije listova čajevca (*Camellia sinensis* L.), koji imaju blagotvorni učinak na ljudsko zdravlje kao diuretik, pri pojavi edema, arterioskleroze, gubitka tjelesne mase i brojnih drugih zdravstvenih problema (Frank, 1995). Istraživanja su, također, pokazala da *kombucha* uravnotežuje crijevnu floru, poboljšava metabolizam, djeluje kao prirodni antibiotik, pomaže održavanju pH vrijednosti organizma, odnosno kiselo-lužnate ravnoteže u tijelu (Dufresne i Farnworth, 2000). Mnogi od tih blagotvornih učinaka još uvijek nisu u potpunosti znanstveno potvrđeni, ali se provode brojna istraživanja koja sve više potvrđuju vrijednost *kombuche* kao izrazito zdravog napitka (Greenwalt i sur., 2000; Hartmann i sur., 2000).

Kombucha se tradicionalno pripravlja fermentacijom zaslađenog crnog ili zelenog čaja s 50-100 g/L saharoze i inokulacijom s prošlom generacijom uzgojene kulture ("majčinskom kulturom") uzgojene bakterijske celuloze, popularno zvane „čajna gljiva“ (Teoh i sur., 2004). Preporučeno je da se uz pelikulu *kombuche* u novu hranjivu podlogu doda 5-10 % napitka iz prijašnje fermentacije kao startera za početak nove fermentacije. Uzgoj se odvija u statičnim aerobnim uvjetima tijekom 10-14 dana pri 20-28 °C (Sievers i sur., 1995; Chu i Chen, 2006). Dužina fermentacije može varirati i produžiti se i do 60 dana (Chen i Liu, 2000), no u tom slučaju okus gotovog napitka poprima značajno kiseliju notu zbog povećane koncentracije octene kiseline. Prema provedenim istraživanjima različitih *kombucha* napitaka, fermentaciju bi trebalo završiti kad je izmjerena ukupna kiselost od 4 do 4,5 g/L (Cvetković i sur., 2008).

Kombucha predstavlja simbiotski združenu kulturu bakterija octene kiseline i kvasaca. *Acetobacter xylinum* je najčešće prisutna vrsta bakterija octene kiseline, no izolirane su i vrste *Acetobacter aceti* i *Gluconobacter oxydans* (Kerstens i sur., 2006). Najčešće izolirani kvasci pripadaju rodovima *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Torulopsis*, *Pichia* i *Brettanomyces* (Darrell i sur., 2000; Kurtzman i sur., 2001).

2.2. Zeleni čaj

Stoljećima su biljni čajevi korišteni u tradicionalnoj medicini pri pojavama različitih infekcija, oboljenja i bolesti. Čajevi su infuzije, najčešće osušenih listića, plodova ili korijena biljaka u vrućoj vodi. Unatoč njihovoj raširenosti i tradicionalnom ispijanju na Dalekom istoku, u zapadnom su dijelu svijeta postali tek u posljednjih dvjestotinjak godina sve popularniji (Chen i sur., 2007).

Zeleni čaj dobiva se iz biljke čajevac *C. sinensis* koja pripada u porodicu Theaceae. Trenutno se uzgaja u više od 30 zemalja diljem svijeta, a najveći su proizvođači Indija, Kina, Japan i Tailand.

Prema klasifikaciji, zeleni čaj pripada u:

Kraljevstvo: Plantae

Red: Ericales

Porodica: Theaceae

Rod: *Camellia*

Vrsta: *C. sinensis*

Binominalno ime: *Camellia sinensis* (L.) Kuntze

listovi



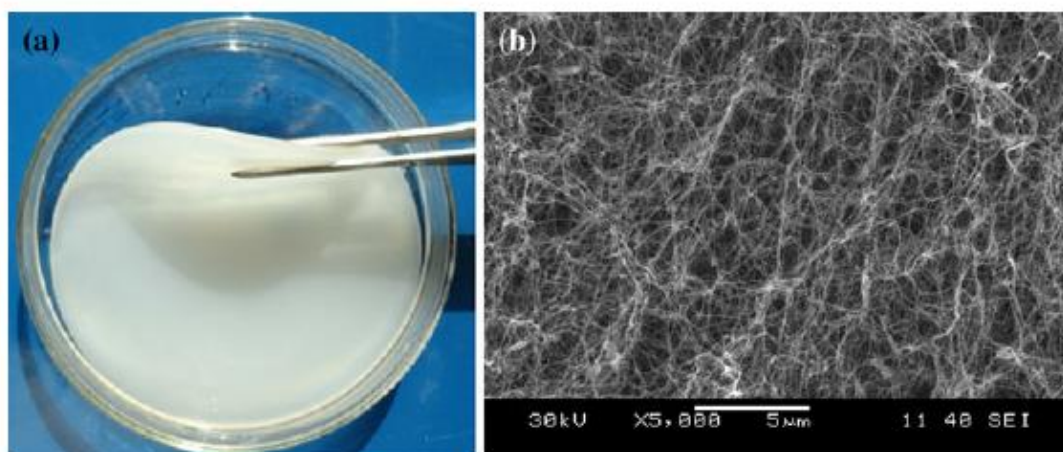
plodovi



Slika 1. *C. sinensis* (Namita i sur., 2012)

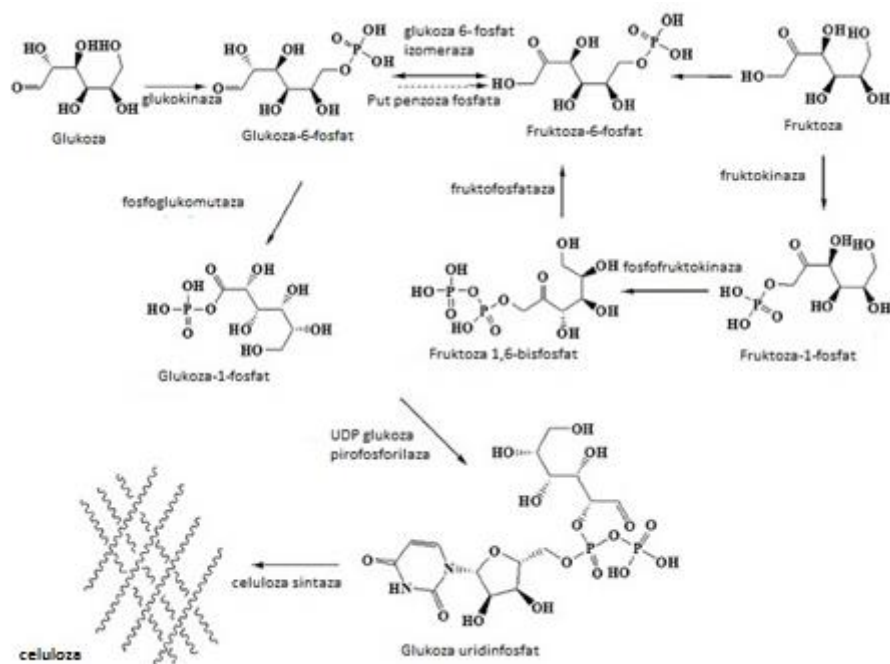
2.3. Bakterijska celuloza

Biomaterijali imaju bitnu ulogu u svakodnevnom životu ljudi (Czaja i sur., 2007; Hubbell, 1995; Ratner i Bryant, 2004; Shoicet, 2009). Ne smijemo isključiti važnost biopolimera u prehrani, osobnoj te medicinskoj njezi (Ellis i Smith, 2008; Murphy, 2001; Jay i sur., 2008). Celuloza je najbogatiji polimer na zemlji s $1,5 \cdot 10^{12}$ tona godišnje proizvodnje (Czaja i sur., 2004; Klemm i sur., 2005) i najčešće se dobiva od biljaka (Siro i Plackett, 2010). Osim biljne celuloze, celuloza je također dobivena sintezom *in vitro* pomoću enzima, kemijskom sintezom iz derivata glukoze, biosinteza i z različitih mikroorganizama, kao što su alge i gljive (Klemm i sur., 2005), kao i različitim aerobnim bakterijama rodova *Agrobacterium*, *Sarcina*, *Rhizobium* i *Acetobacter* (Dufresne, 2013; Khan i sur., 2007; Shezad i sur., 2010). Tijekom proučavanja fermentacije octene kiseline 1886. godine Brown je dobio bakterijsku celulozu u obliku želatinastog pokrova na površini tekuće podloge debljine 25 mm. Mikroorganizam koji je odgovoran za takvu membranu bakterijske celuloze je *A. xylinum*, po najnovijoj klasifikaciji poznat i pod imenom *Gluconacetobacter xylinus* (Brown, 1886a, b). *G. xylinus* je najčešće korišten mikroorganizam u osnovnim i primijenjenim studijama za proizvodnju bakterijske celuloze zbog velike produktivnosti i sposobnosti korištenja različitih šećera i drugih spojeva kao izvora ugljika (Ross i sur., 1991; Saxena i Brown, 2012). *G. xylinus* uzgojem pri kontroliranim uvjetima s pogodnim izvorima ugljika i dušika, proizvodi vrlo poroznu bakterijsku celulozu, mrežaste strukture u obliku tankih listova ili pelikula (Lin i sur., 2013; Pircher i sur., 2014) (Slika 2).



