

# Biosinteza bakterijske celuloze pomoću združene kulture osmofilnih kvasaca i bakterija octene kiseline

---

Herceg, Filip

Master's thesis / Diplomski 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:159:446791>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2017.

Filip Herceg, 868/BPI

**BIOSINTEZA BAKTERIJSKE  
CELULOZE POMOĆU ZDRUŽENE  
KULTURE OSMOFILNIH  
KVASACA I BAKTERIJA OCTENE  
KISELINE**

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

*Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Sunčici Beluhan, na mogućnosti da izradim ovaj diplomski rad te na mnogobrojnim savjetima i pomoći tijekom izvođenja eksperimenata i prilikom pisanja diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se svojim roditeljima, braći i Ines na podršci koju su mi pružali tijekom studiranja.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za Biokemijsko inženjerstvo

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

### Biosinteza bakterijske celuloze pomoću združene kulture osmofilnih kvasaca i bakterija octene kiseline

*Filip Herceg, 868/BPI*

**Sažetak:** Bakterijska celuloza (BC), koju proizvodi združena kultura kvasaca i bakterija, je nova alternativa polimerima fosilnog podrijetla. U ovom radu, BC proizvedena pomoću *kombuche* je analizirana i karakterizirana nakon 14 dana fermentacije. Praćena je proizvodnja organskih kiselina (octena i glukonska), etanola i BC u čaju od ribiza zaslađenim saharozom (60 do 120 g/L) te Hestrin-Schramm (HS) podlozi s glukozom, maltozom, fruktozom (1-5 % tež/vol) ili glicerolom (1-5 % vol/vol) kao izvorom ugljika. Najveći prinos je postignut korištenjem saharoze i glukoze, 300 g/L odnosno 151 g/L. Debljina i prinos BC se povećala tijekom fermentacije te s porastom površine i dubinom hranjivog medija. Uzorci su analizirani FT-IR spektroskopijom te je utvrđeno da svi uzorci pokazuju veći postotak kristaliničnosti. Uočena je antimikrobna aktivnost u odnosu na *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas* sp., a *Vibrio cholerae* nije bio inhibiran djelovanjem združene kulture *kombucha*.

**Ključne riječi:** bakterijska celuloza, organske kiseline, kristaliničnost, antimikrobna aktivnost

**Rad sadrži:** 70 stranica, 30 slika, 4 tablica, 133 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

#### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

**Datum obrane:** 14. srpnja, 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

### **Biosynthesis of bacterial cellulose assisted by symbiosis of osmophilic yeast and acetic acid bacteria**

*Filip Herceg, 868 /BPI*

**Abstract:** Bacterial cellulose (BC), which is produced by a symbiotic culture of yeast and bacteria, is a new alternative to conventional polymers based on petroleum. In this study, BC produced from *kombucha* was analysed and characterized by employing FT-IR and SEM after 14 days of fermentation. The production of organic acids (acetic and gluconic), ethanol and BC in currant tea sweetened with sucrose (60 to 120 g/L) and Hestrin-Schramm (HS) based media containing glucose, maltose, fructose (1-5 % w/v) or glycerol (1-5 % v/v) as carbon sources was studied. The highest BC yield was obtained using sucrose and glucose, 300 g/l and 151 g/L, respectively. The thickness and yield of BC increased with fermentation time and correspondingly with the increase of surface area and depth of media. Analyzing samples by FT-IR spectroscopy, it was detected that all samples had a higher percentage of crystallinity. Antimicrobial activity was observed tested against *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas* sp., but *Vibrio cholerae* was not inhibited by *kombucha*.

**Keywords:** *bacterial cellulose, organic acids, crystallinity, antimicrobial activity*

**Thesis contains:** 70 pages, 30 figures, 4 tables, 133 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** *Suncica Beluhan, Associate professor*

**Reviewers:**

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

**Thesis defended:** 14<sup>th</sup> July, 2017

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
2.1. INFUZIJA I FERMENTACIJA PODLOGE S INOKULUMOM ( <i>KOMBUCHOM</i> ) .....	3
2.2. MIKROBIOLOŠKI SASTAV <i>KOMBUCHE</i> .....	4
2.3. BLAGOTVORNI UČINCI <i>KOMBUCHE</i> .....	5
2.3.1. Kemijski sastav.....	5
2.3.2. Biološka aktivnost .....	7
2.3.2.1. <i>Antimikrobna aktivnost kombuche</i> .....	7
2.4. BAKTERIJSKA CELULOZA .....	8
2.4.1. Struktura bakterijske celuloze .....	9
2.6. STRUKTURA FIBRILA BAKTERIJSKE CELULOZE.....	12
2.7. BIOSINTEZA BAKTERIJSKE CELULOZE .....	13
2.8. UZGOJ BAKTERIJSKE CELULOZE.....	15
2.8.1. Optimiranje proizvodnje bakterijske celuloze .....	17
2.8.2. Biosinteza celuloze iz različitih izvora ugljika .....	18
2.8.3. Reaktivnost bakterijske celuloze .....	19
2.9. PRIMJENA BAKTERIJSKE CELULOZE .....	20
2.9.1. Biomedicina.....	20
2.9.2. Prehrambena industrija .....	22
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>24</b>
3.1. TIJEK ISTRAŽIVANJA .....	24
3.2. MATERIJALI I METODE RADA .....	25
3.2.1. Priprava kulture kombuche.....	25
3.2.2. Vrsta korištenog čaja .....	25
3.2.3. Priprava kompleksne podloge (fermentirani čaj).....	25
3.2.4. Kemijski definirane podloge .....	25
3.2.5. Određivanje pH vrijednosti .....	26
3.2.6. Određivanje koncentracije octene kiseline .....	26
3.2.7. Određivanje koncentracije glukonske kiseline .....	27
3.2.8. Određivanje alkohola kemijskom metodom.....	27
3.2.9. Izračunavanje mase i prinosa celulozne biomase kombuche.....	28
3.2.10. Određivanje utjecaja površine i dubine hranjive podloge na kinetiku sinteze bakterijske celuloze	29
3.2.11. Određivanje kapaciteta zadržavanja vode (eng. Water-Holding Capacity; WHC).....	29
3.2.12. Određivanje brzine otpuštanja vode (eng. Water-Release Rate; WRR) .....	30
3.2.13. FT-IR spektroskopija.....	30
3.2.14. Pretražna elektronska mikroskopija (eng. Scanning Electron Microscopy; SEM).....	30
3.2.15. Određivanje kristaliničnosti bakterijske celuloze (jodni broj).....	30
3.2.16. Određivanje antimikrobne aktivnosti kombucha čaja .....	31



<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>32</b>
4.1. ORGANSKE KISELINE I ETANOL .....	33
4.1.1. Kompleksna podloga - čaj .....	33
4.1.2. Kemijski definirane podloge .....	38
4.2. SINTEZA BAKTERIJSKE CELULOZE.....	43
4.3. UTJECAJ POVRŠINE I DUBINE HRANJIVE PODLOGE NA PROIZVODNJU BAKTERIJSKE CELULOZE.....	45
4.4. UTJECAJ POVRŠINE BAKTERIJSKE CELULOZE NA KAPACITET ZADRŽAVANJA I BRZINU OTPUŠTANJA VODE..	50
4.5. KRISTALINIČNOST I MORFOLOGIJA POVRŠINE BAKTERIJSKE CELULOZE .....	52
4.6. FT-IR SPEKTROSKOPSKA ANALIZA .....	53
4.7. ANTIMIKROBNO DJELOVANJE <i>KOMBUCHA</i> ČAJA OD CRNOG RIBIZA .....	54
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>56</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>57</b>

## **1. UVOD**

Biomaterijali imaju važnu i vitalnu ulogu u svakodnevnom životu (Czaja i sur., 2007; Ratner i Bryant, 2004; Shoichet, 2009). Biopolimeri sve više dobivaju na važnosti u prehrambenoj industriji, kao i u medicini (Ellis i Smith, 2008; Murphy, 2001; Jay i sur., 2005). Celuloza je najzastupljeniji biopolimer na zemlji s godišnjom proizvodnjom od  $1,5 \cdot 10^{12}$  tona (Czaja i sur., 2004; Klemm i sur., 2005) i uglavnom se dobiva obradom biljne biomase (Siró i Plackett, 2010).

Bakterijska celuloza (BC) je višenamjenski biopolimer, koji posjeduje specifično visoki stupanj poroznosti, relativno visoku propusnost za tekućine i plinove, izrazito visoku sposobnost upijanja vode, čvrstoću strukture i ultrafinu mrežnu strukturu (Ullah i sur., 2016).

*Kombucha* je nutritivno vrijedni fermentirani tradicionalni napitak koji se konzumira za poboljšanje zdravstvenog stanja jer su rezultati istraživanja pokazali da pomaže pri određenim zdravstvenim tegobama, kao što su artritis, različiti tipovi karcinoma te bolesti jetre (Sreeramulu i sur., 2000; Pauline i sur., 2001; Hiremath i sur., 2002). Tradicionalno se proizvodi s crnim ili zelenim čajem zaslađenim saharozom u koji je, kao starter kultura, nacijepljena združena, odnosno simbiotička kultura bakterija octene kiseline i raznih vrsta osmofilnih kvasaca, a fermentacija traje 10-14 dana (Teoh i sur., 2004). Napitak dobiven fermentacijom je, ovisno o koncentraciji dodanog šećera, osvježavajuće slatkast, blago kiselkast, ovisno vrsti čaja lagano pjenušav poput jabukovače, a zbog njegovih nutritivnih, bioloških i ekoloških vrijednosti, preporučuje se svakodnevna konzumacija u malim količinama (Blanc, 1996). Smatra se da je prvi put proizveden u Kini, no *kombucha* se danas na tradicionalni način proizvodi u mnogim kućanstvima diljem Europe, Sjeverne Amerike i sjeverne Afrike. U posljednje vrijeme se u razvijenim zemljama povećala zainteresiranost za ovim napitkom, što je prepoznala i prehrambena industrija, pa se u trgovinama zdrave hrane mogu naći komercijalni proizvodi novije generacije (Malbaša i sur., 2008).

Tijekom fermentacije, bakterije i kvasci metaboliziraju ugljikohidrat do različitih organskih kiselina, octene i glukonske u većim koncentracijama, a koncentracije glukuronske, mliječne i limunske ne prelaze 1 g/L (Jayabalan i sur., 2007). Na površini podloge se svakodnevno sintetizira tanki sloj plutajuće pelikule (opne), odnosno bakterijska celuloza koja s vremenom fermentacije dobiva na volumenu i površini (Chen i Liu, 2000). Bakterijska celuloza ima širok raspon primjena u biomedicini i prehrani zbog visoke čistoće i jedinstvenih fizikalno-kemijskih svojstava (Dufresne i Farnworth, 2000). U prehrambenoj industriji, bakterijska celuloza se koristi u proizvodnji hrane, dijetalnih vlakna, kao sredstvo za zgušnjavanje i stabilizaciju te za povezivanje različitih vrsta proizvoda (Okiyama i sur., 1993).

U ovom radu su istraživane biokemijske promjene koje su posljedica biotransformacije simbiotski združene kulture bakterija octene kiseline i kvasaca (*kombucha*) tijekom 14 dana uzgoja u kompleksnoj (čaj od crnog ribiza) i više vrsta kemijski definiranih podloga s različitim izvorima ugljika (ugljikohidrata i alkohola). U kompleksnoj podlozi glavni izvor ugljika bila je saharoza dodana u različitim koncentracijama (60, 80, 100 i 120 g/L), dok su u kemijski definiranim podlogama izvori ugljika bile različite koncentracije glukoze, fruktoze i maltoze (1-5% tež/vol), te glicerola (1-5 % vol/vol). Tijekom fermentacija praćeni su i određivani sljedeći parametri:

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

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. Infuzija i fermentacija podloge s inokulumom (*kombuchom*)

U rod *Camellia* (čajevac) ubrajamo oko 50 vrsta trajno zelenog tropskog i suptropskog grmlja, odnosno nižeg drveća, od kojeg su najznačajniji kineski čajevac (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) i indijski čajevac (*Camellia sinensis* var. *assamica*) (Hara i sur., 1995). *Camellia sinensis* uspijeva rasti u brojnim krajevima svijeta i uzgaja se u 52 države, no podrijetlo joj je u jugoistočnoj Aziji, oko granice Indije, Burme i Kine. Kinezi, konkretno stanovnici provincije Junan, smatraju čajevac svojom biljkom te sebi pripisuju izum čajnog napitka, odnosno otkriće da je vruća voda s lišćem čaja pogodna za piće. Iako se uzgaja u tropskim predjelima cijelog svijeta, najznačajniji proizvođači čaja i dalje ostaju Kina, Indija, Šri Lanka i Japan (Jayabalan i sur., 2007).

*Kombucha* se tradicionalno proizvodi zaslađivanjem infuzije crnog ili zelenog čaja konzumnim šećerom (50 – 100 g/L). Infuzija se priprema tako da se čajni listići dodaju u kipuću vodu i ekstrahiraju do maksimalno 15 minuta kako se ne bi izgubila nutritivna svojstva čaja. Pripravljeni čaj se profiltrira, prelije u steriliziranu staklenu posudu sa širokim otvorom i pusti da se ohladi na sobnu temperaturu. Nakon toga se zakiseljava dodatkom octene kiseline ili već pripravljenim *kombucha* napitkom (1 % vol/vol) te mu se pažljivo doda „čajna gljiva“, što je, u stvari, matična kultura *kombuche* (inokulum) iz prethodnog uzgoja. Posuda se pokriva gazom ili bilo kakvom čistom i prozračnom pamučnom tkaninom te brzo zatvara. Optimalna temperatura je od 20 do 30 °C, a trajanje fermentacije je od 2 do 8 tjedana.

Tijekom fermentacije, mikrobnna kultura *kombuche* sintetizira bakterijsku celulozu u obliku tankih opni (pelikula) na površini čaja. Po završetku fermentacije, bakterijska celuloza *kombuche* ili čajna gljiva se pažljivo uklanja s površine i skladišti pri +4 °C u malom volumenu fermentiranog čaja do nove inokulacije. Fermentirani čaj se mora procijediti jer su uvijek prisutne tanke niti majčinske kulture. Skladišti se u hladnjaku pri +4 °C. Okus *kombuche* se mijenja tijekom fermentacije od ugodno voćno kiselkasto pjenušavog okusa nakon par dana, do srednje octenog okusa nakon duže inkubacije (Blanc, 1996).

## 2.2. Mikrobiološki sastav *kombuche*

*Kombucha* je združena kultura bakterija i osmofilnih kvasaca. Među bakterijama se najviše ističu bakterije iz roda *Acetobacter*. *Acetobacter* je rod bakterija octene kiseline koje nemaju sposobnost fotosinteze, ali mogu metabolizirati glukozu, glicerol, octenu kiselinu te ostale organske supstrate koje zatim konvertiraju u celulozu (Montezinos i Brown, 1976; Son i sur., 2001). Za razliku od celuloze izolirane iz drva, celuloza proizvedena pomoću bakterija iz roda *Acetobacter* u svojoj strukturi nema dodatnih makromolekula poput polisaharida pa je njeno izdvajanje i pročišćavanje jednostavan proces. Osim toga, ekološki problemi zbog nusproizvoda pri izolaciji celuloze iz drva potiču razvoj do sada neistraženih izvora celuloze (Colvin, 1980). Vrlo malo rodova bakterija octene kiseline ima mogućnost sinteze celuloze, a osim onih iz roda *Acetobacter*, celulozu može proizvoditi i Gram negativna bakterija *Gluconacetobacter xylinus* (poznata i kao *Acetobacter xylinum*). Ta bakterija može lučiti celulozu u obliku mikrofibrila (Ross i sur., 1991; Tanaka i sur., 2000), koji međusobno tvore golemu vrpce celuloze u hranjivoj podlozi. Takve vrpce su povezane sa stanicama te vise s plutajućeg biofilma (pelikule) što omogućuje rast aerobnih bakterija na površini hranjive podloge. Prilikom kontakta s biljnim stanicama, bakterija *Agrobacterium tumefaciens* luči celulozne fibrile sa svih strana stanice. Time se veže na stanicu i uzrokuje virulenciju (Matthysse i sur., 1995). *Gluconacetobacter xylinus* i *Agrobacterium tumefaciens* se mogu uzgajati da dosegnu velike količine biomase te se mogu transformirati. Geni i enzimi koji sudjeluju u biosintezi celuloze su identificirani pomoću transformiranih mutanata koji ne mogu proizvesti celulozu. Alge koje proizvode celulozu su se pokazale korisnim u istraživanjima pomoću „freeze-fracture“ elektronske mikroskopije. U tim istraživanjima su se kompleksi za sintezu celuloze u plazminoj membrani vizualizirali, ali se nisu mogli istražiti na biokemijskoj i molekularnoj razini (Montezinos i Brown, 1976). Provedene su i analize celuloze iz algi u smislu proučavanja alomorfizma (Koyama i sur., 1997). Plijesan *Dictyostelium discoideum* može sintetizirati celulozu u više faza svog životnog ciklusa. Utvrđeno je da ovaj organizam ima aktivnu celuloza sintazu (Blanton i Northcote, 1990) pa se može koristiti u razvojnim istraživanjima za biosintezu celuloze. Pamučna vlakna kod viših biljaka su interesantan predmet istraživanja (Ryser, 1985). To su stanice koje se izdužuju izvan epidermalnog sloja zametka. Ne postoji eksperimentalni dokaz da se biosinteza bakterijske celuloze razlikuje od biosinteze biljne celuloze. Međutim, poznato je da je za biosintezu bakterijske celuloze je potrebna uridin-difosfoglukoza kao intermedijer, dok je za biosintezu biljne celuloze potrebna gvanidin-difosfoglukoza (Colvin, 1980). Dobar model za

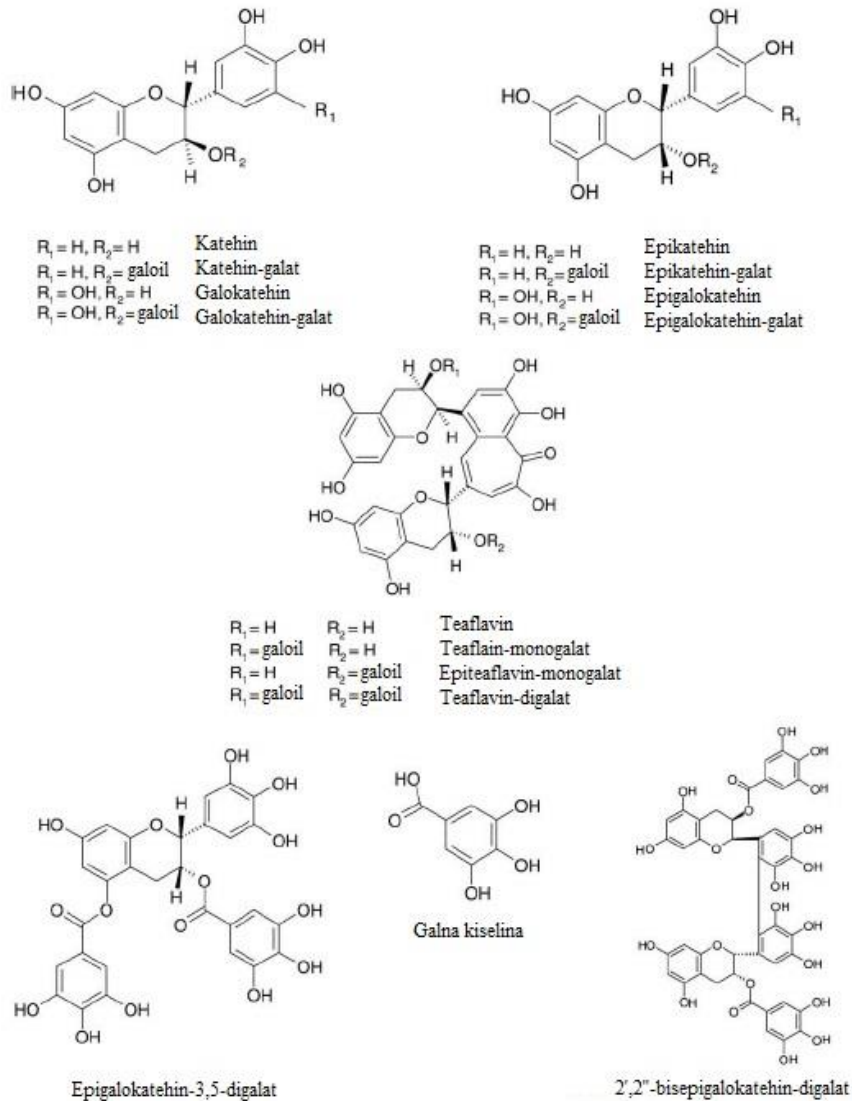
istraživanje mehanizma biogeneze celuloze je bakterija *Gluconacetobacter xylinus*, koja proizvodi čistu celulozu kao ekstracelularni produkt.