Slika 2. Izgled bakterijske celuloze proizvedene u statičnom uzgoju (a) i SEM fotografija (b) (Huang i sur., 2014)

Uzgoj može biti statičan ili na tresilici, te šaržni, polu-kontinuiran ili kontinuiran (Lin i sur., 2013, 2014; Pircher i sur., 2014; Sulaeva i sur., 2015). Tipična sinteza bakterijske celuloze odvija se u četiri reakcije katalizirane enzimima, a to su fosforilacija glukoze u glukoza-6-fosfat, izomerizacija glukoza-6-fosfata u fruktoza-6-fosfat, prevođenje glukoza-1-fosfata u uridindifosfat glukoze (UDP-glukoza), te sinteza lanaca glukana iz UDP- glukoze (Ross i sur., 1991).



Slika 3. Biokemijski put sinteze bakterijske celuloze (Lin i sur., 2013)

Paralelni glukanski lanci tvore agregate i kristaliziraju se te tvore mikrofibrile, nakon čega slijedi agregacija u diskontinuiranom snopu celuloznih vlakana (Iguchiei sur., 2000; Lin i sur., 2013). Nakon što se pranjem ukloni kultura, dobiva se bakterijska celuloza u obliku gela bez boje, okusa i mirisa. Takav gel ima nekoliko primjena u svakodnevnom životu (Lin i sur., 2013). Bakterijska celuloza ima povoljna svojstva kao što su izuzetne mehaničke karakteristike, dobra svjetlosna prozračnost, *in situ* sklopivost, poroznost, stabilnost, biokompatibilnost, slab imunogeni potencijal, stanična adhezija i poliferacija (Helenius i sur., 2006; Millon i Wan 2006; Qiu i Netravali, 2014; Svensson i sur., 2005) te ih ta dobra svojstva čine prikladnim biomaterijalom za primjenu u inženjerskim tkivima.

2.4. Primjena bakterijske celuloze u kozmetičkim i farmaceutskim proizvodima

Iako su slične prema kemijskoj strukturi, bakterijska celuloza ima različite i superiorne fizičke, mehaničke i biološke osobine u odnosu na biljnu celulozu. Zbog tih boljih svojstava, bakterijska celuloza ima primjenu u prehrambenoj industriji, kozmetici, biomedicini, te u primjeni lijekova (Lin i sur., 2013) (Slika 4).



Slika 4. Strukturna svojstva bakterijske celuloze (Ullah i sur., 2014)

Bakterijska celuloza je celuloza sintetizirana u svom najčišćem obliku, a to je bez primjesa pektina, hemiceluloze i lignina (Chawla i sur., 2009). Bakterijska celuloza je jako porozna, ima veliku propusnost za tekućine i plinove i posjeduje veliki kapacitet zadržavanja vode (više od 90% vlažne mase je voda) (Klemm i sur., 2001). Ovakve karakteristike bakterijske celuloze rezultat su ultrafine mreže od mikro i nanofibrila (Chawla i sur., 2009), koji su oko sto puta tanji od vlakana biljne celuloze. Ta svojstva ju čine pogodnom za primjenu kao stabilizatora formulacije, zgušnjivača, za pranje i piling lica bez mogućeg mehaničkog oštećenja kože (Lin i sur., 2015; Shi i sur., 2014b). Osim toga, biokompatibilnost, niski imunogeni potencijal i *in situ* sklopivost dodatno pojačavaju primjenu bakterijske celuloze u području biomedicine (Lin i sur., 2016). Ova svojstva zajedno sa izrazito velikom jačinom vlakana (Campano i sur., 2015) čine bakterijsku celulozu dobrim kandidatom za primjenu

na koži u kozmetici. Zbog velikog kapaciteta zadržavanja vode i kapaciteta ionske izmjene, bakterijska celuloza ima odgovarajući učinak pri snižavanju kolesterola. Uz transparentnost, visoka propusnost bakterijske celuloze za tekućine i plinove čini ju prikladnim sredstvom kao maske za lice, kontaktne leće te kao lijek u ranama i opeklinama (Czaja i sur., 2006). Strukturna svojstva bakterijske celuloze mogu biti korištena u različitim *in situ* tehnikama kao što su dodavanje različitih tvari, promjena u uvjetima uzgoja, upotreba u genetičkom inženjerstvu i u *ex situ* primjenama kao što su fizikalne i kemijske modifikacije, specijalni uvjeti sušenja, elektromagnetsko zračenje (Krystynowicz i sur., 2002; Lin i sur., 2013, 2016; Olyveira i sur., 2013; Petersen i Gatenholm, 2011; Stoica-Guzun i sur., 2007; Sulaeva i sur., 2015; Yadav i sur., 2010).

2.5. Primjena u prehrani

Dijetalna vlakna bakterijske celuloze imaju GRAS status (*eng.* Generally Recognized As Safe) od 1992. godine (Shi i sur., 2014b; Park i sur., 2009). Bakterijska celuloza ima mogućnost primjene u prehrambenoj industriji zbog svoje visoke čistoće, zbog različitih tekstura i oblika u obliku čestica, kuglica, niti i filmova, sposobnosti stjecanja *in situ* promjena kao što su boje, okusi, te zbog laganog procesa proizvodnje (Shi i sur., 2014b). Zbog ovih svojstava se bakterijska celuloza može koristiti i kao dodatak hrani i svakako naći primjenu u prehrambenoj industriji.

Jedna od prvih upotreba bakterijske celuloze je proizvodnja deserata na Filipinima koji pružaju „glatki osjećaj u ustima“, a tradicionalno se zovu „Nata de coco“. Pripravljaju se tako što se kokosova voda fermentira za biosintezu bakterijske celuloze, a nakon sinteze se bakterijska celuloza nasjecka u male dijelove i uroni u sirup od šećera. „Nata de coco“ se koristi kao slatki desert (Iguchi i sur., 2000; Klemm i sur., 2005, 2006). Taj desert se brzo svidio ljudima i brzo se proširio po svijetu u obliku bombona ili deserta (Phisalaphong i Chiaoprakobkij, 2012).

Bakterijska celuloza ima smanjenju količinu kolesterola u *in vitro* testovima zbog adsorpcije i vezanja (Stephens i sur., 1990). Gel bakterijske celuloze se može konzumirati u vrlo malim količinama, ali bakterijska celuloza korištena u hrani, kozmetici i u primjeni lijekova može postati jestiva ako se obradi sa alginatom i kalcijevim kloridom ili sa šećerom i alkoholom. Tekstura takve bakterijske celuloze nalikuje na mekušce i voće, kao što su lignje i grožđe (Okiyama i sur., 1992).

Tablica 1. Primjena bakterijske celuloze u hrani

Hrana ili proces	Oblik BC	Svrha BC	Reference
Nata de coco	Kriške BC	Glavna struktura	Iguchi i sur., . (2000)
Nisko kolesterolna dijeta	BC u obliku praška	Upijanje masnoće	Chau i sur., (2008), Lin i Lin (2004), Stephens i sur., (1990)
Vegetarijansko meso	Listovi BC	Strukturna komponenta, upijanje masnoće	Ju°zlova´ i sur., (1996), Purwadaria i sur., (2010), Wonganu i Kongruang, (2010)
Paste i džemovi	Vodenasta pasta	Toplinski stabilna suspenzija, agensi za oblikovanje mase	Okiyama i sur., (1992)
Tofu	Vodenasta pasta	Gelirajuće sredstvo	Okiyama i sur., (1993)
Kamboko	Vodenasta pasta	Agens za stvrdnjivanje, modifikator teksture	Okiyama i sur., (1993)
Čokoladni napitci	Vodenasta pasta	Agens za toplinsku stabilnost	Okiyama i sur., (1993)
Sladoled	Vodenasta pasta	Agens za stvrdnjivanje, protiv smrzavanja i otapanja	Okiyama i sur., (1993)
Vino	Komadići BC	Za povećanje aktivnosti kvasca	Montealegre i sur., (2012), Nguyen i sur., (2009), Ton i Le, (2011)
Gljivična polifenoloksidaza	Spužvasta BC	Za povećanje aktivnosti laktaze	Chen i sur., (2015)
L-lizin	Kocke BC	Za povećanje aktivnosti i održivosti stanica	
Pakiranje hrane	Listovi BC, film i BC u obliku praška	Hidrofobna i antimikrobna ambalaža	Dobre i sur., (2012), Jipa i s ur., (2012), Tome´ i sur., (2010)
glukoamilaza	zrnca	Za povećanje enzimске aktivnosti	Wu i Lia (2008), Wu i sur., (2013)