## **2.3. Blagotvorni učinci *kombuche***

### **2.3.1. Kemijski sastav**

Listići čaja su vrlo dobar izvor polifenolnih sastojaka (25-35 % suhe tvari) (Balentine i sur., 1997). U zelenom čaju flavonoidi i fenolne kiseline čine do 30 % suhe tvari, dok ih crni čaj sadži samo 10 % (Yang i Wang, 1993). Ovi sastojci se nazivaju bioflavonoidima ili vitaminom P i imaju širok spektar bioloških učinaka na žive organizme (Dreosti i sur., 1997). Najvažnije polifenolne grupe u čaju su flavan-3-oli ili katehini (Balentine i sur., 1997). Važni i karakteristični polifenoli čaja su flavanoli od kojih su dominantni katehini (flavan-3-oli), a glavni katehini su: (-)-epikatehin, (-)-epikatehin galat, (-)-epigalokahetin, (-)-epigalokahetin galat, (+)-katehin i (+)-galokatehin (Hara i sur., 1995). Ovi spojevi doprinose i gorčini i okusu slatkoće čajeva nakon konzumacije (Hara i sur., 1995). Čaj također sadrži flavonole, uglavnom kvercetin, kempferol, miricetin i njihove glikozide. U crnom čaju, oksidacija polifenola tijekom obrade dovodi do formiranja kompleksa katehina i galne kiseline kao što su teaflavini, teaflavinske kiseline, teaarubigini ili teasinensini i polimere proantocijanidina (Balentine i sur., 1997; Hara i sur., 1995d). Metilksantini su prisutni kao kofein (2-4 %) i mali udjel teofilina i teobromina (Hara i sur., 1995) (Slika 1).





**Slika 1.** Kemijske strukture glavnih sastojaka čaja (Dufresne i Farnworth, 2000).

Čaj također sadrži puno aminokiselina, a teanin, specifičan za biljku čajevac, čini 50 % svih aminokiselina. Razgradnja aminokiselina utječe na stvaranje, odnosno oblikovanje arome čaja (Balentine i sur., 1997). Klorofil, karotenoidi, lipidi i hlapljivi spojevi nisu glavni sastojci infuzije čaja, ali također imaju važnu ulogu u razvoju arome (Hara i sur., 1995). Hlapljivi sastojci listova čaja su detaljno proučavani i izolirano je čak 600 različitih molekula (Hara i sur., 1995; Shimoda i sur., 1995) koje uključuju terpenoide i produkte razgradnje aminokiselina, karotenoide i linolnu kiselinu (Hara i sur., 1995). Čaj također sadrži ugljikohidrate, vitamine A, E, K, male količine vitamina B i vitamina C (samo u zelenom

čaju). Također sadrži zadovoljavajuće količine kalija, mangana, te ione fluora (Hara i sur., 1995).

### 2.3.2. Biološka aktivnost

Iako se *kombucha* konzumira u mnogim zemljama već desetljećima, a ponegdje stoljećima i tisućljećima, tek se posljednjih tri desetljeća znanstvena zajednica zainteresirala za istraživanja blagotvornih učinaka biološki aktivnih supstancija u tom napitku. Mnogi ljudi diljem svijeta koji konzumiraju *kombucha* čaj tvrde da taj čaj ima mnogo pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje. Međutim, većina je blagotvornih učinaka proučavana samo anegdotalno te nema dovoljno znanstvenih dokaza koji se temelje na kliničkim istraživanjima na ljudima.

Učinci *kombuche* prema rezultatima znanstvenih istraživanja su sljedeći: detoksikacija krvi, smanjenje razine kolesterola, smanjenje ateroskleroze regeneracijom staničnih stijenki, smanjenje krvnog tlaka, smanjenje upalnih problema, ublažavanje artritisa, reume i simptoma gihta, poboljšanje funkcije jetre, normaliziranje crijevne aktivnosti, uravnoteženje crijevne flore, liječenje hemoroida, smanjenje pretilosti i reguliranje apetita, sprječavanje i liječenje infekcije mjehura i smanjenje kalcifikacije bubrega, poticanje endokrinog sustava, zaštita od dijabetesa, antikancerogeno djelovanje, antimikrobno djelovanje protiv bakterija, virusa i kvasaca, poboljšavanje imunološkog sustava i stimuliranje proizvodnje interferona, olakšavanje bronhitisa i astme, smanjenje menstrualnih poremećaja i olakšavanje menopauze, poboljšavanje zdravlja kose, kože i noktiju, smanjivanje želje alkoholičara za alkoholom, smanjenje stresa i živčanih poremećaja i nesаницe, ublažavanje glavobolje, poboljšanje vida, usporavanje starenja, te poboljšanje općeg stanja metabolizma (Dufresne i Farnworth, 2000). Nekoliko epidemioloških istraživanja na životinjama i *in vitro* istraživanja doveli su do zaključka da čaj ima pozitivan utjecaj na mnoga zdravstvena stanja.

#### 2.3.2.1. Antimikrobna aktivnost kombuche

Katehini zelenog čaja pokazali su antibakterijsku aktivnost protiv Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija koje mogu biti patogene za čovjeka. Ekstrakti čaja inhibiraju enterobakterije: *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*

*jujuni* i *C. coli* (Diker i sur., 1991), 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, 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). 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 gripe A i B grupe u životinjskim staničnim kulturama. Antivirusna aktivnost dokazana je protiv enzima HIV virusa i protiv rotavirusa i enterovirusa u staničnim kulturama majmuna koji su prethodno tretirani s EGCG (Mitscher i sur., 1997).

## **2.4. Bakterijska celuloza**

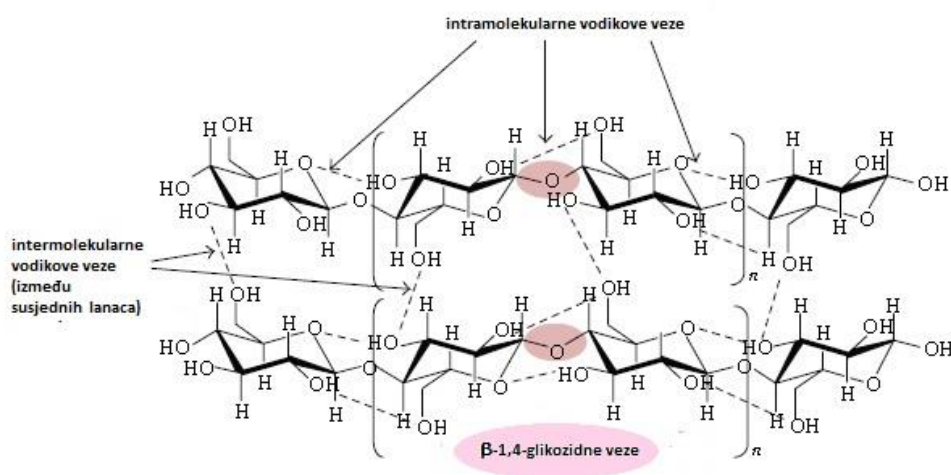
Celuloza je najrašireniji biopolimer na svijetu, glavni je sastojak biljne biomase, ali i predstavnik mikrobnih ekstracelularnih polimera. Bakterijska celuloza (BC) pripada proizvodima primarnog metabolizma. Sintetiziraju ju bakterije koje pripadaju rodovima *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* 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 dugotrajan i često ekonomski neisplativ 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 biomaterijal se upotrebljava u pripravi kozmetičkih pripravaka i biomedicini.

### 2.4.1. Struktura bakterijske celuloze

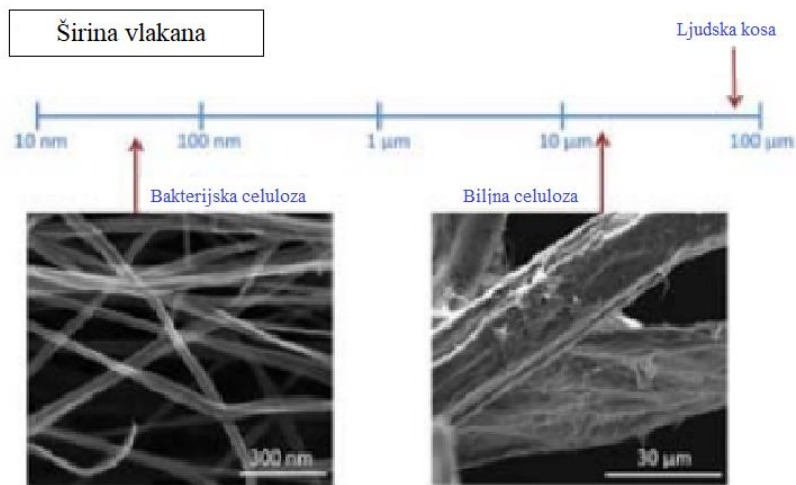
Strukturu bakterijske celuloze čine vlakna građena od  $\beta$ -1,4 glukanskih lanaca. Molekulske je formule kao i celuloza biljnog podrijetla,  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . Glukanski lanci povezani su intermolekulskim i intramolekulskim vodikovim vezama (Slika 2.). Mikrovlakna bakterijske celuloze prvi je opisao Mühlethaler (1949), koji je uočio da su oko 100 puta manja od vlakana iz biljne celuloze (Chawla i sur., 2009; Gayathry i Gopaldaswamy, 2014).



**Slika 2.** Kemijska struktura bakterijske celuloze (Ul-Islam i sur., 2012).

Istraživanja provedena na strukturi bakterijske celuloze su pokazala da je kemijski potpuno identična biljnoj celulozi (Slika 3.), ali različita prema makromolekulskoj 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 3.** SEM snimka usporedbe uzoraka bakterijske i biljne celuloze koja prikazuje povezanu 3-D mrežu celuloznih vlakana (Torres i sur., 2012).

Ovako gusto umrežena vlakna i pripadajuće stanice mikroorganizama oblikuju plutajuću pelikulu (opnu) koja omogućuje nepokretnim, striktno aerobnim bakterijama rast pri višim koncentracijama kisika na površini hranjive podloge (Slika 4.)



**Slika 4.** Bakterijska celuloza na kraju fermentacije. Pristupljeno 16. 05. 2017.

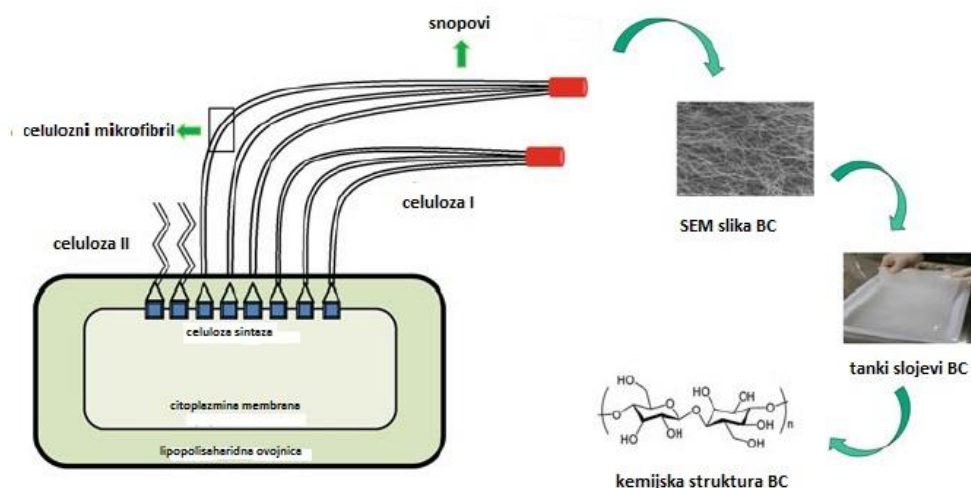
(<http://news.softpedia.com/news/Male-Kombucha-42984.shtml>).

Karakteristična strukturna, fizička i mehanička svojstva bakterijske celuloze rezultat su njene ekstruzije i proizvodnje izvan bakterijske stanice. Izlaskom kroz pore membrane formiraju se protofibrili promjera otprilike 2-4 nm. Protofibrili se skupljaju u mikrofibrile veličine 80 x 4 nm (Iguchi i sur., 2000).

Elektronskom mikroskopijom staničnog omotača je ustanovljeno da postoji 50-80 pora iz kojih izlaze celulozna vlakna. Prije sinteze same celuloze se stvaraju agregati  $\beta$ -1,4-glukana (Benziman i sur., 1980). Prisutnost takvih agregata ukazuje na to da je sinteza mnogih lanaca  $\beta$ -1,4-glukana karakteristično svojstvo sinteze celuloznih fibrila u višim i nižim oragnizmima. Oblik i veličina glukanskih lanaca, agregata, mikrofibrila i vlakana je određeno položajem i veličinom ekstruzijskih mjesta kroz koje izlaze glukanski lanci (Ross i sur., 1991).

*A. xylinum* proizvodi celulozu u dva različita oblika: celulozu I te termodinamički stabilniju celulozu II. Glukanski lanci su kod celuloze I pravilno raspoređeni, dok su u celulozi II nasumično poredani (Yu i Atalla, 1996). Razlike u rasporedu mikrofibrila u strukturi bakterijske i biljne celuloze su odgovorne za većinu karakteristika bakterijske celuloze, uključujući visoku kristaliničnost, mehaničku čvrstoću i drugo.

Vlankasta mreža bakterijske celuloze se sastoji od trodimenzionalnih, strukturno vrlo uređenih nanovlakana, što rezultira stvaranjem hidrogela velike površine i poroznosti. *Acetobacter xylinum* proizvodi celulozu I (vrpcama sličan polimer) i celulozu II (termodinamički stabilan polimer), što je prikazano na Slici 5. (Chawla i sur., 2009). Tijekom procesa sinteze, protovlakna glukoznog lanca se izlučuju kroz bakterijsku staničnu stijenku i međusobno formiraju nano vlaknaste celulozne trake (Ross i sur., 1991). Ove trake grade mrežno oblikovanu strukturu bakterijske celuloze koju čini vrlo porozni matriks (Dahman, 2009). Ovako sintetizirana celuloza ima vrlo veliki broj hidroksilnih grupa čime se objašnjava njena hidrofilnost, biorazgradivost i veliki kapacitet za kemijske modifikacije (Klemm i sur., 2005).



**Slika 5.** Sinteza celuloznih mikrofibrila s bakterijom *A. xylinum* (Chawla i sur., 2009).

## 2.6. Struktura fibrila bakterijske celuloze

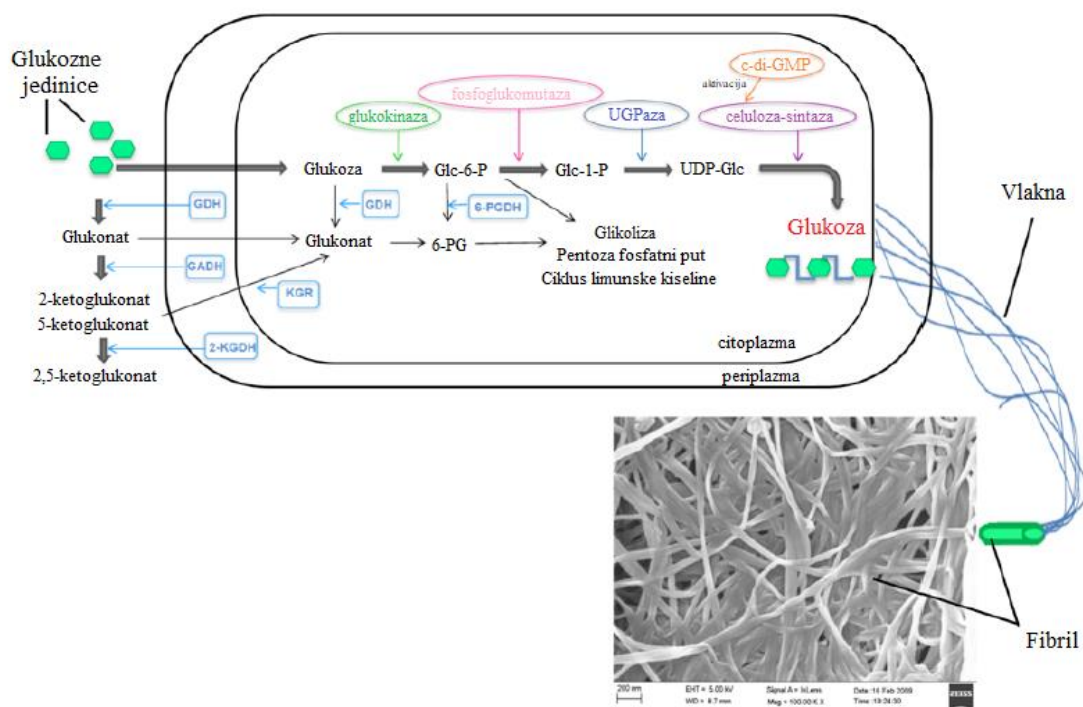
Primjenom  $^{13}\text{C}$  nuklearne magnetske rezonancije za strukturnu analizu celuloze otkrilo se da je nativna celuloza građena od dvije različite kristalne strukture, celuloze  $I_\alpha$  i  $I_\beta$  (Vanderhart i Atalla, 1984; Keshk, 1999). Glavna razlika između celuloze  $I_\alpha$  i  $I_\beta$  se može uočiti na spektru kod 106 ppm, pri čemu singlet predstavlja celulozu  $I_\alpha$ , a dublet celulozu  $I_\beta$ . Hirai i sur. (1987) su uočili da se iz celuloze  $I_\alpha$  može dobiti gotovo čista celuloza  $I_\beta$  pomoću hidrotermalnog tretmana (pri temperaturi od  $260^\circ\text{C}$ ) od 30 min u blago alkalnim uvjetima. Budući da je formiranje celuloze  $I_\beta$  ireverzibilno, može se zaključiti da je struktura celuloze  $I_\beta$  termodinamički stabilnija od celuloze  $I_\alpha$ . Prilikom kristalizacije, celuloza  $I_\alpha$  formira veće mikrofibrile, dok celuloza  $I_\beta$  formira manje. Celuloza  $I_\alpha$  se mora kristalizirati u višem energetsom području od celuloze  $I_\beta$  jer je za transformaciju kristala iz celuloze  $I_\beta$  u  $I_\alpha$  potrebna visoka temperatura. Kristalni sustav celuloze  $I_\alpha$  je trikliniski, a celuloze  $I_\beta$  je monokliniski (Horii i sur., 1997). Dakle, kristali nativne celuloze se sastoje od dva alomorfa, celuloze  $I_\alpha$  i  $I_\beta$  (Yamamoto i Horii, 1993). Omjer celuloze  $I_\alpha$  i celuloze  $I_\beta$  se razlikuje od vrste do vrste (Horii i sur., 1997). Da bi se odgonetnulo zbog čega postoje navedeni alomorfi i zašto im je omjer različit od vrste do vrste, koristi se bakterija *Gluconacetobacter xylinus* kao model. Biosinteza celuloze ove bakterije je temeljito istražena te je ustanovljeno da se omjer alomorfa celuloze mijenja ovisno o uvjetima kulture (Yamamoto i Horii, 1994; Yamamoto i Horii, 1996). Prema strukturnom modelu iz rada Haigler i Weimer (1991), velik dio mjesta

koji sintetiziraju celulozu se nalaze na plazminoj membrani bakterijske stanice. Celuloza sintaze u navedenim mjestima proizvode 12-15 celuloznih lanaca u obliku malih fibrila promjera 1,5 nm te ih luče kroz pore na membrani u hranjivu podlogu u kojoj se nalazi kultura. Takvi fibrili se nazivaju suplementarni fibrili, a oni se agregiraju u mikrofibrile promjera 3-6 nm, koji se dalje agregiraju u još veće nakupine promjera 40-60 nm. Kristalizacija se inducira tijekom procesa agregacije jer su suplementarni fibrili premali da bi kristalizirali. Celuloza iz morskih algi i bakterija sadrži mnogo celuloze  $I_{\alpha}$ . Prosječni maseni udjel celuloze  $I_{\alpha}$  iznosi 0,63. Na primjer, maseni udjel celuloze  $I_{\alpha}$  za algu *Valonia macrophysa* je 0,64, a za *Valonia aegarropila* je 0,60. Za slučaj bakterijske celuloze maseni udjel ovisi i o soju bakterije te temperaturi uzgoja i iznosi od 0,64 do 0,71. S druge strane, celuloza  $I_{\beta}$  čini velik dio stanične stijenke kod viših biljaka, pri čemu maseni udjel iznosi oko 0,80 (Horii i sur., 1997). Bakterijska se celuloza može proizvoditi na dva načina: statičkim i dinamičkim uzgojem. U statičkom uzgoju se bakterijska celuloza nakuplja na površini hranjive podloge, a u dinamičkom uzgoju je bakterijska celuloza dispergirana u hranjivoj podlozi u obliku granula i vlakna. Dinamički uzgoj je pogodan za industrijsku proizvodnju bakterijske celuloze, a statički uzgoj se koristi za istraživanje procesa proizvodnje bakterijske celuloze. Watanabe i sur. (1998) su također ustanovili da je stupanj polimerizacije celuloze manji u dinamičkom uzgoju nego u statičkom uzgoju. Ova činjenica ukazuje na to da bakterijska celuloza proizvedena dinamičkim uzgojem veže više vode od bakterijske celuloze proizvedene statičkim uzgojem.  $^{13}\text{C}$  NMR analiza je otkrila da bakterijska celuloza proizvedena dinamičkim uzgojem sadrži manje celuloze  $I_{\alpha}$ .

## 2.7. Biosinteza bakterijske celuloze

Biosinteza bakterijske celuloze je precizan proces reguliran mnogobrojnim enzimima i regulatornim proteinima. Iako mehanizam polimerizacije glukoze u celulozu kod bakterija nije potpuno poznat, mehanizam sinteze uridin-difosfoglukoze (UDPGlc) je dobro objašnjen. Biosinteza celuloze uključuje proizvodnju UDPGlc, koji je prekursor u sintezi celuloze, a zatim polimerizaciju glukoze  $\beta$ -1,4-glikozidnim vezama u celulozni lanac. Individualni celulozni lanci izlaze iz stanice, što uzrokuje pojavu vlaknaste strukture od mnogobrojnih celuloznih vlakana na površini stanice. Stvaranje tih lanaca uzrokuje nastajanje fibrila (Slika 6.).

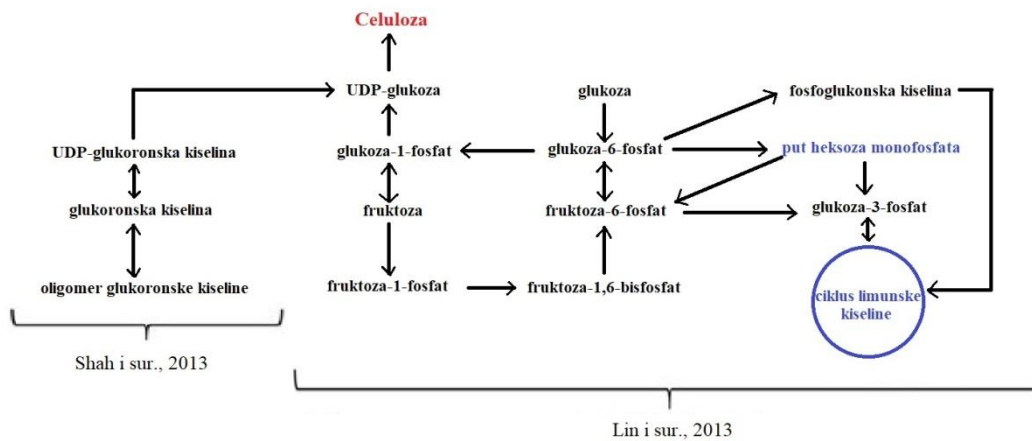




**Slika 6.** Biosinteza celuloze s *A. xylinum*. GDH glukoza dehidrogenaza, GADH glukonat dehidrogenaza, KGR ketoglukonat reduktaza, 2-KGDH 2-ketoglukonat dehidrogenaza, CS celuloza sintaza, GK glukokinaza, FBP fruktoza-1,6-bifosfat fosfataza, FK fruktokinaza, 1FPk fruktoza-1-fosfat kinaza, PGI fosfoglukoizomeraza, PMG fosfoglukomutaza, PTS sistem fosfotransferaze, UGP pirofosforilaza uridin difosfoglukoza, UDPGlc uridin difosfoglukoza, G6PDH glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (Tal i sur., 1998).

Biosinteza celuloze kod bakterija je vezana uz kataboličke reakcije i ne ometa anaboličke reakcije u stanici, uključujući sintezu proteina. *A. xylinum* koristi put pentoza fosfata te ciklus limunske kiseline za sintezu celuloze i energiju, što je vidljivo na Slici 7. (Ross i sur., 1991; Tonouchi i sur., 1996). *A. xylinum* može prevesti heksoze, glicerol, dihidroksiaceton, piruvat i dikarboksilne kiseline u celulozu s 50% uspješnosti. Piruvat i dikarboksilne kiseline ulaze u ciklus limunske kiseline i konvertiraju se u heksoze preko glukoneogeneze, što je slično metabolizmu za glicerol, dihidroksiaceton i intermedijere puta pentoza fosfata. Direktni prekursor za biosintezu bakterijske celuloze je glukoza, koja se fosforilira u glukoza-6-fosfat (Glc-6-P) pomoću glukokinaze. Glukoza-6-fosfat zatim izomerizira u glukoza-1-fosfat pomoću fosfoglukomutaze, a glukoza-1-fosfat se prevodi uz UDPGlc-pirofosforilazu u UDPGlc. UDPGlc-pirofosforilaza je neophodna za sintezu celuloze, a njena aktivnost varira ovisno o soju *A. xylinum*. Najveću aktivnost pokazuje kod *A. xylinum* ssp. *sucrofermentans* BPR2001 (Bielecki i sur. 2005).

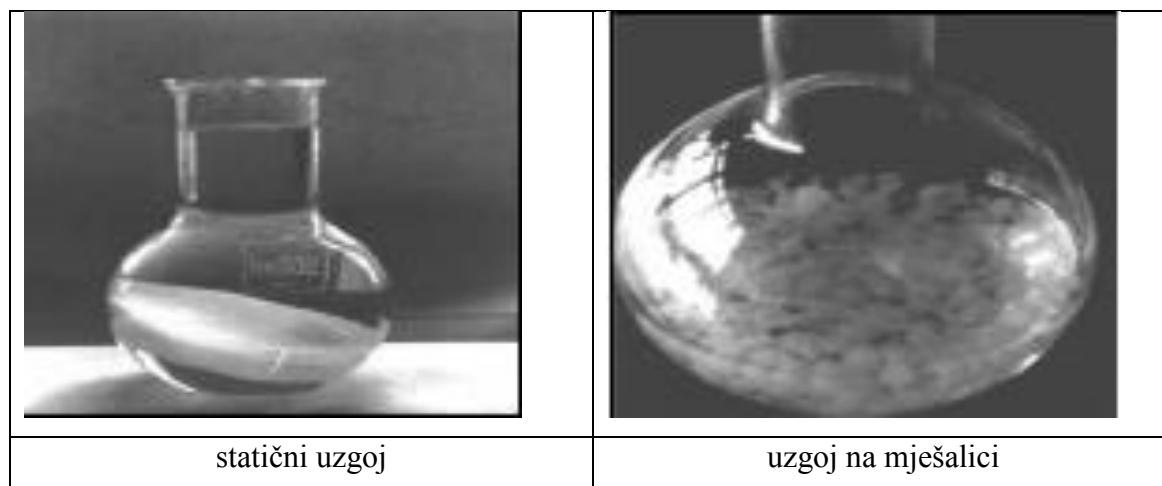
Biosinteza celuloze u bakterijama je katalizirana celuloza sintazom. To je tipični membranski protein molekularne mase 400-500 kDa koji je vezan za citoplazmatsku membranu. Celuloza sintaza sadrži specifične aminokiseline i glukotransferaze u globularnoj regiji (Brown i Saxena, 2000). Sinteza bakterijske celuloze događa se između vanjske i plazmine membrane pomoću celuloza-sintetizirajućeg kompleksa vezanog za pore na površini bakterija. Pri tome nastaju tanke trake celuloze, prosječnog promjera od 10-20 do 30-40 Å, koje se nadograđuju jedna na drugu u horizontalnoj ravnini.



**Slika 7.** Biokemijski put sinteze bakterijske celuloze (Ul-Islam i sur., 2012).

## 2.8. Uzgoj bakterijske celuloze

Bakterijska celuloza se može proizvoditi statično, na tresilici ili uz miješanje, no svaki od ovih postupaka rezultira različitim oblicima celuloznih vlakana (Slika 8.). Pri statičnim uvjetima uzgoja, sintetizirana celuloza je građena od trodimenzionalnih, međusobno isprepletenih vlakna, dok se pri uzgoju na tresilici ili u reaktoru s miješalom sintetiziraju kugle ili peleti nepravilnog oblika (Tanskul i sur., 2013).



**Slika 8.** Bakterijska celuloza sintetizirana u statičnom uzgoju i na mješalici (Bielecki i sur., 2002).

Proces sinteze celuloze pod statičkim uvjetima ovisi o opskrbi atmosferskim kisikom na površini, a prinos o koncentraciji izvora ugljika. Produženjem vremena rasta bakterija octene kiseline, povećava se prinos bakterijske celuloze (Sheykhnazari i sur., 2011). Sinteza bakterijske celuloze doseže svoju krajnju granicu kada pelikula pada na dno hranjive podloge, pri čemu bakterije postaju inaktivne zbog nedovoljne opskrbe kisikom (Borzani i DeSouza, 1995). U industrijskoj proizvodnji, kao najbolji način pokazao se šaržni proces s pritokom supstrata jer je postignuta veća produktivnost u odnosu na kontinuirani proces (Cakar i sur., 2014).

Suprotno tome, zbog niskog prinosa pri statičnom načinu proizvodnje, većina bakterijske celuloze koja se koristi u komercijalne svrhe proizvodi se na tresilici. Trešnjom se sintetiziraju nepravilni oblici celuloze, bilo kao vlaknasti ovjes, kugle, peleti ili nepravilna masa (Yan i sur., 2008, Wu i Lia, 2008). Ovakva bakterijska celuloza ima manju kristaliničnost, mehaničku čvrstoću i stupanj polimerizacije u usporedbi s pelikulama iz statične kulture (Shi i sur., 2013. godine). Istraživanja Hu i sur. (2013) pokazala su da se broj sintetiziranih oblika celuloze smanjuje s povećanjem volumena inokuluma, a različite početne koncentracije glukoze utječu na prosječne promjere tih oblika celuloze, no mehanizam formiranja različitih oblika celuloze uz trešnju još je uvijek nepoznat.

### 2.8.1. Optimiranje proizvodnje bakterijske celuloze

Proces proizvodnje bakterijske celuloze se može optimirati dodatkom male količine celulaznog kompleksa u hranjivu podlogu. Celulazni kompleks sadrži endoglukanazu, egzocelobioglukozidazu i  $\beta$ -glukozidazu. Tonouchi i sur. (1995) su proučili proizvodnju celuloze pomoću mutanta *Gluconacetobacter xylinus* (koji je mogao vezati celulozu, ali nije imao endoglukanaznu aktivnost) kako bi identificirali kakav učinak ima vezanje celuloze na samu proizvodnju. Utvrdili su da endoglukanazna aktivnost, a ne učinak vezanja celuloze, poboljšava prinos celuloze u procesu. Dodatak male količine celulaze ne utječe na stupanj polimerizacije bakterijske celuloze, nego djeluje pozitivno na proizvodnju (Tonouchi i sur., 1995). Osim toga, utvrđeno je da se dodatkom otpadne sulfitne piljevine iz industrije papira (CP prah, eng. *CP powder*) u hranjivu podlogu značajno povećava učinkovitost proizvodnje celuloze pomoću *Gluconacetobacter xylinus*. CP prah je frakcioniran gel filtracijom na Sephadex G-25 u visokomolekularnu frakciju (A) i niskomolekularnu frakciju (B) te je utvrđeno da je visokomolekularna lignosulfonatna frakcija (A) zaslužna za povećanje prinosa celuloze. Premjet i sur. (1996) su također separirali CP prah taloženjem pomoću etanola. U talogu se nalazila visokomolekularna frakcija (C), a u supernatantu niskomolekularna frakcija (D). Frakcija C se uglavnom sastojala od visokomolekularnog lignosulfonata poput frakcije A, sadržavala je malu količinu šećera i imala jaku apsorbciju pri 280 nm. Frakcija D je sadržavala veliku količinu šećera i imala je nižu apsorbciju pri 280 nm te je bila ekvivalentna frakciji D. Dodatkom frakcija A i B u hranjivu podlogu se povećava učinkovitost proizvodnje celuloze, pri čemu je frakcija A imala veći utjecaj na proces od frakcije B (Premjet i sur., 1994). Frakcija A je bila podvrgnuta dodatnom pročišćavanju višestrukim taloženjem s etanolom, čime se dobio talog A1 i supernatant A2. Zatim je frakcija A1 bila podvrgnuta novom taloženju, pri čemu se dobio talog A3 i supernatant A4. Utvrđeno je da visokomolekularna frakcija A3 najznačajnije utječe na prinos celuloze, dok dodatak frakcija A2 i A4 nešto manje utječe na prinos (Premjet i sur., 1994). Efikasnost frakcije A3 je oko dva puta veća od efikasnosti frakcija A i C. Prema ovim rezultatima, ugljikohidrati u CP prahu nemaju veliku ulogu u biosintezi celuloze. Što je više visokomolekularna lignosulfonatna frakcija bila pročišćena, to je bio veći utjecaj na produktivnost procesa. Povećanje prinosa celuloze je primijećeno i kada su se dodali natrij lignosulfonat te kalcij lignosulfonat (Premjet i sur., 1994). Utjecaj askorbinske kiseline (vitamin C) na proizvodnju

bakterijske celuloze se ispitao na četiri soja *Gluconacetobacter xylinus*: ATCC 10245, IFO 13693, IFO 13772 i IFO 13773 (Keshk, 2014). Prinos procesa je bila veća zbog dodatka vitamina C u podlogu (0,5% tež/tež), a iznosila je 47 g/30 mL (prinos procesa bez dodatka vitamina C bila je 25 g/30 mL). Veća produktivnost je vezana uz pad koncentracije glukonske kiseline. U istom radu provedena je i difrakcija X-zraka. Rezultati kristalografske analize su pokazali da je indeks kristaliničnosti vrlo nizak u prisutnosti askorbinske kiseline. Ovi su rezultati potvrđeni i <sup>13</sup>CNMR analizom. Povećanje prinosa celuloze dodatkom vitamina C se događa zbog antioksidativnog efekta koji posjeduje askorbinska kiselina.

### 2.8.2. Biosinteza celuloze iz različitih izvora ugljika

Za proizvodnju celuloze s *A. xylinum* se do sada uglavnom koristila glukoza. Međutim, provedena su i istraživanja s drugim izvorima ugljika poput monosaharida, oligosaharida, škroba, alkohola i organskih kiselina (Hestrin i Schramm, 1954). Fruktaza i glicerol su imali gotovo isti prinos celuloze kao i glukoza (Masaoka i sur., 1993). Prinos celuloze u odnosu na potrošenu glukozu se smanjuje povećanjem početne koncentracije glukoze, a prinos glukonske kiseline je veći s povećanjem početne koncentracije glukoze. Smanjenje prinosa celuloze se vjerojatno događa zbog toga što se glukoza metabolizira u glukonsku kiselinu. Optimalni pH za proizvodnju celuloze je između 4,0 i 6,0. U radu Okawa i sur. (1995) se proučavala proizvodnja celuloze iz D-arabitoza pomoću *Gluconacetobacter xylinus* KU-1. Količina dobivene celuloze iz D-arabitoza je bila 6 puta veća od količine dobivene iz D-glukoze. U D-arabitol hranjivoj podlozi konačni pH se nije smanjio i nije bila prisutna glukonska kiselina, zbog čega je nastala velika količina bakterijske celuloze. Uspoređivanjem prinosa celuloze iz glukoze, galaktoze i ksiloze kao izvor ugljika, pokazalo se da galaktoza i ksiloza daju manji prinos zbog manje brzine rasta mikroorganizama. Mikrofibriili iz proizvodnje na ksilozi su bili manje konzistentni od onih iz proizvodnje na glukozi. Analiza plinskom kromatografijom je pokazala da je sastav šećera unutar polimera proizvedenog uz ksilozu kao izvor ugljika i dalje bio 80% glukoze te 20% ostalih monosaharida. Također, nije bilo razlike u stupnju polimerizacije. Korištenjem drugih izvora ugljika se može smanjiti trošak proizvodnje. Prinos bakterijske celuloze iz saharoze je upola manji od prinosa celuloze iz glukoze zbog niske aktivnosti invertaze kod *A. xylinum*. Ako se saharoza učinkovito hidrolizira može se povećati prinos celuloze. Tajima i sur. (1995) su unaprijedili proizvodnju bakterijske celuloze ko-kultivacijom dvaju soja *Gluconacetobacter*

*xylinus* (NCI 1051 ili ATCC 10245 i NCI 1005). Produktivnost ko-kultivacijskog procesa je bila mnogo veća od procesa s jednolikom mikrobnom kulturom, vjerojatno zbog invertaze koju luči *Gluconacetobacter xylinus* NCI 1005. Invertaza je omogućila hidrolizu saharoze i time više supstrata za proizvodnju celuloze.

### **2.8.3. Reaktivnost bakterijske celuloze**

#### a) Heterogena reakcija

Bakterijska se celuloza razlikuje od biljne celuloze po svojoj visokoj kristaliničnosti i čistoći (bez lignina i ostalih biogenih tvari), velikom kapacitetu za apsorpciju vode i boljoj otpornosti na mehanički stres (Keshk i Haijia, 2011). Karakteristična svojstva bakterijske celuloze su nadahnule istraživanja o reaktivnosti hidroksilnih skupina celuloze. Reakcije karboksimetilacije i cijanoetilacije su provedene na bakterijskoj celulozi kako bi se utvrdila njena reaktivnost. Bakterijska celuloza je više reaktivna na cijanoetilaciju i karboksimetilaciju nego biljna celuloza zbog svoje visoke kristaliničnosti i niskog stupnja polimerizacije (Keshk i Nada, 2003).

#### b) Homogena reakcija

Homogena reakcija otopljene bakterijske celuloze s acetatnim anhidridom i fenil-izocijanatom je pokazala da je stupanj supstitucije tri puta veći od onog biljne celuloze. Budući da se bakterijska celuloza otapa u 85%-tnoj fosfornoj kiselini, proučavana je homogena oksidacija njenih hidroksilnih skupina. Jodiranje celuloze otopljene u 85%-tnoj fosfornoj kiselini je uzrokovalo nastajanje triestera hipojodne kiseline. Homogene derivatizacije pomoću oksidacije i jodiranja su provedene na različitim tipovima celuloze da se otkriju njihove fizikalno-kemijske karakteristike (Keshk, 2008). Rezultati nam govore da bakterijska celuloza otopljena u fosfornoj kiselini ima najveću reaktivnost prema jodiranju jer fosforna kiselina degradira kristalnu strukturu celuloze. Stoga, kristalna struktura celuloze ne utječe na homogene reakcije kao što utječe kod heterogenih reakcija (Keshk i Nada, 2003).

## **2.9. Primjena bakterijske celuloze**

### **2.9.1. Biomedicina**

Budući da je bakterijska celuloza visoke čistoće, hidrofilna, kiralna i biokompatibilna, ona se koristi u prehrambenoj industriji, industriji papira te medicini.

Velika mehanička čvrstoća u nesušenom stanju, permeabilnost za tekućine i plinove te ne izazivanje iritacija kože čini želatinoznu membranu bakterijske celuloze dobrom umjetnom kožom za kratkotrajno prekrivanje površinskih ozljeda (Slika 9.). Biofill® i Gengiflex® su proizvodi od bakterijske celuloze koji imaju široku primjenu u kirurgiji i dentalnim implantantima. Slučajevi opekline drugog i trećeg stupnja, čireva i drugih površinskih ozljeda se mogu uspješno liječiti pomoću Biofill®, koji se koristi kao privremena zamjena za kožu (Fontana i sur., 1990). Autori su tada dokumentirali sljedeće prednosti za Biofill®: trenutno olakšanje boli, dobra adhezija uz ranu, smanjena nelagoda nakon operacije, smanjena infekcija, lakoća pregleda povrede zbog prozirnosti sloja, brže zacjeljivanje i spontano odvajanje sloja nakon zacjeljivanja te smanjeno vrijeme liječenja. Samo je jedan nedostatak spomenut: limitirana elastičnost na mjestima veće mobilnosti. Gengiflex® je također razvijen za liječenje periodontalnog tkiva. Kawecki i sur. (2004) su opisali primjenu bakterijske celuloze (Cellumed) u veterinarskoj medicini za liječenje svježih, velikih površinskih rana kod konja i pasa.