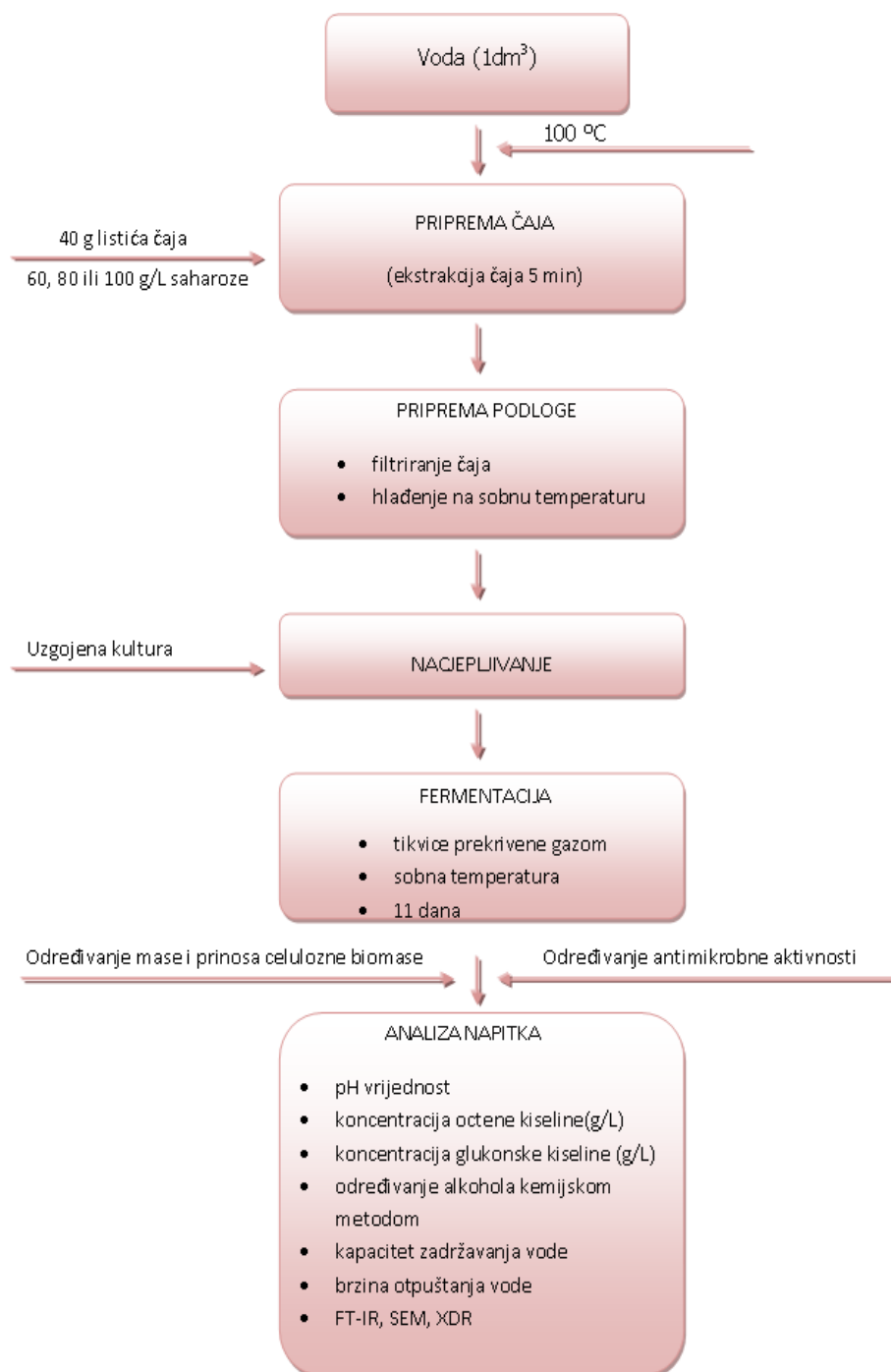
2.6. Antibakterijska aktivnost

Katehini zelenog čaja pokazali su antibakterijsku aktivnost protiv gram pozitivnih i gram negativnih bakterija koje mogu biti štetne za čovjeka. Ekstrakti čaja inhibiraju enterobakterije, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *Plesiomonas shigelloides* (Toda i sur., 1989), *Salmonella typhimurium*, *S. enteridis*, *Shigella flexneri*, *S. dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* (Mitscher i sur., 1997; Toda, i sur., 1991), *Campylobacter jejuni* i *Escherichia coli* (Diker i sur., 1991), ali ne djeluju na bakterije vrsta *Pseudomonas aeruginosa* i *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, koncentracije čaja korištene u ovim istraživanjima premašuju uobičajene koncentracije 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 aktivnosti 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). Nerolidoliz 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).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Cjelokupni tijek rada



Slika 5. Prikaz cjelokupnog tijeka istraživačkog rada

3.1. Materijali i metode

3.1.1. Priprava kulture *kombuche*

Komercijalna starter kultura *kombuche* je pripravljena zajedno s „majčinskom tekućinom“ u crnom čaju (40 g listića čaja/L vode) uz dodatak 100 g/L saharoze. Uzgoj je trajao 10 dana u aseptičnim uvjetima pri 28 °C u termostatu.

3.2. Hranjiva podloga

3.2.1. Vrsta čaja

Uzgojena *kombucha* (3 % tež/vol) naciepljena je na infuziju zelenog čaja (*Camellia sinensis*) proizvođača AGRISTAR d.o.o., Višnjevac, Hrvatska. Zemlja podrijetla: JAR

Sastojci: 100 % list zelenog čaja

3.2.2. Priprava kompleksne podloge (zeleni čaj)

Infuzije biljnog čaja su pripravljene dodatkom 40 g listića čaja u 1 L vode zagrijane na 85 °C u koju je dodano 60, 80 ili 100 g/L saharoze (bijeli konzumni šećer). Nakon ekstrakcije koja je trajala 5 minuta (naputak proizvođača je 3-5 minuta), čaj je ohlađen na sobnu temperaturu i filtrirani su čajni listići. Bistri filtrati su preliveni u sterilne Erlenmeyer tikvice od 500 mL korisnog volumena. Naciepljeni uzorci svježe uzgojenom *kombucha* kulturom su inkubirani pri 25 °C (sobna temperatura) tijekom 11 dana, a supernatant je uporabljen za daljnja određivanja.

3.3. Određivanje pH vrijednosti

Uzorcima je pH vrijednost mjerena svaki dan tijekom 11 dana fermentacije. Mjerenja su provedena nakon pažljivog izuzimanja 5 mL uzorka pipetiranjem uz rub posuda, kako ne bi došlo do oštećenja celulozne biomase koja pluta na površini uzorka. Mjerenja su provedena pomoću pH metra Hanna Industrial model HI 98103.

3.4. 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:

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

gdje je:

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

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

V_{uzorka} = volumen uzorka (1 mL)

3.5. Određivanje koncentracije glukonske kiseline

U Erlenmeyer tikvicu od 200 mL stavljeno je 25 mL uzorka i dodano nekoliko kapi fenolftaleina. Ovako pripremljeni uzorak je titriran otopinom 0,1 M NaOH do prve pojave ljubičaste boje. Masena koncentracija glukonske kiseline (g/L) 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_{uzorka} = volumen uzorka (mL)

3.6. Određivanje alkohola kemijskom metodom

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

Koncentracija (vol %) alkohola je izračunata prema jednadžbi:

$$\text{alkohol (vol \%)} = \left(10 - \frac{a}{6.9}\right) \cdot 2 \quad (3)$$

gdje je:

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

3.7. FT-IR spektroskopija (*eng.* Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

Uzorci bakterijske celuloze su sušeni 6 sati u suhom sterilizatoru pri 105 °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 Bomem MB 100 mid FT pri rezoluciji od 2 cm^{-1} u rangi od 4000 do 400 cm^{-1} .

3.8. Difrakcija rentgenskim zrakama (*eng.* X Ray Diffraction; XRD)

Rentgenska difrakcijska analiza provedena je korištenjem difraktometra Shimadzu XRD 6000 sa CuK α zračenjem. Uzorci su snimljeni u području 2θ 5°–40° s korakom od 0.02°. Kut (2θ) se preračunava u razmak d preko Braggovog zakona:

$$n\lambda = 2 d \sin \theta \quad (4)$$

gdje je:

n = cijeli broj

λ = valna duljina

d = razmak između ravnina atoma

θ = Braggov kut

Veličina kristalita određena je Scherrerovom jednadžbom:

$$B(2\theta) = K \cdot \lambda / \beta \cos \theta \quad (5)$$

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

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

3.10. Izračunavanje mase i prinosa bakterijske celuloze

Nakon 11 dana fermentacije, plutajući gelovi celulozne 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 prema metodi Toda i sur.(1997). Oprani gelovi su uronjeni u 96 %-tni EtOH tijekom 2 sata, izvagani da bi se izmjerila masa vlažne celulozne biomase, i nakon toga stavljeni na sušenje u suhi sterilizator pri 50 °C/4 sata. Masa celulozne biomase (g) izračunata je prema slijedećoj formuli:

$$m_{cb} \text{ (g)} = m_{bt} - m_i \quad (6)$$

gdje je:

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

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

m_i = masa inokuluma (g)

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

$$Y_{cb} \text{ (\%)} = \frac{(\gamma \text{ vlažne biomase nakon fermentacije} - \gamma \text{ vlažnog inokuluma})}{(\gamma \text{ izvora C na početku fermentacije})} \cdot 100 \quad (7)$$

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

Kapacitet zadržavanja vode bakterijske celuloze određivan je nakon 11 dana fermentacije. Biomasa *kombuche* je iz prevrelih podloga izvađena pomoću plastične pincete, protresena da se ukloni višak tekućine i nakon toga izvagana. Nakon vaganja, celulozna biomasa je ostavljena da se pokrivena filter papirom suši na sobnoj temperaturi 48 h zbog uklanjanja slobodne vode, nakon čega je sušena 12 h pri 105°C u suhom sterilizatoru, kako bi se u potpunosti uklonila vezana voda. Kapacitet zadržavanja vode (WHC) je izračunat prema formuli:

$$\text{WHC (g/g)} = \text{masa vode uklonjena tijekom sušenja/suha tvar bakterijske celuloze} \quad (7)$$

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

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

3.13. Određivanje antimikrobnih svojstava bakterijske celuloze

Antimikrobna aktivnost inhibicija rasta odabranih test mikroorganizama *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas* sp. i *Vibrio cholerae* 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.