Ako su krvne žile oko srca blokirane zbog stvrdnjavanja arterija, potrebno je ugraditi premosnicu. Bakterijska celuloza se može koristiti za izradu umjetnih krvnih žila jer je manja šansa stvaranja krvnih ugrušaka nego kod korištenja sintetskih materijala. To znači da bakterijska celuloza dobro međusobno djeluje s krvlju. Prirodne krvne žile sadrže sloj stanica na unutarnjoj stijenci koje sprječavaju stvaranja krvnih ugrušaka. Materijal koji se koristi za izradu umjetnih krvnih žila mora podnositi mehanički stres i krvni tlak tijela. Nativna bakterijska celuloza ima bolje mehaničke karakteristike i veću postojanost oblika od mnogih sintetskih materijala, kao što su polipropilen, polietilen-tereftalat i celofan. Također, umjetne krvne žile od sintetskih materijala su često nekompatibilne s nativnim tkivom. Zato je važan zadatak razvoj biokompatibilnih materijala za izradu umjetnih krvnih žila poput bakterijske celuloze. Polivinil-alkohol je biokompatibilni polimer koji ima odgovarajuće karakteristike da

bude dobar materijal za izradu umjetnih krvnih žila, a uz njega se dodaju i vlakna od bakterijske celuloze.

Upotreba nosača u tkivnom inženjerstvu je nužna za proliferaciju stanica i sprječavanje dediferencijacije te za određivanje oblika tkiva koje raste. Do sada su se isprobali razni materijali za izradu nosača poput kolagena, alginata, hijaluronske kiseline, fibrina te sintetski polimeri (poliglikolna kiselina, polilaktat, polivinil-alkohol, polihidroksietil-metakrilati poli-N-izopropilakrilamid). Međutim, još uvijek nisu opisani tkivni nosači s prirodnim mehaničkim karakteristikama. *G. xylinus* je istraživana za svrhu korištenja kao nosač u tkivnom inženjerstvu budući da je biorazgradiva. Nativna i modificirana bakterijska celuloza (fosforilirana i sulfonirana) se proučavala kao novi materijal za nosač u uzgoju govedih hondrocita. Rezultati su pokazali da nemodificirana bakterijska celuloza podržava proliferaciju hondrocita na nivou 50% kolagena, ali je pokazala značajnu prednost u smislu mehaničkih karakteristika. U usporedbi s plastikom i alginatom, nativna bakterijska celuloza je imala značajno bolji rast kulture hondrocita. Kemijsko sulfoniranje i fosforilacija bakterijske celuloze nije poboljšalo rast hondrocita u odnosu na nativnu bakterijsku celulozu, ali je poroznost nosača više stabilizirala hondrocite. Korištenjem bakterijske celuloze se nije povećala količina upalnih citokina u *in vitro* uvjetima. Nativna bakterijska celuloza je ispitana i kao nosač za humane hondrocite i utemeljeno je da nativna bakterijska celuloza podržava proliferaciju humanih hondrocita, što znači da se bakterijska celuloza može koristiti kao nosač u tkivnom inženjerstvu.

U ranim 1980-tim godinama, Johnson & Johnson su započeli istraživanje upotrebe mikrobne celuloze pri izradi flastera za rane. Od tada, brazilska tvrtka Biofill Industries je nastavila istraživanje svojstava bakterijske celuloze i počinje prodavati proizvode od mikrobne celuloze na tržištu proizvoda za njegu rana (Fontana i sur., 1991). U Brazilu je također razvijena pročišćena mikrobna celuloza, koja se koristi kao umjetna koža (Fontana i sur., 1990). Mješavina bakterijske celuloze, hitozana, polietilenglikola i gelatina se može koristiti za izradu nosača u tkivnom inženjerstvu i za zacjeljivanje rana (Ougiya i sur., 1997). Takav proizvod je pjenaste strukture. Skenirajućom elektronskom mikroskopijom se ustanovilo da su molekule hitozana penetrirale u bakterijsku celulozu te formirale višestruki sloj i poroznu mrežu. Istraživana je i adhezija stanica na takve mješavine, pri čemu su se koristili 3T3 fibroblasti. Mješavine su pokazale veću kompatibilnost od čiste bakterijske celuloze (Hioki i sur., 1995).





**Slika 9.** Membrana bakterijske celuloze koja se ne suši i pokazuje nevjerovatnu podatnost na različitim oblicima tijela, održava vlagu tkiva i značajno olakšava bol nakon zadobivanja opekline (Czaja i sur., 2006).

### **2.9.2. Prehrambena industrija**

Desert, *Nata de Coco*, jedan je od tradicionalnih narodnih proizvoda posljednjih sedamdeset godina na Filipinima (Keshk i Sameshima, 2006). Izvoz *Nata* iz Filipina u Japan imao je veliki utjecaj na globalni pogled za širenje proizvodnje mikrobne celuloze. Kao rezultat proizvodnje *Nata de Coco* pomoću *G. xylinus*, David (1996) je pokazao da *Nata de Coco* snižava kolesterola plazme. Bakterijska celuloza je primjenjiva i kao funkcionalni dodatak hrani jer može poslužiti kao zgušnjivač i raspršivač. Pri tome bakterijska celuloza iz uzgoja na tresilici ima puno veći emulgatorski učinak nego ona iz statičke kulture (Ogawa i Tokura, 1992).

Pakiranje ima važnu ulogu u zaštiti i očuvanju hrane. Industrija preferira biomaterijale za pakiranje namirnica ili hrane zbog sve veće zabrinutosti javnosti zbog utjecaja nerazgradive ambalaže na okoliš. Bakterijska celuloza se smatra jednom od prikladnih sirovina za proizvodnju biorazgradivih materijala (Tang i sur., 2012.). Strukturno se sastoji od fino umreženih mikrovlakana vrlo otpornih na vodu, no nema antibakterijska i antioksidativna svojstva kojima bi se spriječilo onečišćenje hrane. Primjena bakterijske celuloze u prehrambenoj industriji sažeto je prikazana u Tablici 1.

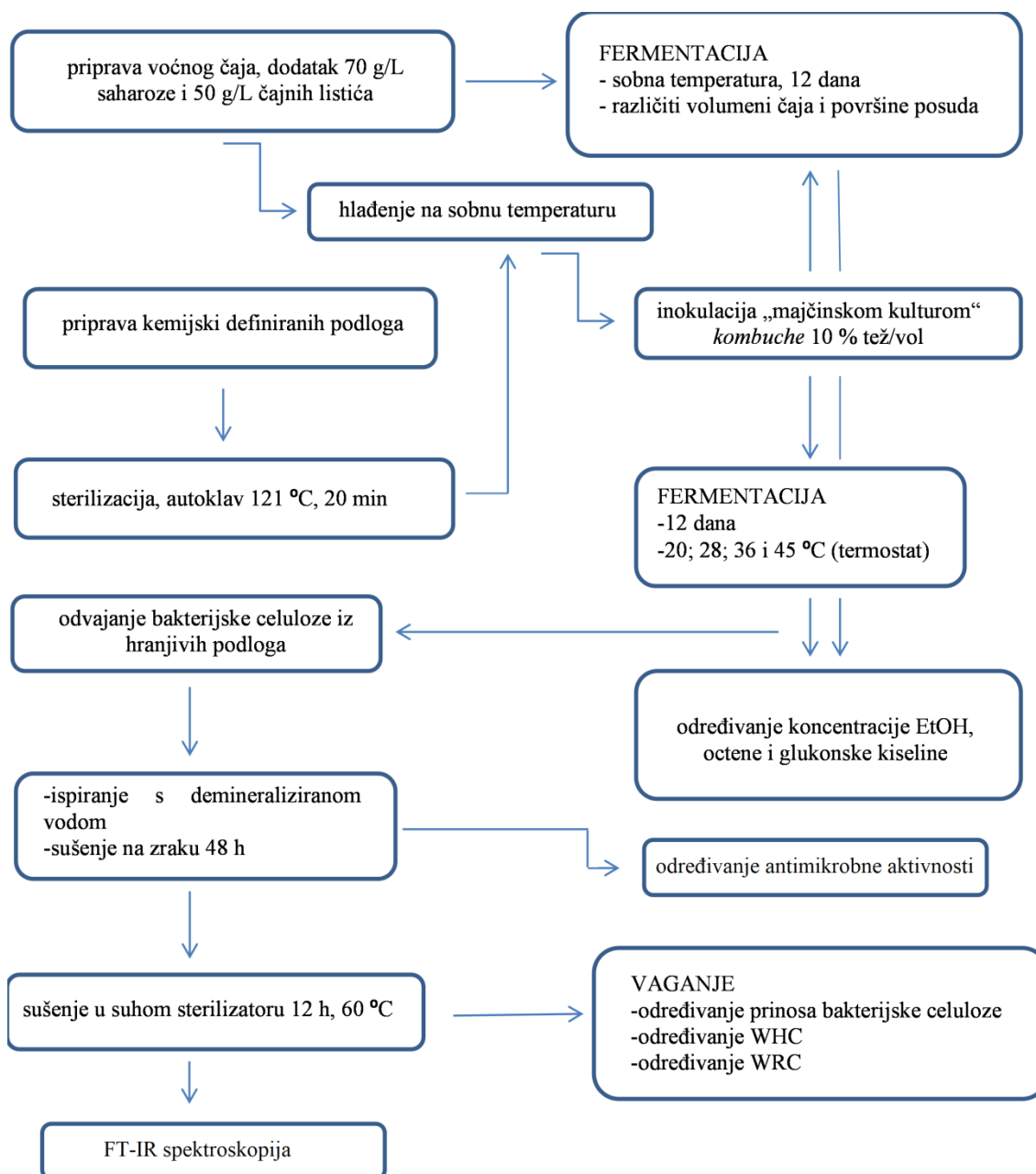
**Tablica 1.** Primjena mješavina modificirane bakterijske celuloze u prehrambenoj industriji (Esa i sur., 2014).

<b>Materijal</b>	<b>Uloga</b>	<b>Proizvod</b>
BC*/nizin	antimikrobno pakiranje	meso
BC/polilizin	biorazgradivo pakiranje	kobasice
BC	emulgator	surimi
karboksimetil celuloza	regulator strukture tijesta	tijesto
hidroksipropil metil celuloza	pojačivač teksture	tučeno vrhnje
metil celuloza	pojačivač dugotrajnosti	jaja
metil celuloza	pojačivač	vitamin C

\*BC – bakterijska celuloza

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. Tijek istraživanja



Slika 10. Shematski dijagram tijeka cjelokupnog istraživanja.

## **3.2. Materijali i metode rada**

### **3.2.1. Priprava kulture *kombuche***

Komercijalna starter kultura *kombuche* je pripravljena s matičnom kulturom u čaju uz dodatak 100 g/L saharoze. Uzgoj je trajao 8 dana u aseptičnim uvjetima pri 28 °C u termostatu.

### **3.2.2. Vrsta korištenog čaja**

Uzgojena *kombucha* nacijepljena je na biljni čaj s okusom crnog ribiza, Franck d.d., Hrvatska.

Sastav čaja: cvjetovi hibiskusa (41,9 %), plodovi jabuke (29,9 %), plodovi šipka (10 %), aroma crnog ribiza (8,2 %), cimet (8 %) i plodovi bazge (2 %).

### **3.2.3. Priprava kompleksne podloge (fermentirani čaj)**

Infuzija biljnog čaja je pripravljena dodatkom 50 g čaja u 1 L kipuće vode u koju je dodano 60, 80, 100 i 120 g/L saharoze (bijeli konzumni šećer). Nakon ekstrakcije koja je trajala 8 minuta (prema naputku proizvođača), čaj je ohlađen na sobnu temperaturu. Infuzija čaja je prelivena u sterilne staklene posude za kućnu uporabu (1000, 720 i 370 mL), nakon čega su uzorci inokulirani sa svježe uzgojenom *kombucha* kulturom (30 % tež/vol). Nacijepljeni uzorci su inkubirani pri 25 °C (sobna temperatura) tijekom 14 dana, nakon čega je prevrela tekućina centrifugirana pri 2500 okr/min tijekom 10 minuta, a supernatant je uporabljen za daljnja određivanja. Kontrolni uzorak je bila neprevrela infuzija biljnog čaja s okusom crnog ribiza.

### **3.2.4. Kemijski definirane podloge**

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

- glukoza 20
- pepton 5

- kvaščev ekstrakt 5
- dinatrijev fosfat 2,7
- limunska kiselina 1,15

Pripravljena osnovna podloga je sterilizirana u autoklavu tijekom 20 min na 121 °C, a pH prije sterilizacije je podešen na 5.0. Sterilizirana podloga (po 100 mL) je razlivena u 20 tikvica od 300 mL u koje su dodane različite koncentracije glukoze, fruktoze, maltoze i glicerola.

1. podloga: 4 tikvice s dodatkom glukoze (1 - 5 % tež/vol);

2. podloga: 4 tikvice s dodatkom fruktoze (1 - 5 % tež/vol);

3. podloga: 4 tikvice s dodatkom maltoze (1 - 5 % tež/vol);

4. podloga: 4 tikvice s dodatkom glicerola (1 – 5 % vol/vol);

5. podloga: 4 tikvice s osnovnom podlogom, uz različiti pH (3; 4; 5; 7).

Podloge su inokulirane s 10 % inokuluma (10 g/100 mL), nakon toga je proveden uzgoj 14 dana pri 25 °C (sobna temperatura). Prevrele podloge su centrifugirane pri 2500 okr/min tijekom 10 minuta, a supernatanti su uporabljeni za daljnja određivanja.

### 3.2.5. Određivanje pH vrijednosti

Uzorcima je pH vrijednost mjerena svaki dan tijekom 14 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.

### 3.2.6. Određivanje koncentracije octene kiseline

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

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

gdje je:

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

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

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

### 3.2.7. 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:

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

$M(\text{NaOH}) = \text{molekulska masa NaOH (0,1 g mol}^{-1}\text{)}$

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

### 3.2.8. Određivanje alkohola kemijskom metodom

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

#### Postupak:

U odmjernu tikvicu od 50 mL je stavljeno 5 mL uzorka čaja koji je razrijeđen s demineraliziranom vodom do 50 mL (odnos čaja i vode je 1:10). Uzorak je prebačen u tikvicu kruškastog oblika od 50 mL i neutraliziran s 0.1 M NaOH. U Erlenmeyer tikvicu od 100 ml, u koju će se hvatati destilat, stavljeno je 10 mL otopine kalijevog bikromata i 5 ml koncentrirane  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Destilat se preko hladila i lule uvodi u otopinu kalijevog bikromata u Erlenmeyer tikvicu od 100 mL, koja mora biti u rashlađenoj vodi. Destilacija mora biti polagana i postupna i trajala je dok se sadržaj u tikvici za destilaciju nije smanjio na približno 3 mL (za to vrijeme je alkohol predestilirao). Po završetku destilacije lula je isprana s nekoliko mlazova destilirane vode u istu Erlenmeyer tikvicu u koju je uzorak predestilirao. Sadržaj tikvice je promućkan, začepljen gumenim čepom i ostavljen stajati 5 minuta radi potpune oksidacije alkohola. Tijekom oksidacije alkohola utrošen je jedan dio bikromata, dok je drugi dio ostao u suvišku. Zatim je sadržaj kvantitativno prebačen u Erlenmeyer tikvicu od

500 mL uz ispiranje, dodano mu je oko 200 mL destilirane vode radi razrjeđenja i 10 mL 20%-tne otopine KI (radi određivanja preostale količine kalijevog bikromata) i ostavljeno začepljeno 5 minuta.

Tada dolazi do oksido-redukcijske reakcije između preostalog kalijevog bikromata i KI: krom se iz šesterovalentnog reducira u trovalentni, a jod iz KI se oksidira u elementarni jod, zbog čega otopina dobije tamnu boju. Pritom se elementarni jod oslobađa u količini ekvivalentnoj kalijevom bikromatu.

Nakon 5 minuta, uzorci su titrirani s 0,1 M otopinom natrijevog tiosulfata ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ), pri čemu dolazi do oksidoredukcije između joda i natrijevog tiosulfata, u kojoj se jod reducira, a tiosulfat oksidira. Kad je boja postala svjetlija, dodano je 5 mL 1%-tne otopine škroba i titrirano do pojave tirkizno-zelene boje.

Koncentracija (vol %) alkohola je izračunata prema jednadžbi:

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

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

### 3.2.9. Izračunavanje mase i prinosa celulozne biomase

Nakon 14 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 1 M NaOH na sobnoj temperaturi kako bi se uklonile stanice mikroorganizama i sastojci podloga. Nakon toga su gelovi bakterijske celuloze ispirani demineraliziranom vodom sve dok pH vode za ispiranje nije dostigao početnu vrijednost vode (Toda i sur., 1991). 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. Izmjerena je masa celulozne biomase (g) prema sljedećoj formuli:

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

gdje je:

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

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

$m_i$  = masa inokuluma (g)



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

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

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

Svi istraživani uzorci pripremljeni su u staklenim posudama sljedećih dimenzija:

a) Kemijski definirana podloga

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

b) Kompleksna podloga (čaj)

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

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

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

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

Kapacitet zadržavanja vode bakterijske celuloze određivan je nakon 12 dana fermentacije. Biomasa 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 (uklanjanje slobodne vode), nakon čega je sušena 12 h pri 60 °C u suhom sterilizatoru, kako bi se u potpunosti uklonila vezana voda. Kapacitet zadržavanja vode (WHC) je izračunat prema formuli (Shezad i sur., 2010):

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

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

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

### **3.2.13. FT-IR spektroskopija**

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

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

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

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

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

#### Postupak:

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

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

Slijepa proba (sve isto osim celuloze).

Količina apsorbiranog joda je izračunata prema jednadžbi:

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

gdje je:

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

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

m – masa uzorka (g)

w – udjel vlage (%)

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

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

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

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 nacijepljen test-mikroorganizam, postavljeni su diskovi s određenim antimikrobnim agansom. 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 mikroorganizmu s antimikrobnim djelovanjem.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Bakterijska celuloza ima vrlo široku primjenu u područjima biotehnologije, biomedicine, biofarmaceutike i prehrane zbog svoje jedinstvene čistoće i fizikalno-kemijskih svojstava. U prehrambenoj se industriji bakterijska celuloza koristi kao izvor vlakana, zgušnjivač i stabilizator u različitim slabo masnim ili potpuno nemasnim proizvodima (Goh i sur., 2012).

*Kombucha* je fermentirani napitak koji se više od dva tisućljeća tradicionalno priprema i konzumira u zemljama dalekog Istoka, no u posljednjih je nekoliko desetljeća vrlo traženi napitak diljem svijeta (Blanc, 1996). Dobiva se fermentacijom zaslađenog čaja, najčešće crnog i zelenog, pomoću simbiotski združene kulture bakterija octene kiseline iz roda *Acetobacter* i različitih rodova osmofilnih kvasaca (*Brettanomyces*, *Pichia Zygosaccharomyces* i *Saccharomyces*) (Teoh i sur., 2004). Fermentacija se odvija na sobnoj temperaturi od 7 do 14 dana. *Kombucha* ima okus po jabukovači, no taj se okus tijekom fermentacije mijenja od slatkastog i blago kiselog do izrazito kiselog, octenog okusa, koji nastaje kao posljedica produžene fermentacije (Blanc, 1996).

Napitak je vrlo složenog sastava, a glavni proizvodi koji nastaju metabolizmom izvora ugljika u hranjivoj podlozi na koju je nacijepljena kultura *kombuche* su monosaharidi, polifenoli ekstrahirani iz čaja, organske kiseline, etanol, u vodi topljivi vitamini i različiti mikronutrijenti koji nastaju tijekom fermentacije (Chen i Liu, 2000; Malbaša i sur., 2008). Tijekom fermentacije, već nakon 24 h, vidljiva je tanka plutajuća opna (pelikula) koja se stvara na površini hranjive podloge, a tijekom fermentacije se svakodnevno udvostručava, stvarajući slojevitou strukturu bakterijske celuloze (Greenwalt i sur., 2000).

U ovom su radu provedena sveobuhvatna istraživanja biokemijskih promjena koje se događaju tijekom biotransformacije simbiotski združene kulture bakterija octene kiseline i kvasaca (*kombucha*) u fermentirani napitak i bakterijsku celulozu. Tijekom istraživanja su određivane koncentracije metabolizmom proizvedenih organskih kiselina (octene i glukonske), kao i koncentracije EtOH. Usporedno je praćena sinteza bakterijske celuloze tijekom statične fermentacije biljnog čaja s okusom crnog ribiza i četiri vrste kemijski definiranih podloga s različitim izvorima ugljika (glukoza, maltoza, fruktoza i glicerol). Fermentacija je vođena 14 dana na sobnoj temperaturi, pri čemu su uzorci izuzimani svakih 24 sata. Tijekom istraživanja, praćene su relevantne varijable, kao što su utjecaj pH vrijednosti hranjivih podloga i različitih izvora ugljika na koncentraciju sintetiziranih organskih kiselina i prinos bakterijske celuloze. Fermentacije su bile provedene u statičnim uvjetima pa je jedan od ciljeva bio istražiti utjecaj površine i volumena posuda za uzgoj na prinos sintetizirane bakterijske celuloze. Budući da bakterijska celuloza ima nevjerovatnu

sposobnost vezanja tekućine u svoju strukturu, proučavana je sposobnost vezanja i otpuštanja vode, a u konačnici je bila istraživana antimikrobna aktivnost hranjive podloge prema Gram negativnim bakterijama.

#### **4.1. Organske kiseline i etanol**

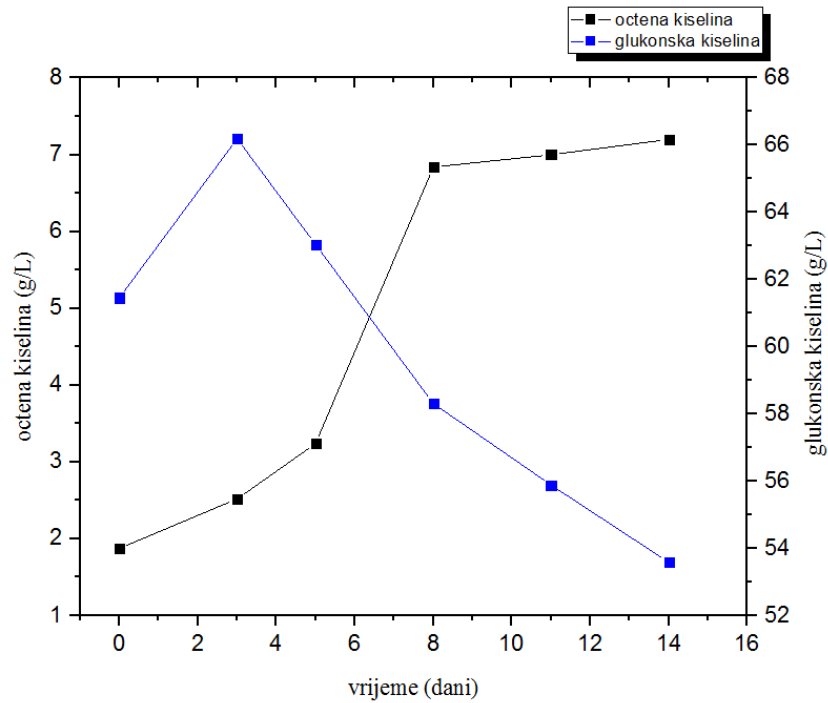
##### **4.1.1. Kompleksna podloga - čaj**

Tijekom fermentacije, bakterije i kvasci metaboliziraju različite izvore ugljika do organskih kiselina, uglavnom do octene i glukonske koje nastaju u većim koncentracijama, a u vrlo malim, do 1 g/L, glukuronske, mliječne i limunske (Jayabalan i sur., 2007). Invertaza iz kvašćevih stanica hidrolizira saharozu do glukoze i fruktoze i putem glikolize dolazi do proizvodnje etanola, nakon čega bakterije octene kiseline koriste glukozu za proizvodnju glukonske kiseline i etanol za proizvodnju octene kiseline.

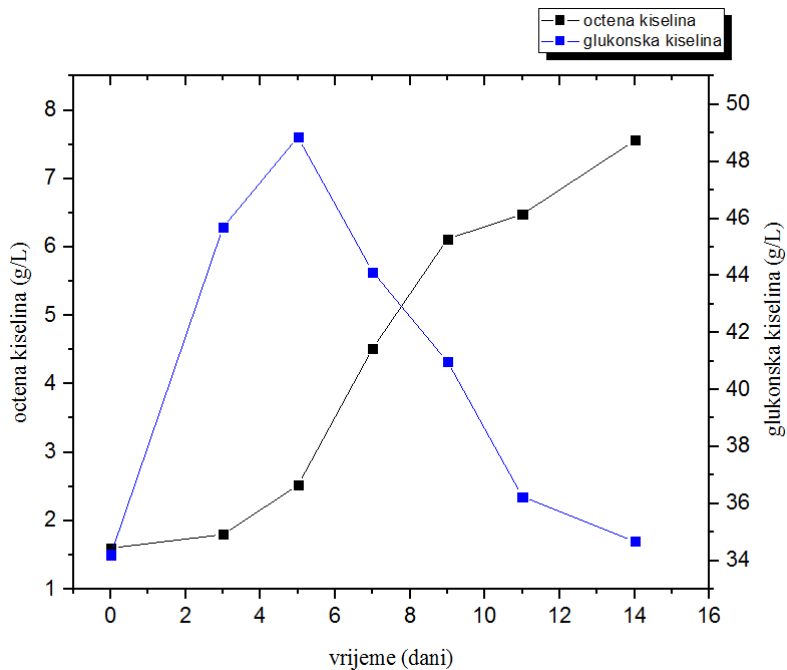
Koncentracija sintetiziranih organskih kiselina mijenjala se tijekom fermentacije što je prikazano na Slikama 11-14. Koncentracija octene kiseline se tijekom 14 dana fermentacije, ovisno o koncentraciji dodane saharoze, povećavala od 1,8 g/L na početku istraživanja do 7,2 g/L na kraju (60 g/L), pri čemu je linearni rast koncentracije izmjeren do 8 dana fermentacije, nakon čega se koncentracija nije značajno mijenjala (Slika 11.). Pri koncentracijama od 80 i 120 g/L primijećen je linearni rast koncentracije octene kiseline tijekom cijelog tijeka fermentacije, no konačne su se koncentracije vrlo razlikovale, pa je pri 80 g/L izmjereno 7,56 g/L (Slika 12.), a pri 120 g/L 11,52 g/L (Slika 14.). Kod fermentacije sa 100 g/L saharoze uočen je blagi rast koncentracije octene kiseline sve do 12-tog dana, nakon čega je naglo porasla i na kraju fermentacije je iznosila 11,52 g/L (Slika 13.). Uz sposobnost sinteze relativno visokih koncentracija octene kiseline, bakterije octene kiseline pokazuju i toleranciju na kiselost, što je rijetkost među aerobnim homotrofima i heterotrofima. Ovo im svojstvo omogućava rast na hranjivoj podlozi koja već na početku uzgoja ima pH vrijednost nižu od 4,5 (Malbaša i sur., 2008), a u ovom radu je početna koncentracija octene kiseline bila 1,8 g/L jer je s bakterijskom celulozom uzgojenom u crnom čaju dodana i matična kultura iz prethodnog uzgoja, koja sadrži ocat.

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 11., koncentracija glukonske kiseline bila je veća 4 puta od koncentracije octene kiseline nakon 2 dana fermentacije (60 g/L), no ta je koncentracija

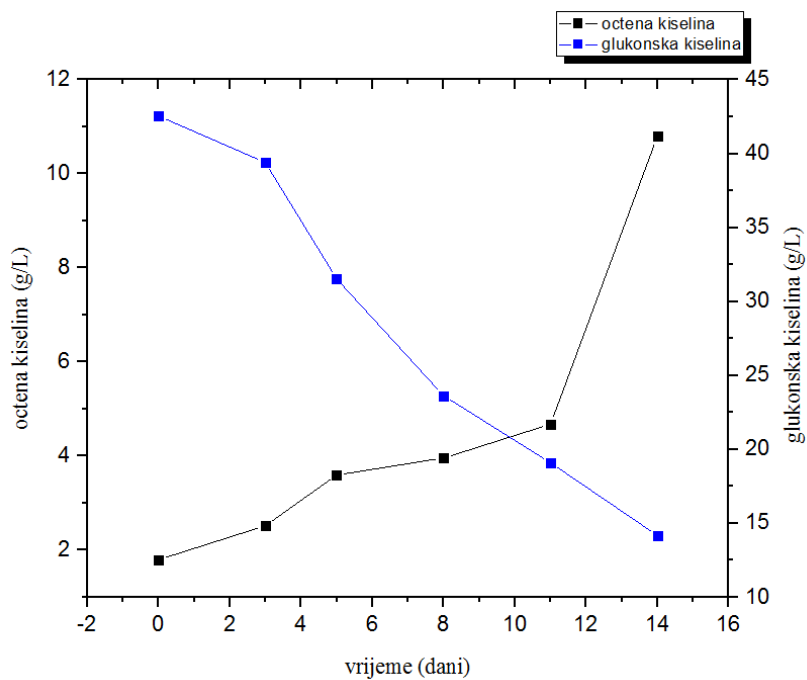
padala tijekom fermentacije. Isti su rezultati dobiveni tijekom fermentacija s većim koncentracijama šećere, pri kojima je određena visoka koncentracija glukonske kiseline na početku fermentacija i linearni pad do kraja pokusa (Slike 12-14).



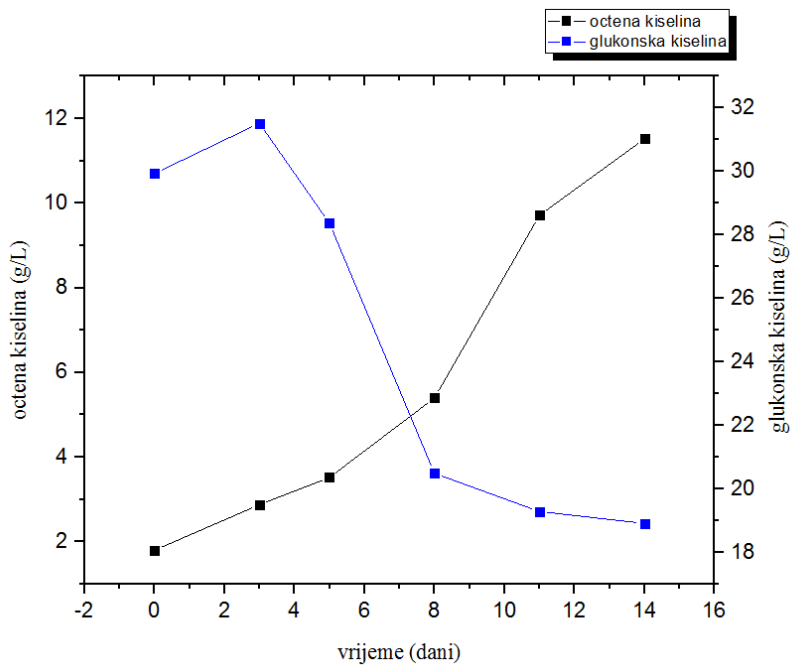
**Slika 11.** Kinetika nastajanja octene i glukonske kiseline tijekom 14 dana fermentacije *kombucha* čaja od ribiza (60 g/L saharoze).



**Slika 12.** Kinetika nastajanja octene i glukonske kiseline tijekom 14 dana fermentacije *kombucha* čaja od ribiza (80 g/L saharoze).



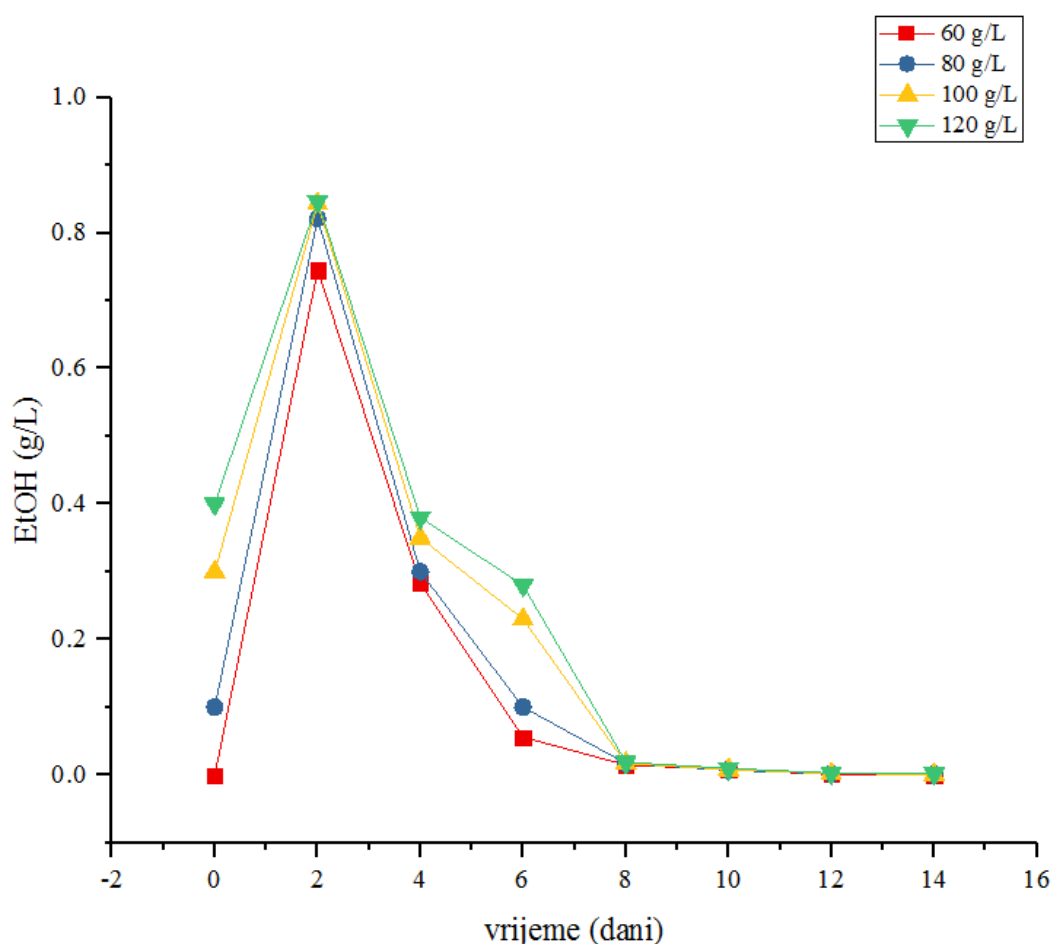
**Slika 13.** Kinetika nastajanja octene i glukonske kiseline tijekom 14 dana fermentacije kombucha čaja od ribiza (100 g/L saharoze).



**Slika 14.** Kinetika nastajanja octene i glukonske kiseline tijekom 14 dana fermentacije kombucha čaja od ribiza (120 g/L saharoze).



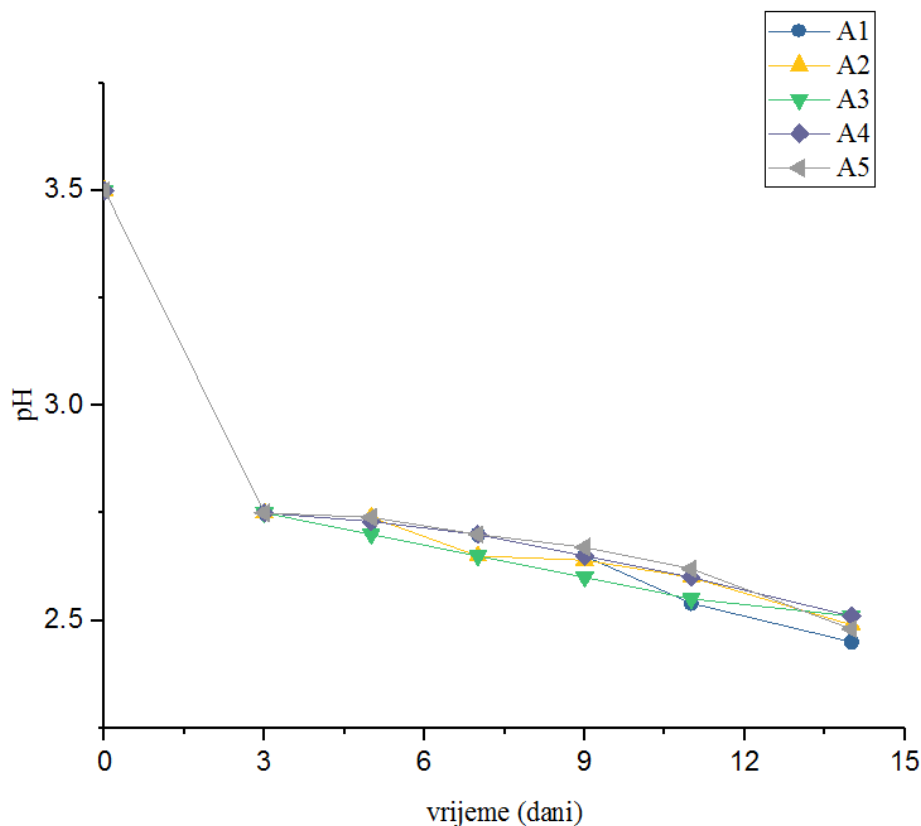
Prema većini autora, koncentracija EtOH u *kombucha* napitcima nije veća od 1% (vol/vol) (Teoh i sur., 2004). Sievers i sur. (1995) su nakon 10 dana fermentacije izmjerili 0,36% EtOH, uz početnih 70 g/L saharoze u hranjivoj podlozi. Za razliku od navedenih autora, Chen i Liu (2000) su objavili da se koncentracija alkohola povećavala s vremenom uzgoja i dostigla 5,5 g/L nakon 5 dana, nakon čega je slijedio blagi pad. U ovom radu su u čaj dodane različite koncentracije saharoze (60; 80; 100 i 120 g/L) i već u 2. danu fermentacije, izmjerena je maksimalna i podjednaka koncentracija EtOH bez obzira na koncentraciju šećera u kompleksnoj podlozi (od 0,77 do 0,84 g/L), koja se linearno smanjivala do 8. dana uzgoja na 0,02 g/L, a nakon toga je pala na manje od 0,01 g/L i zadržala se na tim vrijednostima do kraja fermentacije (Slika 15.).



**Slika 15.** Kinetika nastajanja etanola tijekom 14 dana fermentacije *kombucha* čaja od crnog ribiza.

Konačna pH vrijednost fermentiranog čaja nakon 14 dana uzgoja je bio između 2,5 i 2,65, što je puno manja vrijednost od optimalne pH vrijednosti za rast kvasaca (pH 4.8-5,2). Porastom koncentracije organskih kiselina pH vrijednost fermentiranog čaja pada, tako da je u ovom radu pH vrijednost s početnih 3,5 do kraja istraživanja postupno pala na 2.6 (Slika 16.). Prema Hwang i suradnicima (1999), konverzija glukoze u glukonsku kiselinu rezultira značajnim smanjenjem pH vrijednosti tijekom fermentacije.

Optimalna pH vrijednost za rast bakterija iz roda *Acetobacter* je između 5,4 i 6,3. Rast se odvija i pri nižim pH vrijednostima, od 4,0 do 4,5, a minimalni rast je zabilježen pri pH 7,0 do 8,0 (Bergey i Holt, 1994). Rezultati dobiveni ovim istraživanjem ukazuju da su bakterije octene kiseline iz *kombuche*, sposobne rasti, proizvoditi organske kiseline i bakterijsku celulozu čak i pri pH vrijednostima nižim od 2,7 (Slika 16.).