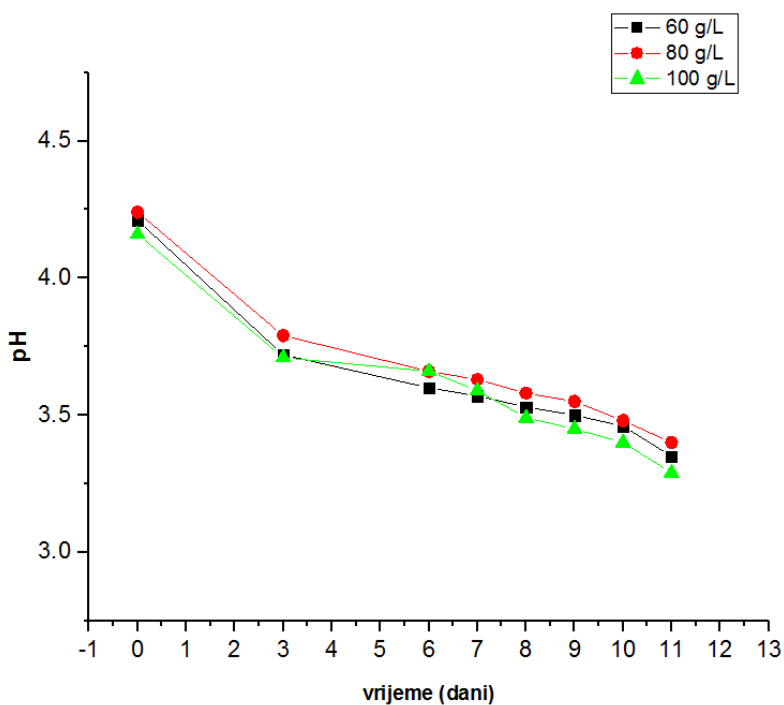
Na površinu čvrste hranjive podloge u Petrijevoj zdjelici, na koju je prethodno naciepljen test-mikroorganizam, postavljeni su diskovi sa određenim antimikrobnim agensom. Tijekom inkubacije spoj je difundirao radijalno iz diska u agar tvoreći gradijent koncentracije i ovisno

o njegovom 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 antimikroorganizmu. Svi pokusi su provedeni u trima paralelama, te je izračunata srednja vrijednost dobivenih rezultata.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Promjena pH vrijednosti

Fermentacija *kombucha* čaja rezultira brojnim biokemijskim reakcijama, a jedna od najizrazitijih je nastajanje organskih kiselina. Kao rezultat porasta koncentracije organskih kiselina, pH vrijednost zelenog čaja zaslađenog s različitim koncentracijama saharoze (60, 80 i 100 g/L) pada, tako da je u ovom radu pH vrijednost s početnih 4,16-4,24 do kraja istraživanja postupno pala na vrijednosti između 3,29 i 3,4 (Slika 6). Iz slike je vidljivo da su pH vrijednosti pri svim koncentracijama šećera imale vrlo ujednačen linearni pad. Prema Hwang i sur. (1999), konverzija glukoze u glukonsku kiselinu rezultira značajnim smanjenjem pH vrijednosti tijekom fermentacije. Nadalje, inokulacija majčinske kulture *kombuche*, s niskom pH vrijednošću u novu hranjivu podlogu, ne samo da osigurava brzi početak fermentacije (Sievers i sur., 1995), nego i štiti od moguće kontaminacije plijesnima i neželjenim mikroorganizmima (Greenwalt i sur., 2000). Ovi su autori zabilježili slične promjene u pH vrijednostima *kombuchom* fermentiranim čajevima kao i u ovom radu, koje su bile izraženije tijekom prvih 3-5 dana fermentacije, nakon čega se pH vrijednost nije značajnije mijenjala bez obzira na koncentraciju dodanog šećera.



Slika 6. Promjena pH vrijednosti tijekom 11 dana uzgoja *kombuche* u zelenom čaju

4.2. Etanol, octena i glukonska kiselina

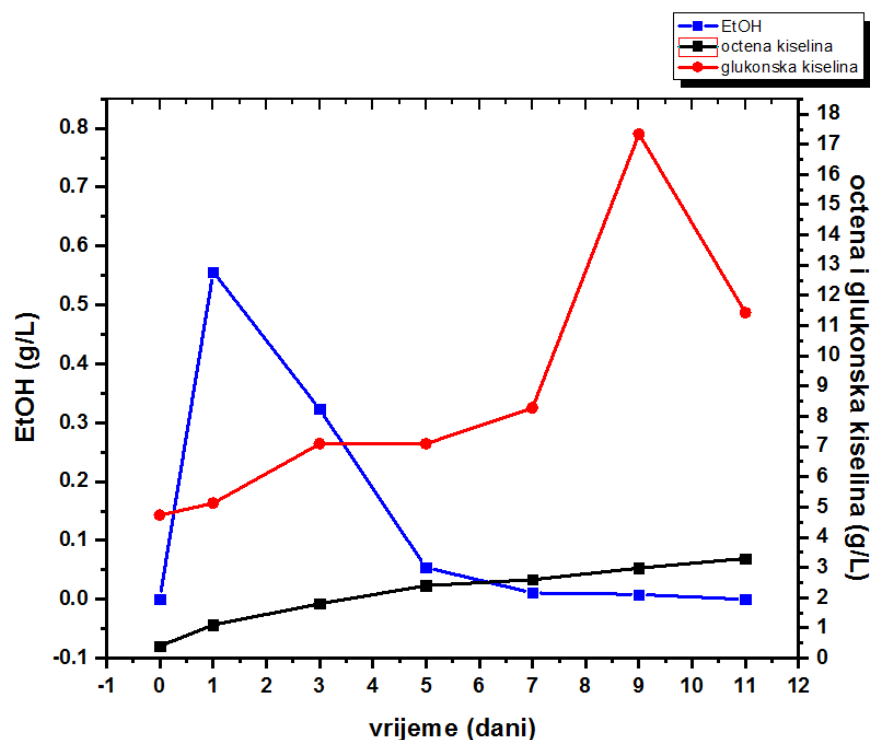
Kvasci i bakterije kao simbiotička kultura *kombuche* troše supstrat na različiti i komplementarni način. Invertaza iz kvasca hidrolizira saharozu do glukoze i fruktoze, pri čemu putem glikolize nastaje etanol, a bakterije octene kiseline koriste glukozu za proizvodnju glukonske kiseline, a etanol za proizvodnju octene kiseline (Dufresne i Farnworth, 2000).

Prema provedenim istraživanjima, 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 saharoze u crnom čaju. Reiss (1995) je ispitivao utjecaje različitih izvora ugljika (saharoza, laktoza, glukoza i fruktoza) na metabolizam *kombuche*, te uočio da koncentracija proizvedenog etanola ovisi o vrsti i koncentraciji dodanog šećera. U ovom radu je u zeleni čaj dodano 60, 80 i 100 g/L saharoze (konzumni bijeli šećer) i već nakon prvog dana fermentacije, kod svih je koncentracija dodanog šećera izmjerena maksimalna koncentracija etanola, 0,55 g/L, koja se u trećem danu smanjila na 0,33 g/L, a nakon toga je pala na manje od 0,05 g/L i posljednja četiri dana fermentacije iznosila 0,01 g/L (Slike 7-9), dok pri koncentraciji od 100 g/L šećera nakon šest dana fermentacije nije izmjerena prisutnost etanola (Slika 9).