**Slika 16.** Promjena pH vrijednosti čaja tijekom 14 dana fermentacije.

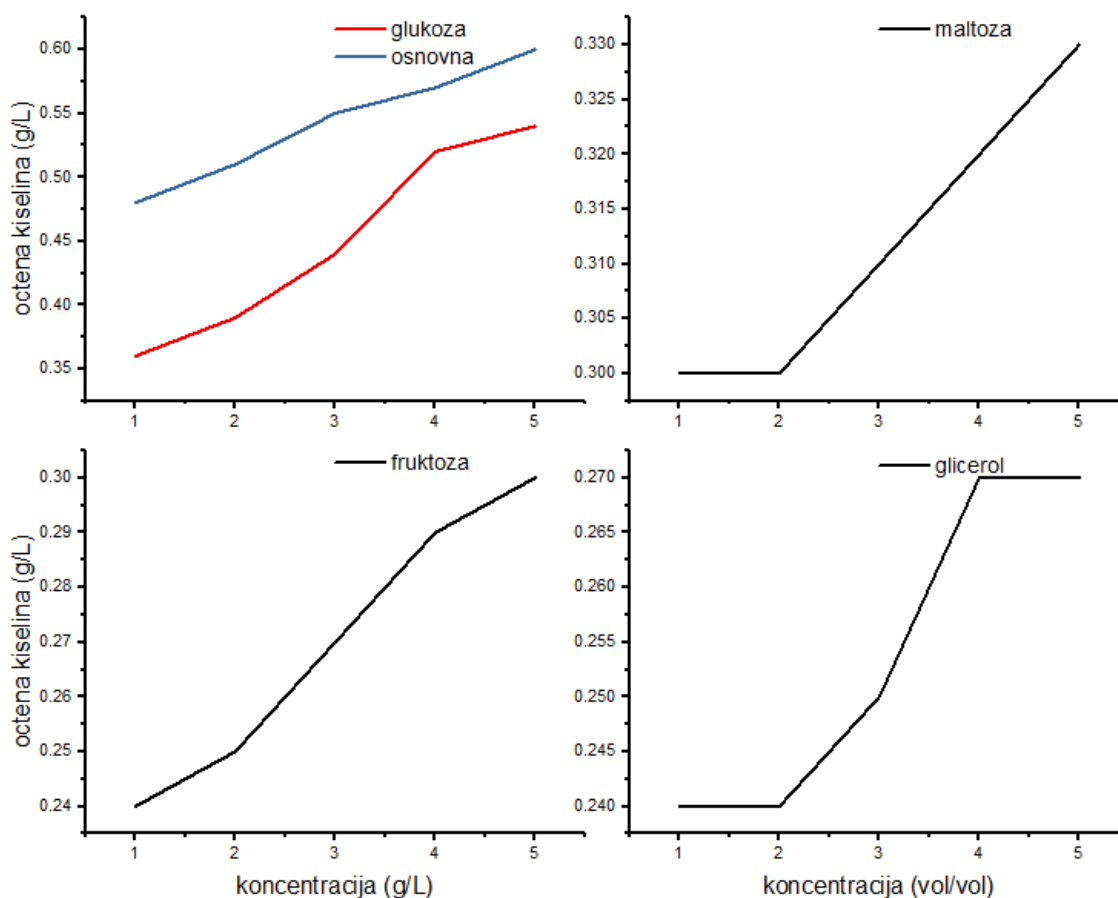
Važno je napomenuti da su uzorci naciepljene *kombuche* uzgojeni tradicionalnim načinom, pri čemu nije bio određivan mikrobiološki sastav uzoraka. Upravo zbog ovog razloga određeno odstupanje između dobivenih rezultata u ovom radu i objavljenih u literaturi

može biti posljedica različitosti mikroflore koja je posljedica izvorišta *kombuche*. Mayster i sur. (1995) su objavili rezultate svojih istraživanja provedenih na 41. uzorku *kombuche* u Njemačkoj, prema kojima su se svi razlikovali po svom mikrobiološkom sastavu. Zaključili su da je mikrobiološki sastav tradicionalne *kombuche* puno kompleksniji od ciljano odabranih simbiotskih čistih kultura kvasaca i bakterija octene kiseline (Teoh i sur., 2004).

#### 4.1.2. Kemijski definirane podloge

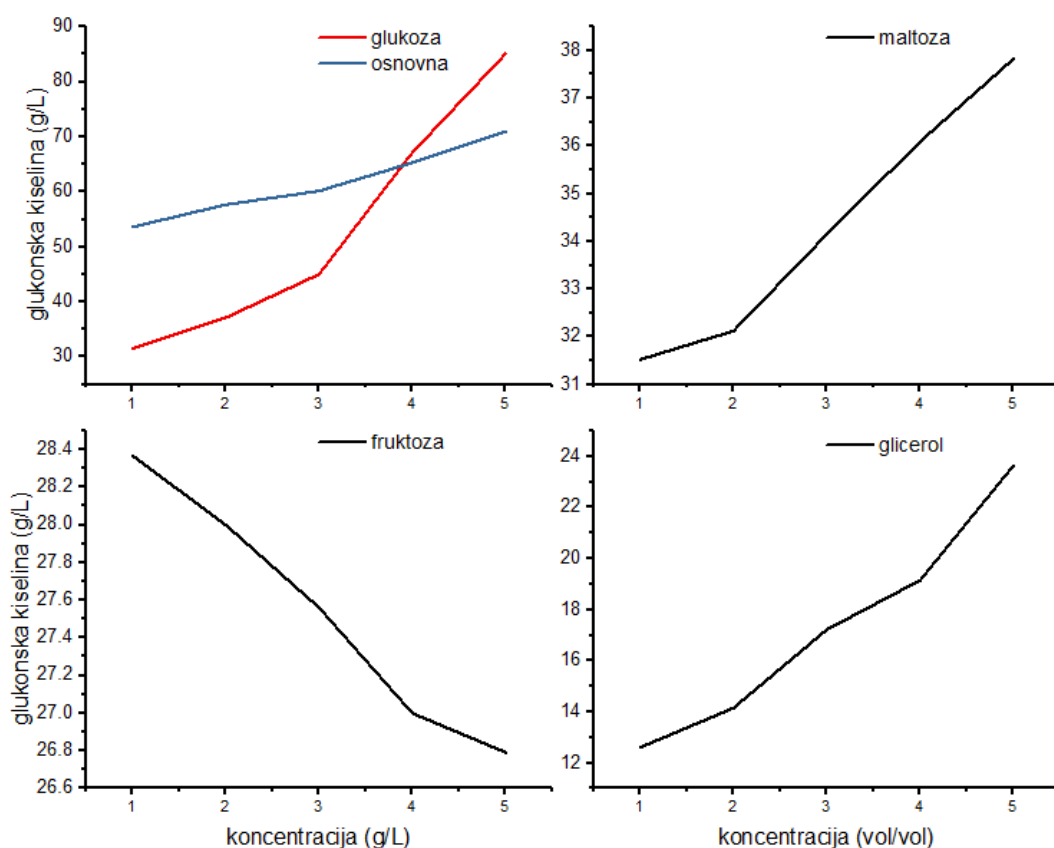
Svaka hranjiva podloga, radi li se o kompleksnoj (prirodnoj, u ovom radu čaj od crnog ribiza) ili kemijski definiranoj, mora sadržavati izvore ugljika, dušika, te mikro i makronutrijente potrebne za rast mikroorganizama. Svaka promjena u sastavu hranjive podloge može imati utjecaj na rast radnog mikroorganizma, a time i neizravno ili izravno na nastajanje proizvoda metabolizma. Za uzgoj *kombuche* se najčešće kao izvori ugljika koriste saharoza ili glukoza, no u posljednje se vrijeme mogu u literaturi pronaći i drugi izvori ugljika, kao što su fruktoza, maltoza, ksiloza i šećerni alkoholi (Chawla i sur., 2009). Kemijski definirane podloge po svom su sastavu složenije jer mogu sadržavati određene amino kiseline i vitamine za poboljšanje staničnog rasta i bolji prinos metabolita (Matsuoka i sur., 1996).

U ovom radu su istraživani utjecaji različitih koncentracija glukoze, maltoze, fruktoze i glicerola na nastajanje octene i glukonske kiseline, glavnih organskih kiselina koje nastaju tijekom fermentacije *kombuche* (Slika 17. i 18.). Na Slici 17. je vidljivo da se s povećanjem koncentracije svih izvora ugljika u podlozi linearno povećavala koncentracija octene kiseline, no dodatkom maltoze, to je linearno povećanje zabilježeno u podlogama s 2 – 5 g/L, dok je kod 1 g/L primijećen „platò“, odnosno najniža koncentracija octene kiseline. Vrlo slični rezultati određeni su i kod dodatka glicerola kao izvora ugljika u hranjivu podlogu, no istraživanje je pokazalo da između 4 i 5 (vol/vol) dodanog glicerola nije bilo razlike u koncentraciji octene kiseline (Slika 17.). Također se na slici može uočiti da je u podlozi s glukozom određena najveća koncentracija octene kiseline 0,52 g/L, dok su u podlogama s glicerolom, fruktozom i maltozom izmjerene podjednake koncentracije od 0,27 do 0,33 g/L.



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

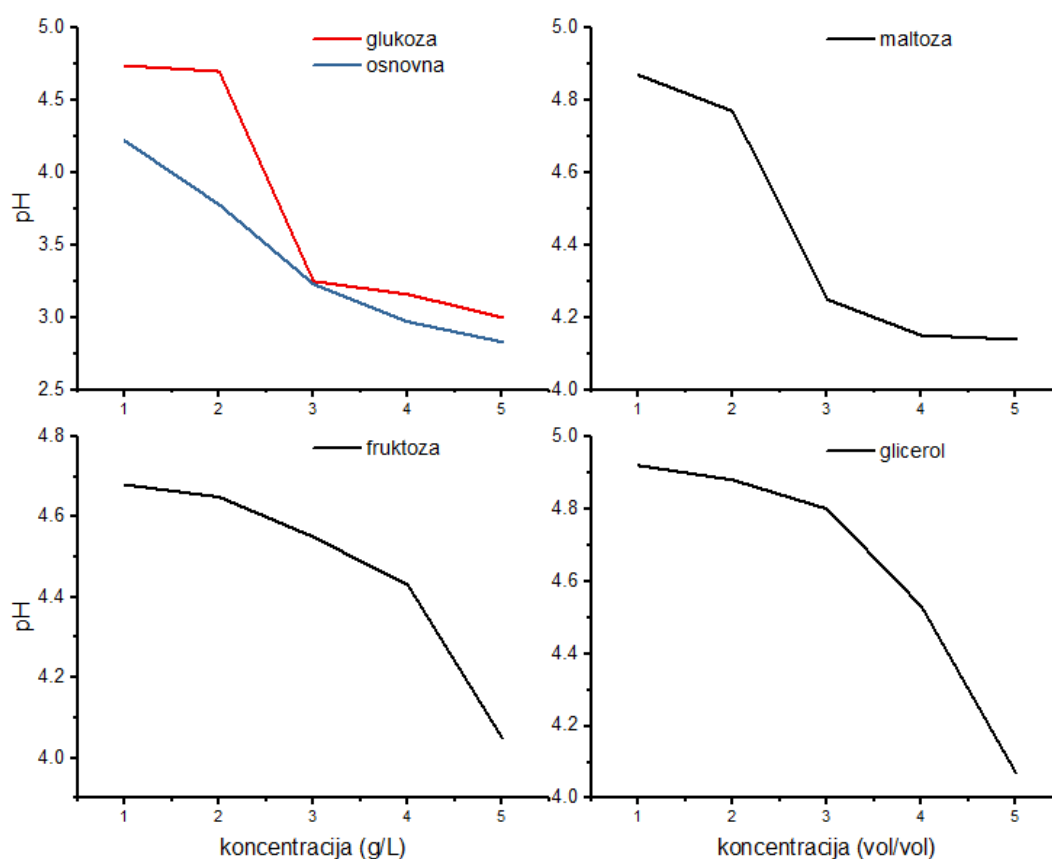
Koncentracija octene kiseline izmjerena je u puno manjim koncentracijama od glukonske kiseline, no učinak glukoze, maltoze i glicerola na nastajanje glukonske kiseline bio je potpuno isti (Slika 18.). Jedino je u podlozi s fruktozom zabilježen linearni pad koncentracije glukonske kiseline ovisno o koncentraciji izvora ugljika. Početna koncentracija izvora ugljika u podlozi je izrazito važan parametar za nastajanje glukonske kiseline jer rezultira snižavanjem pH hranjive podloge, a samim tim smanjenjem brzine i produktivnost sinteze bakterijske celuloze (Masaoka i sur., 1993).



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

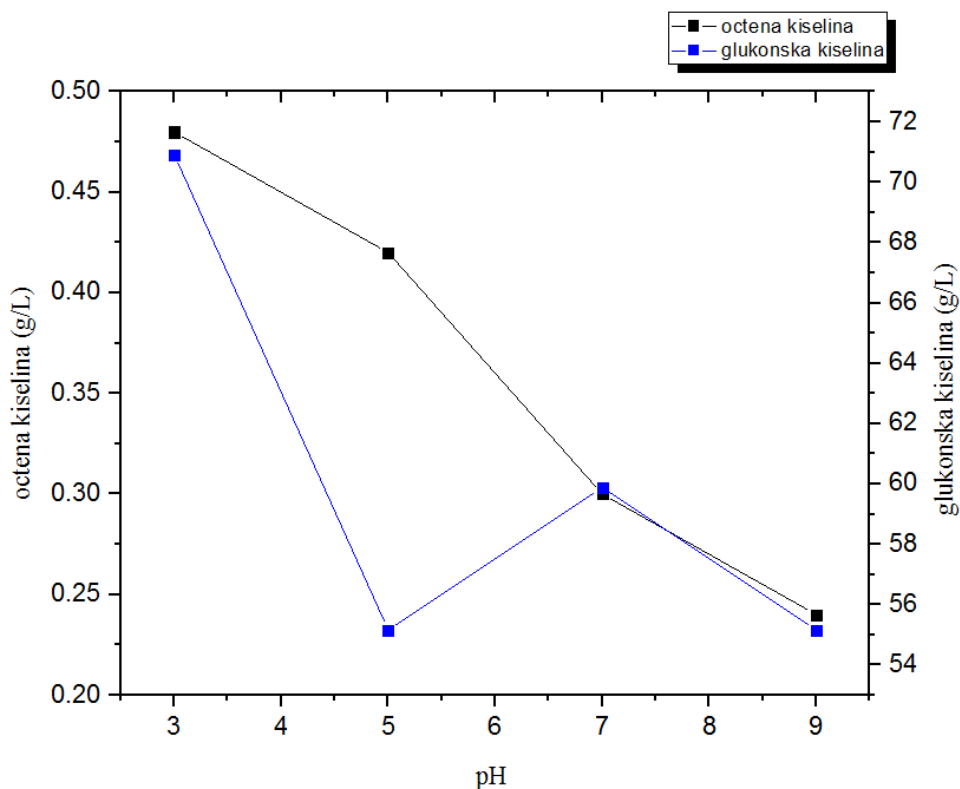
Tijekom fermentacije *kombuche* pH vrijednost bilo koje podloge se snižava zbog nastajanja organskih kiselina (Mikkelsen i sur., 2009). Kao posljedica povećanja koncentracije octene i glukonske kiseline u fermentacijskoj podlozi, pH vrijednost se najčešće snižava s početne vrijednosti 5 na 3 tijekom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

Hestrin-Schramm (1954) hranjiva podloga je referentna podloga za uzgoj *kombuche*. U ovom radu je provedena fermentacija s *kombuchom* u Hestrin-Schramm osnovnoj tekućoj podlozi s različitim pH vrijednostima da bi se istražio utjecaj pH na nastajanje organskih kiselina (Slika 19).



**Slika 19.** Promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije *kombuche* u kemijski definiranim podlogama.

Promjena pH vrijednosti tijekom uzgoja *kombuche* u kompleksnim podlogama mijenja se ovisno o koncentraciji nastalih organskih kiselina (Mikkelsen i sur., 2009). U ovom radu željelo se istražiti kako pH hranjive kemijski definirane podloge utječe na nastajanje octene i glukonske kiseline (Slika 20.). Na Slici 17. je vidljivo da je najveća koncentracija octene kiseline (0,47 g/L) izmjerena pri niskoj pH vrijednost podloge (Slika 19.), jedva zamjetno manja koncentracija (0,42 g/L) dobivena je fermentacijom pri pH 5, a nakon toga je linearno padala sve do 0,24 g/L pri pH 9. Koncentracija glukonske kiseline pri pH 3 je također najviša (71 g/L), no već kod pH 5 je određena najniža koncentracija od 55 g/L, a ta je koncentracija glukonske kiseline izmjerena i pri pH 9,0. Kod pH 7,0 je opažena oscilacija u koncentraciji glukonske kiseline, gdje je ponovno izmjerena viša vrijednost (60 g/L).

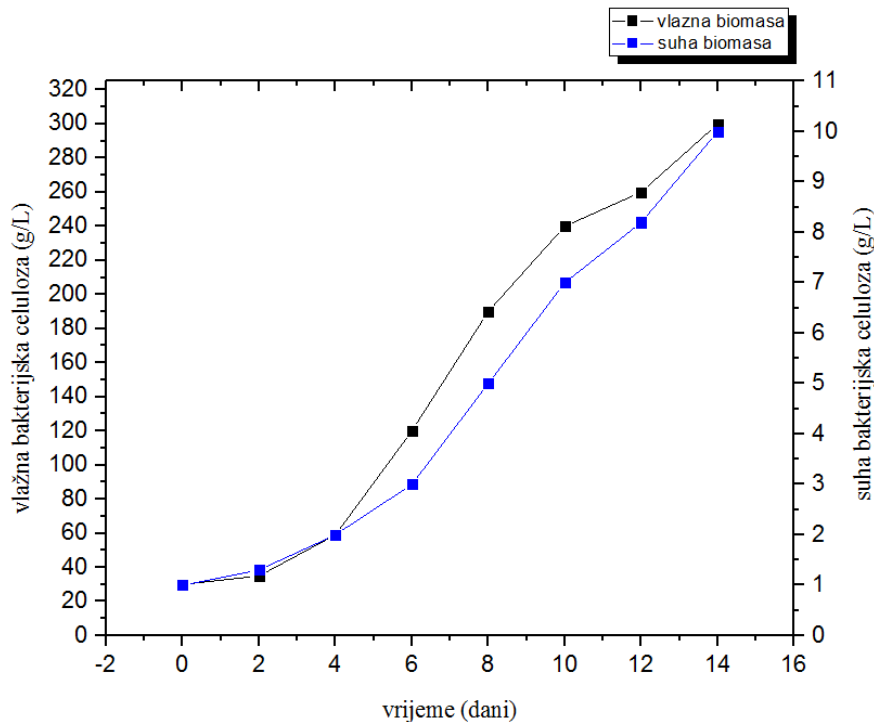


**Slika 20.** Utjecaj pH vrijednosti kemijski definirane osnovne podloge na nastajanje octene i glukonske kiseline.

Istraživanjima je dokazano je da optimalna pH vrijednost za proizvodnju bakterijske celuloze ovisi o vrsti bakterija octene kiseline, no interval u kojem se te vrijednosti kreću je između 4 i 7, a prema Son i sur. (2001), najbolji rezultati su dobiveni pri pH 6,5. U ovom radu se pH vrijednost 5,0 pokazala najboljom za uzgoj i proizvodnju bakterijske celuloze (Slika 19.). Iz slike je vidljivo da su podjednaki rezultati postignuti pri pH 3 i pH 7, dakle i pri kiselom i neutralnom pH okruženju, bakterijska je celuloza sintetizirana podjednako. No, pri industrijskoj proizvodnji bakterijske celuloze za biomedicinske primjene (Biofill i Gengiflex), pH mora biti održavan na niskim vrijednostima, između 4 i 4,5, kako bi se izbjegle moguće kontaminacije podloge tijekom uzgoja (Jonas i Farah, 1998). Također je važno napomenuti da se pH vrijednost tijekom uzgoja može sniziti zbog nakupljanja sekundarnih metabolita, uglavnom organskih kiselina (octena, glukonska, mliječna). Zbog toga je u industrijskoj proizvodnji bakterijske celuloze izrazito važno održavanje pH podloge na vrijednosti na kojoj se postiže maksimalni prinos bakterijske celuloze, uz minimalnu mogućnost kontaminacije.

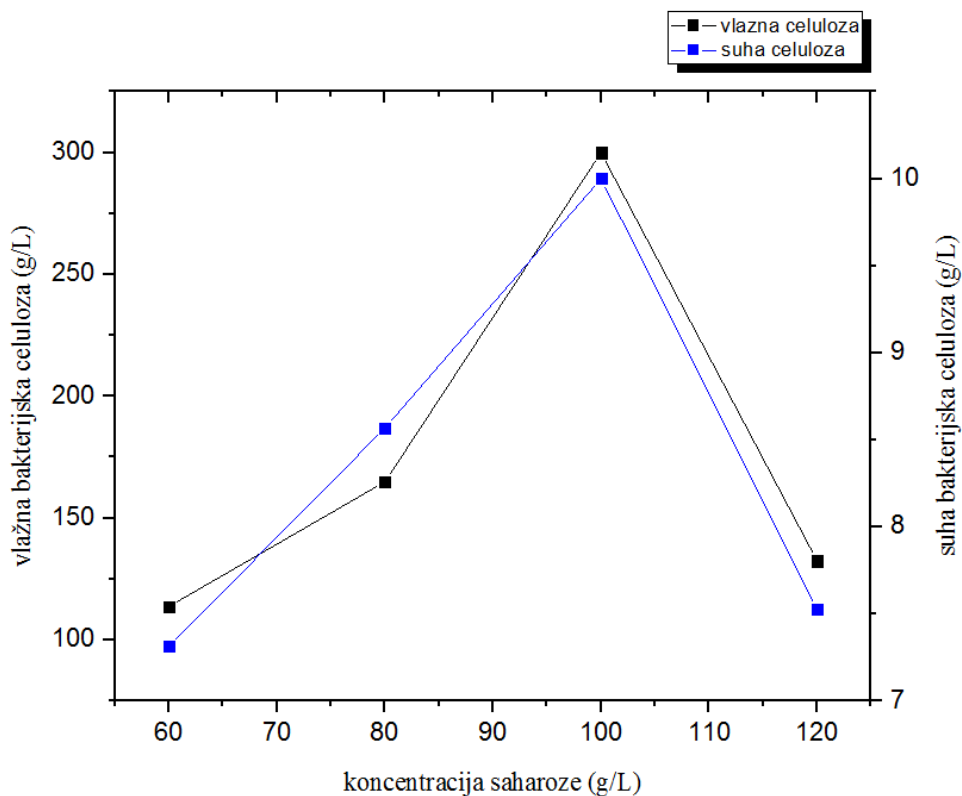
## 4.2. Sinteza bakterijske celuloze

Biotransformacijom zaslađenog čaja tijekom fermentacije nastaje celulozna opna koja se u tankom sloju oblikuje na površini tekućine (Sievers i sur., 1995). Na površini celulozne pelikule nalazi se veliki broj bakterija octene kiseline, striktnih aeroba, kojima je za rast i razmnožavanje nužan atmosferski kisik, dok su s donje strane nakupine kvasaca, koji pripadaju fakultativno anaerobnim mikroorganizmima (Malbaša i sur., 2008). Na Slici 21. prikazana je kinetika nastajanja bakterijske celuloze iz koje je vidljivo linearno povećanje mase celuloze tijekom 14 dana uzgoja. Prinos biomase tijekom fermentacije je usko povezan s izvorom ugljika, odnosno supstratom. Prema dobivenim rezultatima, saharoza (100 g/L) je izvrsni supstrat jer je nakon 14 dana fermentacije izmjereno 300 g/L vlažne bakterijske celuloze, odnosno 10 g/L suhe bakterijske biomase (Slika 22.).



**Slika 21.** Utjecaj trajanja fermentacije na sintezu bakterijske celuloze u čaju od crnog ribiza (100 g/L saharoze).





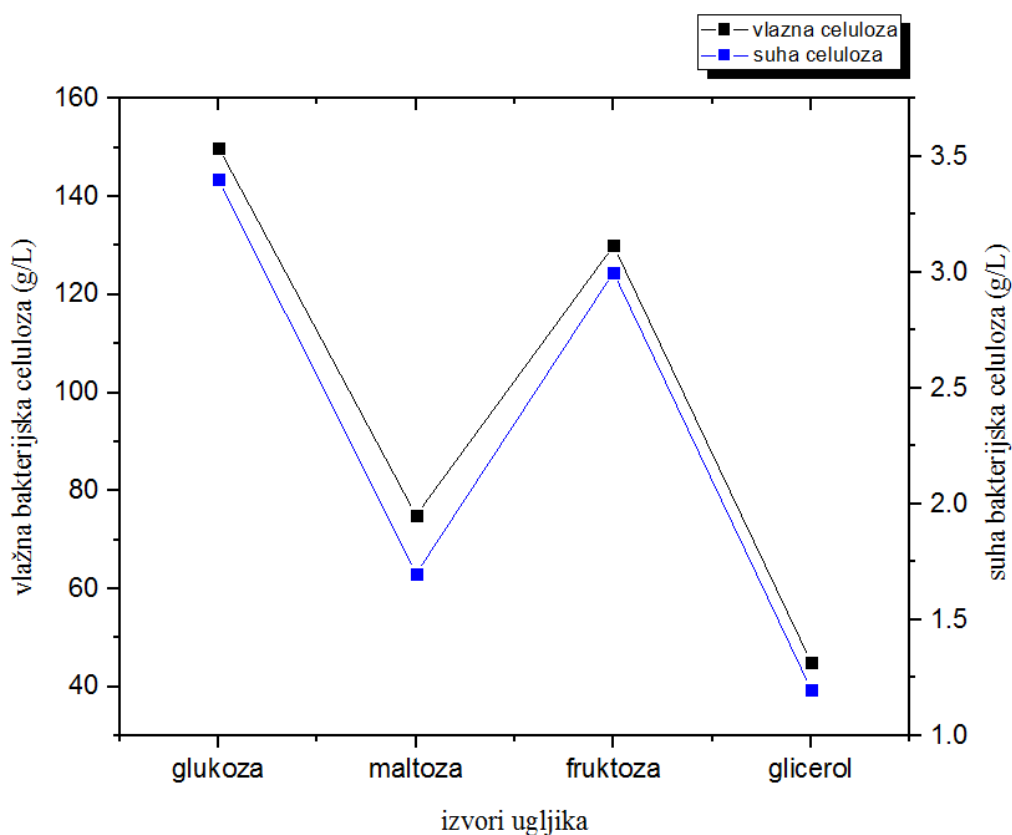
**Slika 22.** Odnos vlažne i suhe bakterijske celuloze sintetizirane nakon 14 dana fermentacije čaja od crnog ribiza s različitim koncentracijama saharoze.

Posljednjih dva desetljeća intenzivno su proučavani sastavi hranjivih podloga u kojima se postižu maksimalni prinosi bakterijske celuloze pomoću različitih sojeva bakterije *G. xylinus* (*A. xylinum*). Ta su se istraživanja većinom odnosila na izvore ugljika, koji mogu biti monosaharidi, disaharidi, oligosaharidi, alkoholi, šećerni alkoholi i organske kiseline (Masaoka i sur., 1993, 1996; Ishikara i sur., 2002; Keshk i Sameshima, 2005).

Prinos bakterijske celuloze rezultat je sposobnosti bakterija octene kiseline da apsorbiraju glukozu iz različitih supstrata s ugljikom, nakon čega polimeriziraju glukozu do celuloze. Bakterije octene kiseline posjeduju dva glavna operativna amfibolička puta: pentoza fosfatni put za oksidaciju ugljikohidrata i Krebsov ciklus za oksidaciju organskih kiselina i sličnih spojeva (Ross i sur., 1991).

Na Slici 23. prikazani su rezultati prinosa bakterijske celuloze ovisno o izvorima ugljika u hranjivim podlogama. Prema dobivenim rezultatima, glukozu se pokazala najboljim izvorom ugljika jer je izmjeren i najveći prinos vlažne biomase (151 g/L). Nakon glukoze, u

podlozi s fruktozom je zabilježen prinos od 136 g/L, dok su maltoza (75 g/L) i glicerol sa samo 48 g/L imali daleko manje prinose bakterijske celuloze.



**Slika 23.** Utjecaj različitih izvora ugljika u kemijski definiranim podlogama; glukoza, maltoza i fruktoza (20 g/L), glicerol (2 % vol/vol) na nastajanje bakterijske celuloze.

#### 4.3. Utjecaj površine i dubine hranjive podloge na proizvodnju bakterijske celuloze

Tijekom statične fermentacije, bakterijska celulozna pelikula se sintetizira na međufazi zraka i tekuće faze, te postaje vidljiva već nakon 24 h fermentacije kao prozirna opna (Iguchi i sur., 2000). Svakim se danom fermentacije stvara novi sloj bakterijske celuloze, no brzina stvaranja ovisi o površini i dubini posude u kojem je provedena fermentacija čaja s *kombuchom*. U ovom su radu provedena istraživanja u kojoj mjeri površina posude za uzgoj i dubina hranjive podloge utječu na kinetiku nastajanja bakterijske celuloze, upravo zbog toga što sintetizirana bakterijska celuloza poprima oblik posude u kojoj se uzgaja. Fermentacija *kombuche* u biljnom čaju s okusom crnog ribiza je provedena u šest

staklenih posuda (tegli) koje su se razlikovale po svom volumenu, obliku, visini i promjeru (Tablica 2).

**Tablica 2.** Utjecaj površine posude i dubine hranjive podloge na sintezu bakterijske celuloze nakon 14 dana fermentacije u čaju od crnog ribiza.

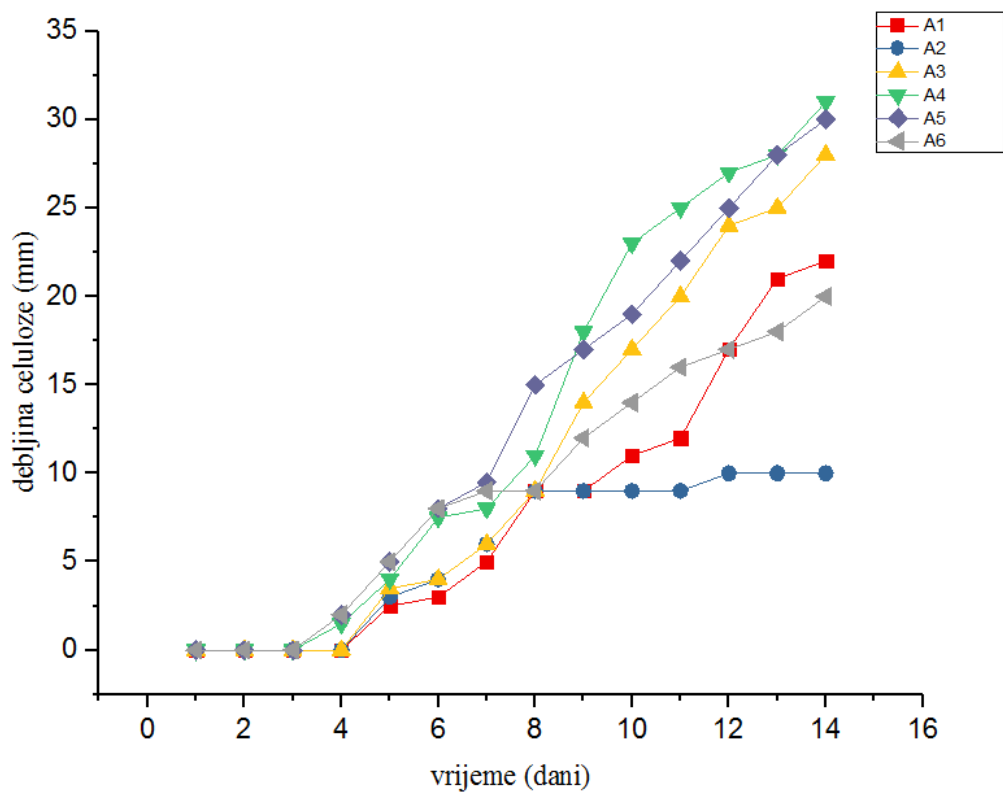
<b>Posuda</b>	<b>Volumen (mL) V</b>	<b>Konc. (g/L) c</b>	<b>Promjer (cm) d</b>	<b>Dubina (cm) h</b>	<b>Površina (cm<sup>2</sup>) a</b>	<b>Odnos a/h</b>	<b>Debljina bakterijske celuloze (mm)</b>
A1	720	60	9	12	77,10	6,425	24
A2	370	60	10	6,5	33,18	5,105	8
A3	1000	60	10	8	78,54	9,817	28
A4	1000	80	10	8	78,54	9,817	31
A5	1000	100	10	8	78,54	9,817	30
A6	1000	120	10	8	78,54	9,817	21

Iz Tablice 2. je vidljivo da je najmanja debljina bakterijske celuloze (8 mm) postignuta u teglici sa širokim otvorom (A2) pri koncentraciji saharoze 60 g/L, a tri i pol puta veći u visokoj i širokoj staklenoj tegli A1 (28 mm). Najveći prinosi su postignuti u širokim staklenim teglama A3-A6 (31 i 30 mm), a koncentracija dodanog šećera je bila 60-120 g/L. Prema dobivenim rezultatima, može se zaključiti da dubina hranjive podloge nema glavnu ulogu u sintezi bakterijske celuloze, kao što se to do sada moglo pročitati u znanstvenoj literaturi (Goh i sur., 2012), nego je važnija površina posude u kojoj se odvija fermentacija. Dobiveni rezultati mogu se usporediti s rezultatima Masaoka i sur. (1993), koji su također uočili da volumen hranjive podloge, odnosno visina u posudi, ne utječu na masu novonastale bakterijske celuloze, ali su uočili da je izostalo kontinuirano nastajanje slojeva celuloze u posudi s konusnim stijenama (konusnim tikvicama), što ukazuje na važnost oblika posude u kojoj se fermentacija odvija.

Goh i sur. (2012) su istraživali utjecaj dubine hranjive podloge na sintezu bakterijske celuloze u posudama s različitim volumenima i visinama. Uočili su da ako dubina, odnosno visina posude nije značajno različita, proizvodnja bakterijske celuloze ovisi uglavnom o volumenu hranjive podloge. Prema njima, kulture s većim volumenom hranjive podloge donose veći prinos bakterijske celuloze. Kao što je vidljivo iz Tablice 2., u posudi dubine 6,5 cm, prinos bakterijske celuloze je bio značajnije manji (8 mm) od svih prinosa postignutih u drugim posudama. Ovi se rezultati mogu objasniti time da stanice kvasca uz etanol proizvode i određene koncentracije CO<sub>2</sub>, koji se inkorporira u mrežastu strukturu bakterijske celuloze, čime smanjuje ili onemogućava dotok kisika koji je nužan za rast i razmnožavanje bakterija octene kiseline. Samim time što je posuda uža, manja je aktivna površina opskrbljena kisikom i, posljedično, sinteza bakterijske celuloze je usporena.

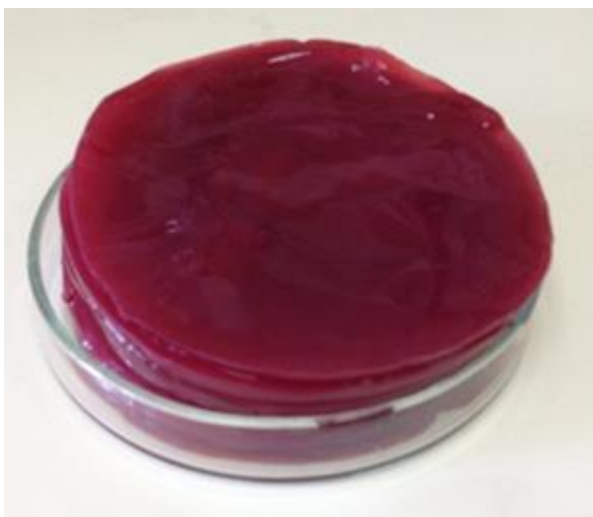
U ovom radu dobiveni rezultati pokazuju da odnos između površine i dubine hranjive podloge u određenoj posudi ima važnu ulogu u prinosu bakterijske celuloze. Zbog toga je važno, ako se žele postići veći prinosi bakterijske celuloze, biosintezu bakterijske celuloze pomoću simbiotske kulture provoditi u posudama sa širokim otvorima, zbog što boljeg pristupa kisika koji je potreban bakterijama octene kiseline za oksidaciju etanola u octenu kiselinu te sintezu bakterijske celuloze.

Iako je nakon 14 dana fermentacije najveća koncentracija sintetizirane bakterijske celuloze izmjerena u staklenim teglama sa širokim otvorom, mjerenjem visina novonastale celuloze svakih 24 sata, uočena je najbrža sinteza u staklenim bocama većih volumena (Slika 24.). Tek nakon 72 sata fermentacije u svim je uzorcima bilo vidljivo nastajanje tanke, prozirne opne na površini čaja. Ta se opna stvarala po sredini posuda, bez obzira na površinu, a do kraja 3. dana fermentacije širila se prema stijenkama staklenih posuda, sve dok nije u potpunosti popunila prostor i prekrila površinu čaja. Svakih 24 sata fermentacije su mjerene visine sintetiziranih bakterijskih celuloza jer se svakog dana sintetizira novi sloj pelikule.

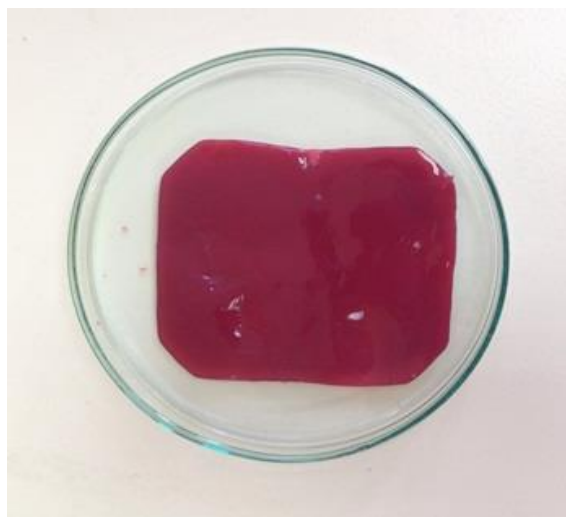


**Slika 24.** Kinetika sinteze bakterijske celuloze u čaju od crnog ribiza u posudama različitih dubina, volumena i koncentracija šećera.

Oblik posude u kojoj se uzaja bakterijska celuloza uvelike utječe na izgled sintetizirane pelikule. U ovom su radu korištene okrugle posude različitih volumena (A2-A6) i jedna oktogonalna posuda (A1). Na Slici 25. vidljivo je kako je sintetizirana bakterijska celuloza u potpunosti poprimila oktogonalni odnosno okrugli oblik posude u kojoj je uzgajana.



okrugla staklena tegla



oktogonalna staklena tegla

**Slika 25.** Sintetizirana bakterijska celuloza nakon 14 dana fermentacije *kombuche* u čaju od crnog ribiza.

Sinteza bakterijske celuloze počinje stvaranjem vrlo tanke opne (pelikule) koja se stvara svaki dan (Slika 26.) i u konačnici se dobiva višeslojna želatinozna struktura koja se sastoji od puno slojeva tankih pelikula (Slika 25.).



**Slika 26.** Prikaz tanke pelikule uzgojene bakterijske celuloze u čaju od crnog ribiza (osobna fotografija, Filip Herceg).

#### 4.4. Utjecaj površine bakterijske celuloze na kapacitet zadržavanja i brzinu otpuštanja vode

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

U ovom su radu provedeni testovi kojima su mjereni WHS i WHR kapaciteti sintetizirane bakterijske celuloze uzgojene u čaju od crnog ribiza. U Tablici 3. prikazani su rezultati mjerenja kapaciteta zadržavanja vode u uzorcima bakterijskih celuloza dobivenih uzgojem u različitim staklenim posudama, u biljnom čaju s okusom crnog ribiza.

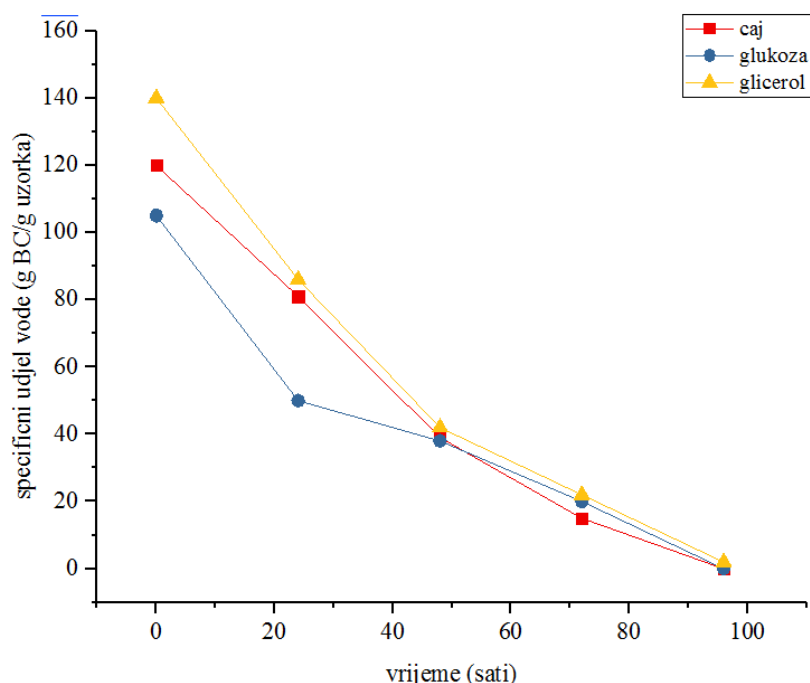
**Tablica 3.** Kapacitet zadržavanja vode bakterijske celuloze ovisno o specifičnoj površini.