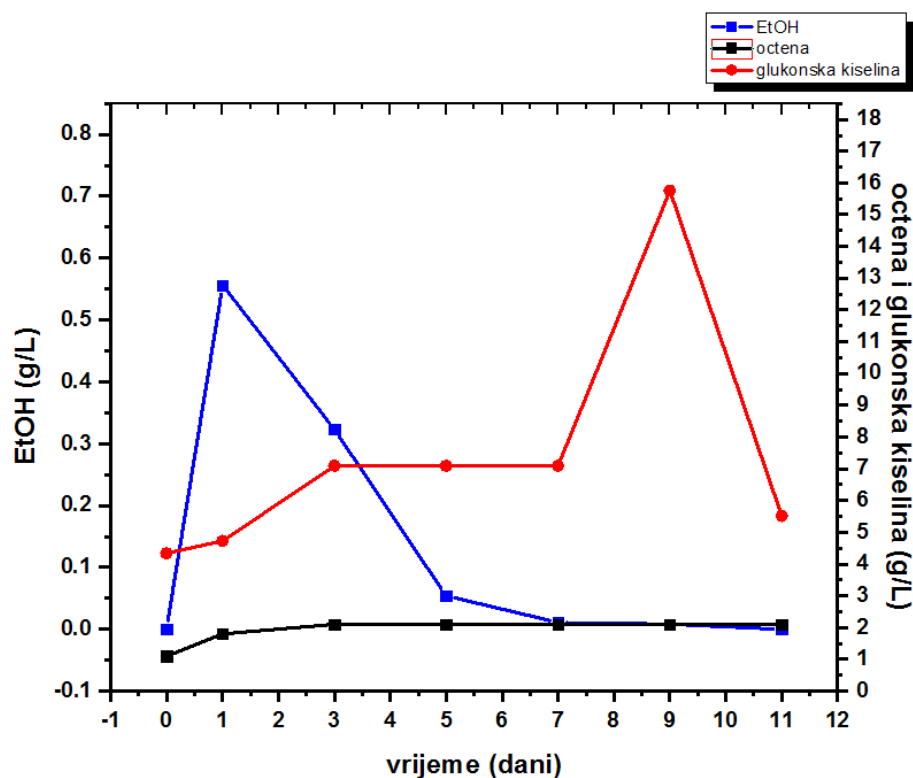
Usporedni prikaz nastajanja organskih kiselina tijekom fermentacije *kombuche* u zelenom čaju također je prikazan na Slikama 7-9. Najveći porast koncentracije octene kiseline uočen je pri 60 g/L šećera, gdje se vrijednost povećala s 0,5 g/L na početku istraživanja do 3,5 g/L na kraju fermentacije (Slika 7). Pri višoj koncentraciji šećera u istoj podlozi (80 g/L), od početne koncentracije 1,0 g/L koncentracija octene kiseline je porasla do 2,0 g/L (Slika 8), dok je pri najvišoj koncentraciji šećera (100 g/L) početna koncentracija iznosila 1,2 g/L, a konačna 2 g/L (Slika 9). Bakterije octene kiseline pokazuju visoku toleranciju na izrazito niske pH vrijednosti, koja je rijetka među aerobnim homotrofnim i heterotrofnim bakterijama. Ovo im svojstvo omogućava rast na hranjivoj podlozi koja već na početku uzgoja ima pH vrijednost nižu od 4,5 (Malbaša i sur., 2008).

Glukozu bakterije octene kiseline oksidiraju do glukonske kiseline, koja predstavlja drugu glavnu organsku kiselinu nastalu kao posljedica metabolizma *kombuche*. Kao što je vidljivo na Slikama 7-9, koncentracija glukonske kiseline tijekom fermentacije u zelenom čaju veća gotovo 10 puta od koncentracije octene kiseline, što je fermentiranom čaju dalo blago šećernu notu, a ne trpkost koju izazivaju veće koncentracije octene kiseline. Tijekom svih fermentacija zabilježen je blagi linearni rast do sedmog dana fermentacije, od 5,5 g/L do 8,5 i 11 g/L (60 i 100 g/L) i 4,8 g/L (80 g/L) na početku do 7,0 g/L. U svim je

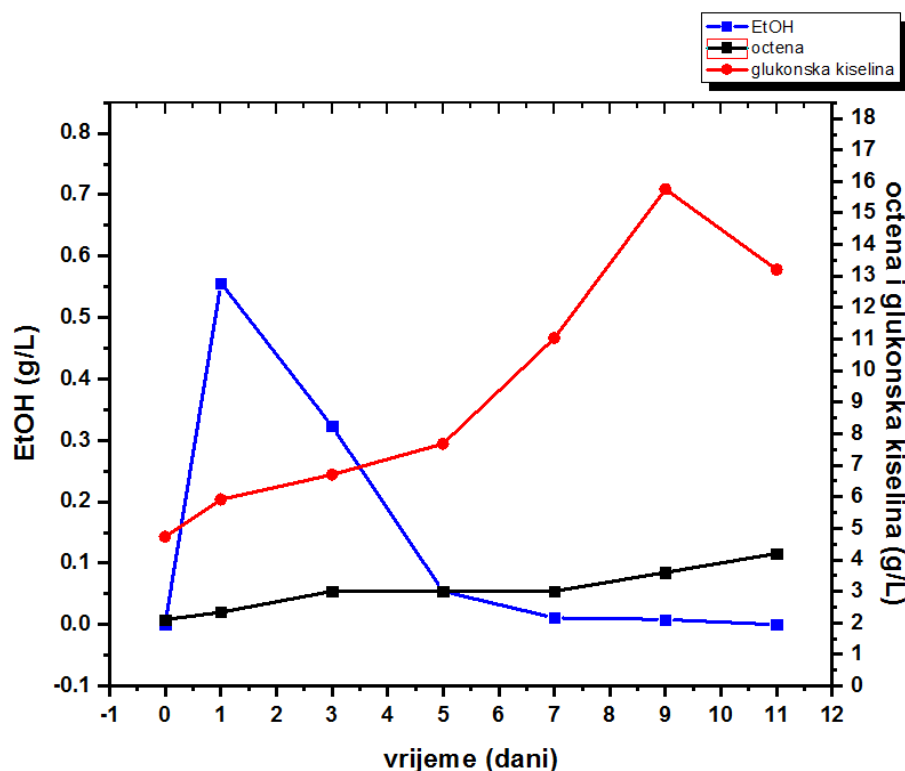
uzorcima uočen nagli rast koncentracije glukonske kiseline u devetom danu istraživanja pri čemu si vrijednosti iznosile 17,5 g/L (60 g/L) i 16 g/L (80 i 100 g/L) (Slike 7-9).



Slika 7. Kinetika nastajanja octene i glukonske kiseline, te etanola tijekom 11 dana uzgoja *kombuche* u zelenom čaju (60 g/L saharoze)



Slika 8. Kinetika nastajanja octene i glukonske kiseline, te etanola tijekom 11 dana uzgoja *kombuche* u zelenom čaju (80 g/L saharoze)



Slika 9. Kinetika nastajanja octene i glukonske kiseline, te etanola tijekom 11 dana uzgoja *kombuche* u zelenom čaju (100 g/L saharoze)

4.3. Sinteza bakterijske celuloze

Jedan od prvih okom vidljivih proizvoda biotransformacije zaslađenog čaja je celulozna opna koja se, svakodnevno, u obliku tankog sloja oblikuje po površini tekućine. Prinos biomase povezan je s izvorom ugljika i koncentracijom tog supstrata u hranjivoj podlozi. U ovom je radu, tijekom fermentacije čaja već nakon 24 h bilo vidljivo stvaranje prozirne opne na površini tekućine, koja je s vremenom fermentacije postala deblja i želatinoznija. Istraživanja Goh i sur. (2012), koji su pratili prinos biomase *kombuche* ovisno o koncentraciji šećera (od 50 do 250 g/L), pokazala su da se prinos biomase povećavao u uzorcima kojima je dodano do 90 g/L šećera (66.7 %), a nakon toga se naglo smanjivao, te je pri najvećoj koncentraciji od 250 g/L bio samo 9.9 %. U ovom radu, u čaju kojem je dodano 100 g/L saharoze postignut je najbolji prinos celulozne biomase (120.27 %), no važno je naglasiti da ni pri nižim koncentracijama šećera prinosi nisu bili značajno manji (104.02 i 113.68 %) (Tablica 2).

Tablica 2. Prinos bakterijske celuloze nakon 11 dana uzgoja u zelenom čaju

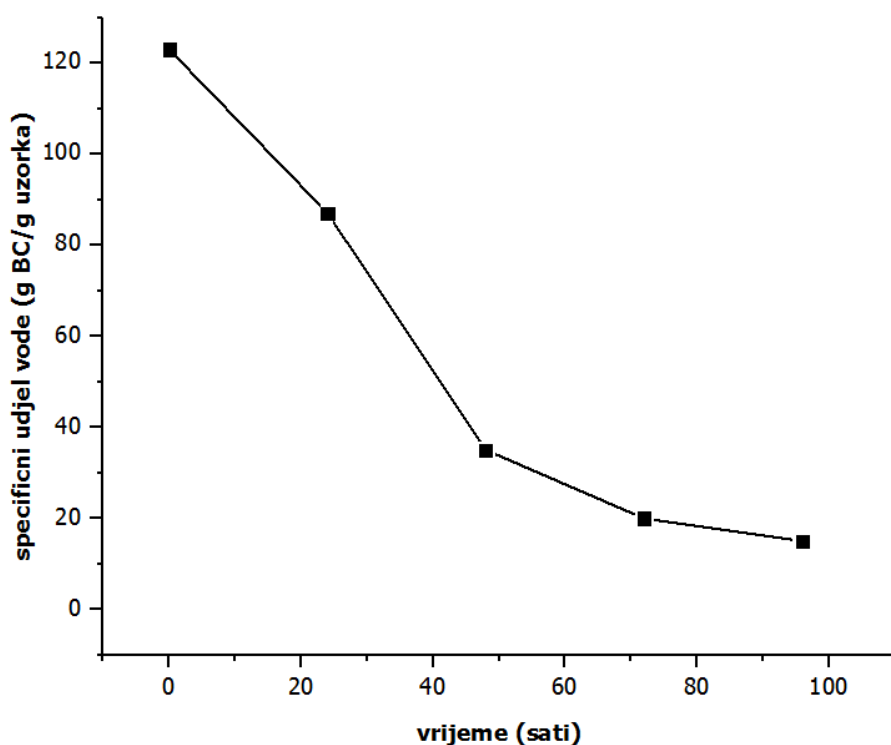
Koncentracija šećera	γ inokuluma (g/L)	γ celulozne biomase (g/L)	Prinos (%)
60 g/L	12.14	74.55	104.02
80 g/L	12.04	102.98	113.68
100 g/L	11.94	132.21	120.27

4.4. Kapacitet zadržavanja i otpuštanja vode

Kapacitet zadržavanja vode i brzina otpuštanja vode su najvažnija svojstva bakterijske celuloze kada se radi o biomedicinskoj primjeni. Odgovarajuća vlažnost bakterijske celuloze pojačava i ubrzava zarastanje rana i štiti od kontaminacija (Ul-Islam i sur., 2012).

Promjene u sposobnosti zadržavanja vode u uzorcima sintetizirane bakterijske celuloze rezultat su njihove razlike u površini i poroznosti strukture. Molekule vode su „zarobljene“ fizički i na površini i u unutrašnjosti matriksa bakterijske celuloze koji se sastoji od isprepletenih vlakana (Watanabe i sur., 1998). Što je više slobodnog prostora između vlakana, to će više molekula vode moći ući i adsorbirati se u matriksu. Dakle, što je veća specifična površina, više vode će se moći zadržati u matriksu bakterijske celuloze (Gu i Catchmark, 2012).

Rezultati istraživanja kapaciteta otpuštanja i zadržavanja vode provedenim u ovom radu prikazani su na Slici 10 i Tablici 3. Na Slici 10 vidljivo je da se specifični udjel vode linearno smanjuje tijekom 96 sati istraživanja, kao i da bakterijska celuloza zadržava skoro 30 % vode u svojoj strukturi nakon 48 sati.



Slika 10. Kinetika otpuštanja vode (WRR) tijekom 96 sati iz uzoraka bakterijske celuloze nakon 11 dana fermentacije u zelenom čaju (100 g/L)

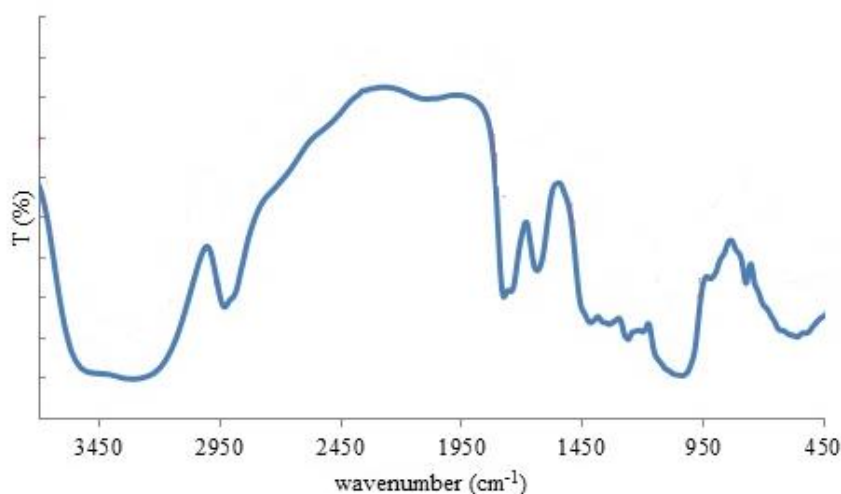
Tablica 3. Kapacitet zadržavanja vode bakterijske celuloze uzgojene u zelenom čaju

Uzorak	Masa suhe BC (g)	Specifična površina BC (cm ² /g)	WHC (g vode/g uzorka)
60 g/L	2,35	1,359	91,82
80 g/L	2,88	1,682	100,31
100 g/L	3,11	1,784	106,52

4.5. FT-IR spektroskopska analiza

Kemijska struktura bakterijske celuloze sintetizirane u zelenom čaju je određivana u infracrvenom spektru (IR). Spektar je pokazao apsorpcije na 1054 cm⁻¹ i 3400 cm⁻¹, područja istezanja karakteristična za R-OH veze. Apsorpcija oko 1400 cm⁻¹ ukazala je na škaraste vibracije koje su rezultat -CH veza. Apsorpcijski pik na 1643 cm⁻¹ je rezultat apsorpcije vode

u uzorku. Također je na Slici 11 vidljivo karakteristično područje istezanja ($960 - 730\text{ cm}^{-1}$), pri čemu pikovi kod $862,54\text{ cm}^{-1}$ mogu potvrditi prisutnost β -1,4-glikozidnih veza.



Slika 11. FT-IR spektar bakterijske celuloze sintetizirane u zelenom čaju nakon 11 dana uzgoja (100 g/L)

4.6. Difrakcija rentgenskih zraka

Analiza difrakcijom rendgenskim zrakama napravljena je sa ciljem usporedbe mikrostrukturnih promjena u uzorcima bakterijske celuloze fermentiranim u zelenom čaju s koncentracijom šećera 100 g/L. Cilj je bio provjeriti udjel amorfne i kristalinične strukture uzorka (Tablica 4, Slika 12).

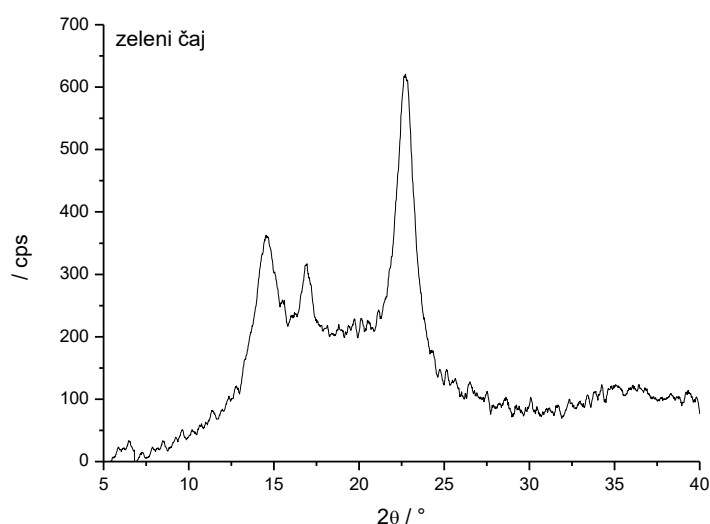
Difrakcija rendgenskim zrakama pokazala je da uzorak bakterijske celuloze iz zelenog čaja pokazuje manje ili više izražene difrakcijske maksimume karakteristične za celulozu, te amorfni halo (odstupanje od ravne bazne linije), što pokazuje da je celuloza razmjerno slabo kristalna. Razlike u među plošnim razmacima pripisuju se promjenama u omjeru I_{α} i I_{β} celuloze (Czaja i sur., 2004), no u ovom radu dolazi do primjetne promjene samo u položaju prvog maksimuma. Veličina kristalita određena Scherrerovom formulom je 7,8 nm, s iznimkom veličine određene iz srednjeg, najmanjeg maksimuma, kod kojega je i najveća pogreška određivanja zbog djelomičnog preklapanja s prvim maksimumom.

Tablica 4. Kristaliničnost uzoraka bakterijske celuloze uzgojene u zelenom čaju (100 g/L)

Uzorak	$d_1 / \text{\AA}$	$d_2 / \text{\AA}$	$d_3 / \text{\AA}$	$2\theta_2 - 2\theta_1 / ^\circ$	t_1 / nm	t_2 / nm	t_3 / nm
Zeleni čaj	6,11	5,25	3,92	2,38	7,8	15	7,6

d – međuplošni razmak u kristalnoj rešetki, u $\text{\AA}$ (10^{-10} m)

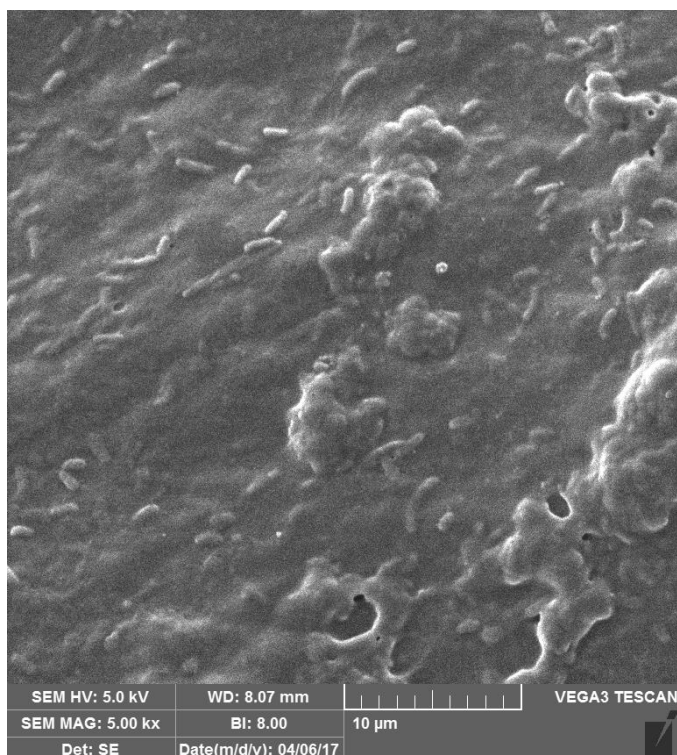
t – veličina kristalita određena Scherrerovom jednažbom



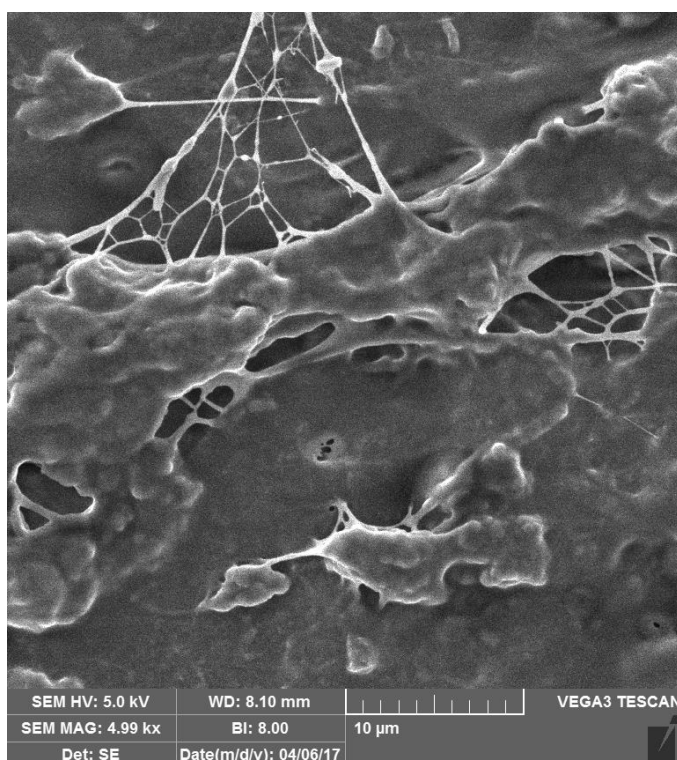
Slika 12. Difraktogram rentgenskih zraka bakterijske celuloze nakon 11 dana uzgoja u zelenom čaju (100 g/L šećera)

4.7. Pretražna elektronska mikroskopija

Površina i struktura mikrovlakana bakterijske celuloze snimane su pretražnim elektronskim mikroskopom (Slike 13 i 14). Na Slici 13 vidljive stanice bakterija i kvasaca na površini pelikule bakterijske celuloze, a na Slici 14 isprepletenost mikrovlakana sintetizirane celuloze.



Slika 13. SEM snimka površine bakterijske celuloze nakon 11 dana uzgoja u zelenom čaju (konc. šećera 100 g/L)



Slika 14. SEM snimka mreže mikrovlakana bakterijske celuloze nakon 11 dana uzgoja u zelenom čaju (100 g/L šećera)

4.8. Antimikrobno djelovanje

U ovom je radu antimikrobna aktivnost fermentiranog čaja *kombuche* ispitivana na četiri testna mikroorganizma, a to su bile bakterije vrsta *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* i roda *Pseudomonas* sp. Rezultati prikazani u Tablici 4 ukazuju na izvrsno antimikrobno djelovanje na bakteriju *E. coli*, vrlo dobro djelovanje na *S. typhimurium* i *Pseudomonas* sp., dok su u prisutnosti *V. cholerae* uočene izrazito male i zamućene zone inhibicije. Također je uočeno da je fermentirani zeleni čaj, pripremljen uz dodatak 80 g/L saharoze imao najveće antimikrobno djelovanje (Tablica 5).

Tablica 5. Antimikrobno djelovanje *kombucha* zelenog čaja fermentiranog dodatkom različitih koncentracija šećera

Koncentracija šećera (g/L)	<i>S. typhimurium</i>	<i>E.coli</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>V. cholerae</i>
zone inhibicije (mm)				
60	18	24	17	0*
80	23	33	21	0*
100	20	21	15	0*

*zamućena zona

5. ZAKLJUČCI

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Uzgoj *kombuche* proveden je u kompleksnoj podlozi (zeleni čaj) s dodatkom 60, 80 i 100g/L saharoze kao izvora ugljika.
2. U svim su istraživanim uzorcima pad pH vrijednosti i koncentracije etanola bili u pozitivnoj korelaciji s povećanjem koncentracije octene i glukonske kiseline.
3. Specifična površina, poroznost i ukupni volumen sintetizirane bakterijske celuloze rezultirali su izvrsnom sposobnošću apsorpcije i otpuštanja velike količine vode.
4. FT-IR spektroskopskom analizom je dokazana pretežito amorfna struktura bakterijske celuloze uzgojene u zelenom čaju pri svim koncentracijama dodanog šećera.
5. Antimikrobna aktivnost ispitivana je mjerenjem zona inhibicije rasta bakterija *S. typhimurium*, *E. coli*, *V. colerae* i *Pseudomonas* sp. Fermentirani zeleni čaj je pokazao izvrsnu antimikrobnu aktivnost prema tri bakterijske kulture, osim *V. colerae* čiji rast nije bio inhibiran.

6. LITERATURA

Antony, J.I.X., Shankaranaryana, M.L. (1997) Polyphenolsofgreentea. *International Food Ingredients* **5**: 47-50.

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

Blanc, P.J. (1996) Characterization of the tea fungus metabolites. *Biotechnology Letters* **18**: 139-142.

Brown, A.J. (1886a) XLIII.—On an acetic ferment which forms cellulose. *Journal of the Chemical Society, Transactions* **49**:432–439.

Campano, C., Balea, A., Blanco, A., Negro, C. (2015) Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review. Cellulose **23**: 1–35.

Chawla, P.R., Bajaj, I.B., Survase, S.A. and Singhal, R.S. (2009) Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. *Food Technology and Biotechnology* **47**: 107–124.

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

Chen, Y., Pane, A., Schüpbach, T. (2007). Cutoff and aubergine mutations result in retrotransposon upregulation and checkpoint activation in Drosophila, *Current Biology* **17(7)**: 637-642.

Choi, C.N., Song, H.J., Kim, M.J., Chang, M.H., Kim, S.J. (2009) Properties of bacterial cellulose produced in a pilot-scale spherical type bubble column bioreactor. *Korean Journal of Chemical Engineering* **26(1)**: 136–140.

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

Cvetković, D. (2008). Kombucha made from medical herbs - biological activity and fermentation, PhD Thesis, Faculty of Technology, University of Novi Sad.

Czaja, W., Romanovicz, D. and Brown, R.M. (2004) Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose* **11**: 403-411.

Czaja, W.K., Young, D.J., Kawecki, M. and Brown, R.M. (2007) The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules* **8(1)**: 1-12.

Diker, K.S., Hascelik, G. (1994) The bacterial activity of tea *against Helicobacter pylori*. *Letters in Applied Microbiology* **19**: 299-300.

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

Dufresne, A. (2013) Nanocellulose: *From nature to high performance tailored materials*. Walter de Gruyter, Berlin.

Ellis, B., Smith, R. (2008) Polymers: a property database. CRC Press, Boca Raton.

Frank, G.W. (1995). Das Teepilz Getrank, Ennsthaler Verlag , A-4402 Steyr. p. 15.

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. *International Food Research Journal* **19**: 109-117.

Gu, J. and Catchmark, J.M. (2012) Impact of hemicelluloses and pectin on sphere-like bacterial cellulose assembly. *Carbohydrate Polymers* **88**: 547-557.

Gu, J., Catchmark, J.M. (2012) Surface area and porosity of acid hydrolyzed cellulose nanowhiskers and cellulose production by *Gluconobacter xylinus*. *Carbohydrate Polymers* **87**: 1026-1037.

Gutman, R.L., Ryu, B.H. (1996) Rediscovering tea. An exploration of the scientific literature. *Herbal Gram* **37**: 33-48.

Greenwalt, C.J., Steinkraus, K.H. and R.A., Ledford (2000). Kombucha, the Fermented Tea: Microbiology, Composition, and Claimed Health Effects. *Journal of Food Protein* **63**: 976-981.

Hartmann, A.M., Burleson, L.E., Holmes, A.K. and C.R. Geist (2000). Effects of Chronic Kombucha Ingestion on Openfield Behaviors, Longevity, Appetitive Behaviors, and Organs in C57-BL/6 Mice: A Pilot Study, *Nutrition* **16**: 755–761.

Helenius, G., Backdahl, H., Bodin, A., Nannmark, U., Gatenholm, P. and Risberg, B. (2006) In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. *Journal of Biomedical Materials Research* **76A (2)**: 431–438.

Huang, L., Chen, X., Nguyen, TX., Tang, H., Zhang, L., Yang, G. (2014) Nano-cellulose 3D-networks as controlled-release drug carriers. *J. Mater Chem B* **1**:2976–2984 Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.P. and Bohn, A.,(2005) Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie International Edition* **44**: 3358–3393.

Huang, Y., Zhu, C., Yang, Y.-N., Chen, C., Sun, D. (2014) Recent advances in bacterial cellulose. *Cellulose* **21**: 1-30.

Hubbell, JA., (1995) Biomaterials in tissue engineering. *Nature Biotechnology* **13**:565–576.

Iguchi, M., Yamanaka, S., Budhiono, A. (2000) Bacterial cellulose — a masterpiece of nature's arts. *Journal of Mater Science* **35**: 261–270.

Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. (2008) Modern food microbiology. Springer, New York.

Kakuda, T., Takihara, T., Sakane, I., Mortelmans, K. (1994) Antimicrobial activity of tea extracts against perid on top athicbacteria. *Nippon Nogei. Kaishi (Journal of the Agricultural Chemical Societyof Japan)* **68**: 241-243.

Khan, T., Park, JK., Kwon, J-H., (2007) Functional biopolymers produced by biochemical technology considering applications in food engineering. *Korean Journal of Chemical Engineering* **24**:816–826.

Kaufman, K. (1995) Kombucha Rediscovered, A Guide to the Medicinal Benefits of an Ancient Healing Tea. *Alive Books, Canada*, pp. 45-46.

Kerstens, K., Lisdiyanti, P., Kowagata, K. and J. Swings (2006). The Family *Acetobacteraceae*: The *Genera* *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, and *Kozakia*. DOI: 10.1007/0-387-30745.

Kim, C.W., Kim, D.S., Kang, S.Y., Marquez, M., Joo, Y.L. (2006) Structural studies of electrospun cellulose nanofibers. *Polymer* **47(14)**: 5097–5107.

Klemm, D., Shumann, D., Udhardt, U. and Marsch, S. (2001) Bacterial synthesized cellulose . Artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science* **26**: 1561–1603.

Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.P., Bohn, A. (2005) Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie International Edition* **44**: 3358–3393.

Klemm, D., Schumann, D., Kramer, F., Heßler, N., Hornung, M., Schmauder, H.P., Marsch, S. (2006) Nanocelluloses as innovative polymers in research and application. *Advances in Polymer Science* **295**: 49–96.

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

Kurtzman, C.P., Robnett, C.J. and E. Basehoar Powers (2001). *Zigosaccharomyces kombuchaensis*, a new ascospore-forming yeast from 'Kombucha' tea **1**: 133-138.

Li, Y., Lin, M. L., & Davenport, J. W. (2011). Abinitio studies of cellulose I: crystal structure, inter molecular forces, and interaction with water. *Journal of Physical Chemistry C*. **115**: 11533-11539.

Lin, S.P., Calvar, I.L., Catchmark, J.M., Liu, J.R., Demirci, A., Cheng, K.C. (2011) Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. *Cellulose* **20**: 2191–2219.

Lin, Y.K., Chen, K.H., Ou, K. L. and Liu, M. (2011) Effects of different extracellular matrices and growth factor immobilization on biodegradability and biocompatibility of macroporous bacterial cellulose. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **265**: 508–518.

Lin, S.P., Calvar, I.L., Catchmark, J.M., Liu, J.R., Demirci, A., Cheng, K.C. (2013) Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. *Cellulose* **20**:2191–2219.

Lin, Y.C., Wey, Y.C., Lee, M.L., Lin, P.C. (2015) Cosmetic composition containing fragments of bacterial cellulose film and method for manufacturing thereof. US patent, US 20150216784 A1.

Lin, S.P., Liu, C.T., Hsu, K.D., Hung, Y.T., Shih, T.Y., Cheng, K.C. (2016) Production of bacterial cellulose with various additives in a PCS rotating disk bioreactor and its material property analysis. *Cellulose* **3**: 367–377.

Malbasa, R., Loncar, E., & Djuric, M. (2008) Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. *Food Chemistry* **106**: 1039-1045.

Millon, L., Wan, W. (2006) The polyvinyl alcohol bacterial cellulose system as a new nanocomposite for biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research B, Applied Biomaterials* **79**: 245–253.

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. *Medicinal Research Reviews* **17**: 327-365.

Murphy, O. (2001) Non polyol low digestible carbohydrates: Food applications and functional benefits. *British Journal of Nutrition* **85**: S47–S53.

Nasab, M. M., & Yousef, A. R. (2010). Investigation of physicochemical properties of the bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* from date syrup. *World Academy of Science, Engineering and Technology* **68**: 1248–1253.

Okiyama, A., Motoki, M., Yamanaka, S. (1992) Bacterial cellulose II. Processing of the gelatinous cellulose for food materials. *Food Hydrocoll* **6**: 479–487.

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).

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

Park, J.K., Khan, T., Jung, J.Y. (2014) Bacterial Cellulose. In: Phillips, G.O., Williams, P.A. (eds) *Handbook of hydrocolloids*. Woodhead Publishing Ltd., Abington, pp 724–739.

Phisalaphong, M., Chiaoprakobkij, N. (2012) Applications and products—nata de coco. In: Gama, M., Gatenholm, P., Klemm, D. (eds) *Bacterial nanocellulose: a sophisticated multifunctional material*. CRC Press, Boca Raton, pp 143– 156.

Petersen, N. and Gatenholm, P. (2011) Bacterial cellulose based materials and medical devices: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* **91(5)**: 1277–1286.

Reiss, J. (1995). Influence of Different Sugars on the Metabolism of the Tea Fungus. *Z. Lebensm Unters Forsch* **198**: 258- 261.

Pircher, N., Veigel, S., Aigner, N., Nedelec, J.M., Rosenau, T., Liebner, F. (2014) Reinforcement of bacterial cellulose aerogels with biocompatible polymers. *Carbohydrate Polymers* **111**: 505– 513.

Qiu, K., Netravali, A.N. (2014) A review of fabrication and applications of bacterial cellulose based nanocomposites. *Polymer Reviews* **54**:598–626.

Ratner, B.D., Bryant, S.J. (2004) Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annual Review of Biomedical Engineering* **6**:41–75.

Ross, P., Mayer, R. and Benziman, M. (1991) Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological Reviews* **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. *Agricultural Biological Chemistry, 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*. *Agricultural Biological Chemistry, Tokyo* **54**: 2925-2929.

Sakanaka, S., Aizawa, M., Kim, M., Yamamoto, T. (1996) Inhibitory effects of green tea polyphenols on growth and cellular adherence of an oral bacterium *Porphyromonas gingivalis*, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **60**: 745-749.

Saxena, I.M. and Brown, R.M. (2012) Cellulose biosynthesis current views and evolving concepts. *Annals of Botany* **96**: 9–21.

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 simple fed-batch cultivation strategy. *Carbohydrate Polymers* **82**: 173–180.

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

Shoichet, M.S. (2009) Polymer scaffolds for biomaterials applications. *Macromolecules* **43**: 581–591.

Stoica-Guzun, A., Stroescu, M., Tache, F., Zaharescu, T., Grosu, E. (2007) Effect of electron beam irradiation on bacterial cellulose membranes used as transdermal drug delivery systems. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B*. **265**:434–438.

Sulaeva, I., Henniges, U., Rosenau, T., Potthast, A. (2015) Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications. A review. *Biotechnology Advanced* **33**:1547–1571.

- Svensson, A., Nicklasson, E., Harrah, T., Panilaitis, B., Kaplan, D., Brittberg, M., Gatenholm, P. (2005) Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials* **26**: 419–431.
- Teoh, A.L., Heard, G., Cox, J. (2004) Yeast ecology of kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology* **95**: 119-126.
- Toda, M., Okubo, S., Hiyoshi, R., Tadakatsu, S. (1989) The bacterical activity of tea and coffee. *Letters in Applied Microbiology* **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. *Journal of Applied Bacteriology* **70**: 109-112.
- Toda, K., Asakura, T., Fukaya M., Entani, E. and Kawamura, Y.(1997) Cellulose production by acetic acid-resistant *Acetobacter xylinum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **84**: 228–231.
- Shoichet, M.S. (2009) Polymer scaffolds for biomaterials applications. *Macromolecules* **43**: 581–591.
- Sievers, M., Lanini, C., Weber, A., Schuler-Schmid, U. and M. Teuber (1995). Microbiology and Fermentation Balance in Kombucha Beverage Obtained from a Tea Fungus Fermentation. *Systematic and Applied Microbiology* **18**: 590-594.
- Siro', I., Plackett, D. (2010) Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. *Cellulose* **17**: 459–494.
- Stephens, R.S., Westland, J.A., Neogi, A.N. (1990) Method of using bacterial cellulose as a dietary fiber component. US patent, US 4960763 A.
- Ul-Islam, M., Khan, T. and Park, J.K. (2012) Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification. *Carbohydrate Polymers* **88**: 596–603.

Ullah, H., Wahid, F., Santos, H.A., Khan, T. (2014) Advances in biomedical and pharmaceutical applications of functional bacterial cellulose-based nanocomposites. *Carbohydrate Polymers* **150**: 330-352.

Vandamme, E.J., De Baets, S., Vanbaelen, A., Joris, K. and De Wulf, P. (1998) Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polymer Degradation and Stability* **59**: 93–99.

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

Wu, S.C., Lia, Y.K. (2007) Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B Enzym* **54**:103–108.

Yadav, V., Paniliatis, B.J., Shi, H., Lee, K., Cebe, P., Kaplan, D.L. (2010) Novel in vivo degradable cellulose chitin copolymer from metabolically engineered *Gluconacetobacter xylinus*. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 6257–6265.

Yang, C.S., Wang, Z.Y. (1993) Tea and cancer: review *Journal of National Cancer Institute* **85**: 1038-1049.

Izjava o izvornosti

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

Ana Besednik

ime i prezime studenta