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

Iz Tablice 3. je vidljivo da se, ovisno o specifičnoj površini sintetizirane bakterijske celuloze, rezultati kapaciteta zadržavanja vode variraju. Rezultati se mogu objasniti njihovom razlikom u specifičnoj površini i poroznosti strukture koja ovisi o supstratu dodanom u hranjivu podlogu. Matriks bakterijske celuloze se sastoji od ispreplitanih vlakana u kojima su molekule vode fizički „zarobljene“ na površini i u unutrašnjosti (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 (Guo i Catchmark, 2012). Rezultati dobiveni u ovom radu pokazali su da

se s povećanjem specifične površine bakterijske celuloze povećavao i kapacitet zadržavanja vode (Tablica 3).

Sposobnost otpuštanja vode drugo je važno svojstvo bakterijske celuloze. U ovom radu su istraživanja provedena na uzorcima bakterijske celuloze uzgojene u čaju (tegle) i u kemijski definiranim podlogama s dodatkom glukoze i glicerola (Erlenmeyer tikvica od 300 mL). Na Slici 27. prikazana je kinetika otpuštanja vode iz ova tri izabrana uzorka bakterijske celuloze tijekom 96 sati pokusa. Iz slike je vidljivo da je izmjereni specifični udjel vode u početku bio najveći u uzorku s glicerolom, slijedio je čaj, a najmanja vrijednost je izmjerena u uzorku ugojenom na glukozi, no nakon 48 sati vrijednosti su se izjednačile. Apsorbirana voda je za 96 sati iz uzoraka s glukozom i saharozom (čaj) potpuno evaporirala (ishlapila), dok je u uzorku bakterijske celuloze iz podloge s glicerolom ostalo 2 % vode vezane u matriksu.



**Slika 27.** Kinetika otpuštanja vode (WRR) tijekom 96 sati iz uzoraka bakterijske celuloze (BC) nakon 14 dana fermentacije u čaju od crnog ribiza i u kemijski definiranoj podlozi s dodatkom 5 % (tež/vol) glukoze i 5 % (vol/vol) glicerola.

Izlazak molekula vode iz matriksa bakterijske celuloze uglavnom ovisi o rasporedu mikrovlakana (Shezad i sur., 2010). Gusto pakirana mikrovlakna vežu molekule vode puno učinkovitije zbog jačih interakcija među vodikovim vezama u strukturi celuloznog matriksa (Shah i sur., 2010). Prema literaturnim podacima, i kapacitet zadržavanja vode (WHC) i brzina otpuštanja vode (WRR) su jako ovisni o strukturnim značajkama bakterijske celuloze, posebice o veličini i ukupnom volumenu pora. Uzorci s manjim promjerima pora mogu

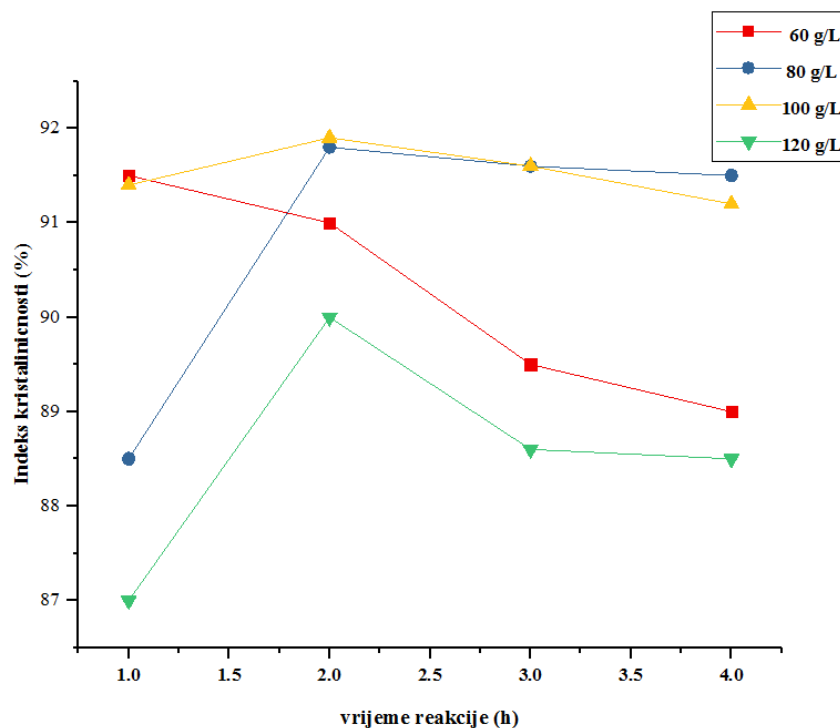


zadržati vodu u matriksu duže vrijeme, ali veći promjer pora znači da će uzorak akumulirati više vode i time povećati kapacitet zadržavanja vode (Ul-Islam i sur., 2012).

#### 4.5. Kristaliničnost i morfologija površine bakterijske celuloze

Kristalinična struktura je jedno od najvažnijih svojstava bakterijske celuloze, koja posjeduje bolja mehanička i međufazna svojstva od biljne celuloze. Njenu strukturu čine  $I_{\alpha}$  i  $I_{\beta}$  tipovi celuloze, pri čemu udjel bilo kojeg tipa celuloze varira ovisno o uvjetima uzgoja, različitosti hranjivih podloga, obliku i veličini posude ili reaktora u kojima se provodi uzgoj, pH vrijednosti hranjive podloge, a posebice o rodu, vrsti ili soju bakterija octene kiseline (Huang i sur., 2014).

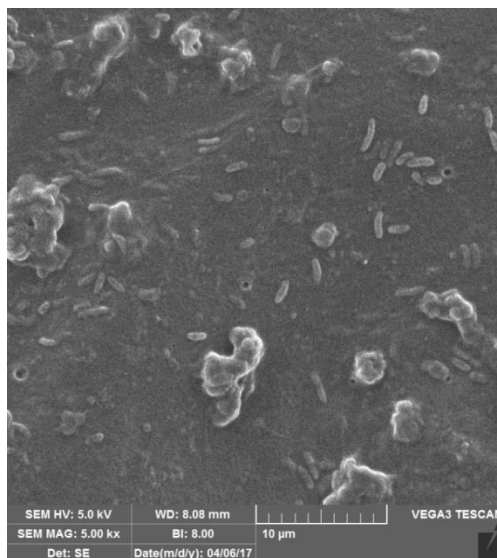
Test s jodnim brojem se općenito koristi kao osnovna empirijska metoda za mjerenje pristupačnosti amorfni dijelova celuloze prema vodenim otopinama. S obzirom da se jod inkorporira u amorfne dijelove molekule celuloze, inverzna vrijednost jodnog broja je razmjerna kristalnim dijelovima celuloze i izražava se kao indeks kristaliničnosti (Kreze i sur., 2005).



**Slika 28.** Kristaliničnost uzgojenih bakterijskih celuloza u čaju od crnog ribiza.

Indeks kristaliničnosti bakterijske celuloze uzgojene u čaju od crnog ribiza prikazan je u Slici 28. Dobiveni rezultati pokazuju da kristaliničnost bakterijske celuloze varira ovisno o koncentraciji dodane saharoze u podlogu.

Površina bakterijske celuloze snimana je pretražnim elektronskim mikroskopom. Na Slici 29. jasno su vidljive stanice bakterija i kvasaca na površini pelikule bakterijske celuloze.

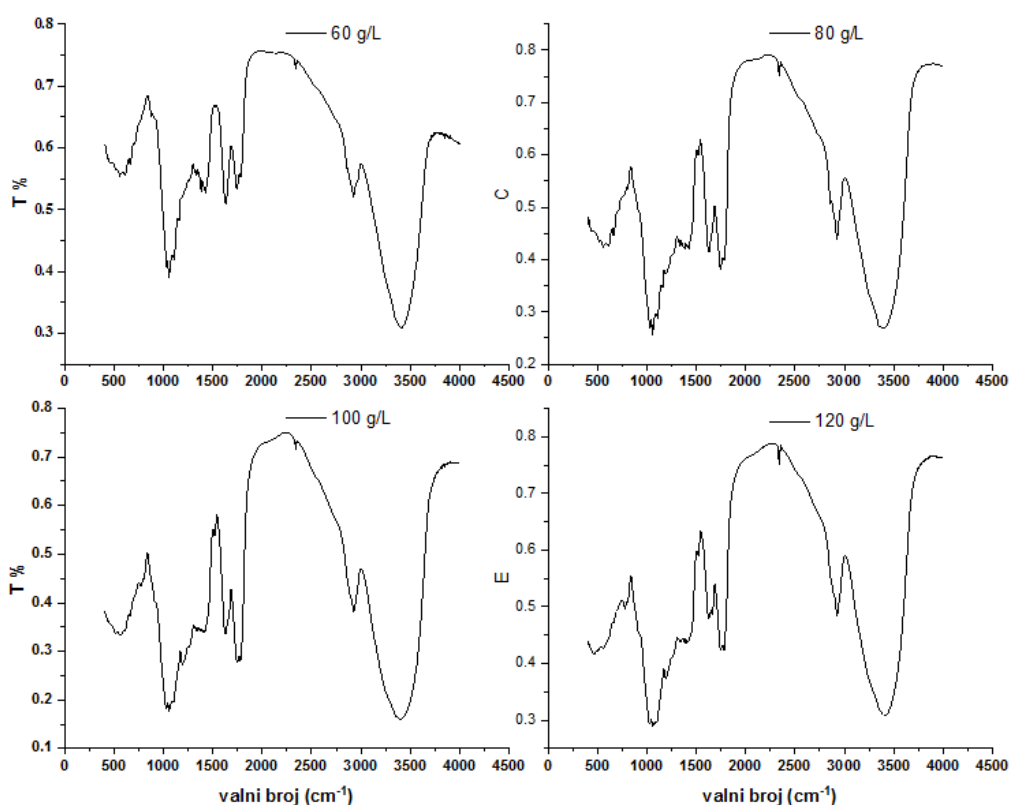


**Slika 29.** SEM snimka površine bakterijske celuloze nakon 14 dana fermentacije u čaju od crnog ribiza i koncentracijom šećera 100 g/L.

#### 4.6. FT-IR spektroskopska analiza

FT-IR spektroskopska analiza je tehnika koja omogućava dobivanje informacija o kemijskim vezama u strukturama različitih materijala, bili oni organskog ili anorganskog podrijetla. S obzirom na kompleksnost celulozne strukture (biljne ili bakterijske), FT-IR analiza omogućava dobivanje dragocjenih informacija o udjelu kristalinične i amorfne strukture celuloznih molekula (Movasaghi i sur., 2008).

Dobiveni apsorpcijski pikovi su pokazali karakteristični spektar za celulozu bez obzira na različite koncentracije saharoze dodane u hranjivu podlogu (čaj od crnog ribiza), s izraženim pikovima kod 3400, 2880 i 1110  $\text{cm}^{-1}$ . Ovi su pikovi rezultat vibracija O-H, C-H i C-O-C grupa u celuloznoj strukturi (Slika 30.) što ukazuje na pretežito kristaliničnu strukturu bakterijske celuloze i u skladu je s istraživanjima koje su proveli Meme i sur. (2010).



**Slika 30.** FT-IR spektri bakterijske celuloze sintetizirane u čaju od crnog ribiza s različitim koncentracijama dodane saharoze.

#### 4.7. Antimikrobno djelovanje *kombucha* čaja od crnog ribiza

S ciljem istraživanja i određivanja moguće antimikrobne aktivnosti *kombucha* čaja od crnog ribiza s različitim koncentracijama dodanog bijelog konzumnog šećera, uzorci su testirani na hranjivim podlogama naciepljenim s gram negativnim bakterijama *Pseudomonas* sp., *S. typhimurium*, *Vibrio cholerae* i *E. coli*, a dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 4. Prema dobivenim rezultatima (zone inhibicije), vidljivo je da na *V. cholerae* nije djelovao inhibicijski niti jedan uzorak fermentiranog čaja jer su postignuta samo blaga zamućenja bez čistih i jasnih zona inhibicije. Najveće zone inhibicije ostalih bakterija postignute su pri koncentraciji 120 g/L, tek malo manje pri 60 g/L, dok su pri 80 g/L postignute najmanje zona inhibicije prema rodovima *S. typhimurium* i *Pseudomonas* sp. (1,5 cm), a kod *E.coli* je postignuta veća inhibicija jer je izmjerena zona inhibicije bila 1,9 cm. Fermentirani čaj sa 100 g/L saharoze se pokazao izrazito djelotvornim za inhibiciju rasta bakterije roda *Pseudomonas* i prosječnim za inhibiciju vrsta *S. typhimurium* i *E. coli*.

**Tablica 4.** Antimikrobna aktivnost fermentiranog *kombucha* čaja od crnog ribiza s različitim koncentracijama konzumnog bijelog šećera.

Koncentracija saharoze (g/L)	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
	Zone inhibicije (cm)			
60	2.2	2.2	0*	2.4
80	1.5	1.9	0*	1.5
100	1.5	1.7	0*	2.5
120	2.3	2.3	0*	2.7

0\* - blago замуćenje, bez zona inhibicije

## **5. ZAKLJUČCI**

### **Iz dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:**

1. *Kombucha* je nutritivno vrijedni napitak je vrlo složenog sastava, a glavni proizvodi koji nastaju kao posljedica biotransformacije su organske kiseline i mali udjel etanola, te bakterijska celuloza, koja se u obliku tanke opne oblikuje na površini napitka.
2. Uzgoj *kombuche* proveden je u kompleksnoj podlozi s dodatkom 60, 80, 100 i 120 g/L saharoze kao izvorom ugljika (biljni čaj od crnog ribiza) i kemijski definiranim podlogama s različitim koncentracijama izvora ugljika: glukozi, maltozi, fruktozi (1-5 % tež/vol) i glicerolu (1-5 % vol/vol).
3. U svim je uzorcima pad pH vrijednosti i koncentracije etanola bio u korelaciji s povećanjem koncentracije octene i glukonske kiseline.
4. Površina posude za uzgoj i dubina hranjive podloge značajno utječe na prinos bakterijske celuloze. Fermentacija se treba odvijati u plitkim posudama sa širokim grlom, zbog što boljeg pristupa kisika bakterijama octene kiseline, koje su odgovorne za sintezu bakterijske celuloze.
5. Sposobnost bakterijske celuloze da apsorbira ili otpusti velike količine vode izričito je ovisna o strukturnim značajkama, posebice o specifičnoj površini i ukupnom volumenu same celuloze, te poroznosti strukture.
6. FT-IR spektroskopskom analizom je dokazana pretežito kristalinična struktura bakterijske celuloze uzgojene u čaju od crnog ribiza pri svim koncentracijama dodanog šećera.
7. Antimikrobna aktivnost ispitivana je mjerenjem zona inhibicije rasta bakterija *S. typhimurium*, *E.coli*, *V. cholerae* i *Pseudomonas* sp. Fermentirani čaj od crnog ribiza je pokazao izvrsnu antimikrobnu aktivnost prema tri bakterijske kulture, osim *V. cholerae* čiji rast nije bio inhibiran.

## **6. LITERATURA**

- Antony, J. I. X., Shankaranaryana, M. L. (1997) Polyphenols of green tea. *Int. Food Ingr.*, **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.
- Benziman, M., Haigler, C. H., Brown, R. M., White, A. R., Cooper, K. M. (1980) Cellulose biogenesis: Polymerization and crystallization are coupled processes in *Acetobacter xylinum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**, 6678–6682.
- Bielecki, S., Krystynowicz, A., Turkiewicz, M., Kalinowska, H. (2005) Bacterial cellulose. U: Polysaccharides and polyamides in the food industry (Steinbüchel, A., Rhee, S. K., ured.). Wiley, Hoboken, str. 31-84.
- Blanton, R. L., Northcote, D. H. (1990) A 1,4- $\beta$ -D-glucan synthase system from *Dictyostelium discoideum*. *Planta.* **180**, 324-332.
- Blanc, P. J. (1996) Characterization of the tea fungus metabolites. *Biotechnol. Lett.* **18**, 139-142.
- Blot, W. J., McLaughlin, J. K., Chow, W. H. (1997) Cancer rates among drinkers of black tea. *Crit. Rev. Food. Sci.* **37**, 739-760.
- Borzani, W., DeSouza, S. J. (1995) Mechanism of The Film Thickness Increasing During The Bacterial Production of Cellulose on Non-agitated Liquid Media. *Biotech. Lett.* **17**, 1271–1272.
- Brown, R. M., Saxena, I. M. (2000) Cellulose biosynthesis: a model for understanding the assembly of biopolymers. *Plant. Physiol. Biochem.* **38**,57–67.
- Bushman, J. L. (1998) Green tea and cancer: a review of the literature. *Nutr. Cancer* **31**, 151-159.



Çakar, F., Özer, I., Aytakin, A. Ö., Şahin, F. (2014) Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium. *Carbohydr. Polym.* **106**, 7–13.

Castro, C., Zuluaga, R., Putaux, J. L., Caro, G., Mondragon, I., Gañán, P. (2011) Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from colombian agroindustrial wastes. *Carbohydr. Polym.* **84**, 96–102.

Chawla, P. R., Bajaj, I. B., Survase, S. A., Singhal, R. S. (2009) Microbial cellulose: Fermentative production and applications. *Food Technol. Biotechnol.* **47**, 107-124.

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

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

Colvin, J. R. (1980) The biosynthesis of cellulose: Plant biochemistry, Academic Press Inc., New York, 543-570.

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

Czaja, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S., Brown, R. M. Jr. (2006) Microbial cellulose - the natural power to heal wounds. *Biomaterials* **27**,145–151.

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

Dahman, Y. (2009) Nanostructured biomaterials and biocomposites from bacterial cellulose nanofibers. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **9**, 5105–5122.

Dahman, Y., Jayasuriya, K. E., Kalis, M. (2010) Potential of biocellulose nanofibers production from agricultural renewable resources: Preliminary study. *Appl. Biochem. Biotech.* **162**, 1647–1659.

David, N. S. (1996) Chemical modification of Lignocellulosic Materials: Chemical structures of cellulose, hemicelluloses and lignin, Marcel Dekker. Inc., New York.

Diker, K. S., Akan, M., Hascelik, G., Yurdakök, M. (1991) The bactericidal activity of tea against *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* **12**, 34,35.

Dikter, K. S., Hascelik, G. (1994) The bactericidal activity of tea against *Helicobacter pylori*. *Lett. Appl. Microbiol.* **19**, 299-300.

Dreosti, I. E., Wargovich, M. J., Yang, C. S. (1997) Inhibition of carcinogenesis by tea: the evidence from experimental studies. *Crit. Rev. Food. Sci.* **37**, 761-770.

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

El-Saied, H., Basta, A. H., Gobran, R. H. (2004) Research progress in friendly environmental technology for the production of cellulose products (Bacterial cellulose and its application). *Polym. Plast. Technol.* **43**, 797–820.

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

Esa, F., Tasirin, S. M., Rahman, N. A. (2014) Overview of bacterial cellulose production and application. *Agric. Sci. Procedia* **2**, 113-119.

Fontana, J. D., Souza, A. M., Fontana, C. K., Toriani, I. L., Moreschi, J. C. (1990) *Acetobacter* cellulose pellicle as a temporary skin substitute. *Appl. Biochem. Biotech.* **24**, 253-264.

Fontana, J. D., Franco, V. C., Souza, S. J., Lyra, I. N., Souza, A. M. (1991) Nature of plant stimulators in the production of *Acetobacter xylinum* ("Tea Fungus") biofilm used in skin therapy. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **28**, 341-351.

Gayathry, G., Gopaldaswamy, G. (2014) Production and characterization of microbial cellulosic fibre from *Acetobacter xylinum*. *Indian J. Fibre Text.* **39**, 93-96.

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.

Guo, J., Catchmark, J. M. (2012) Surface area and porosity of acid hydrolyzed cellulose nanowhickers and cellulose production by *Gluconobacter xylinus*. *Carbohydr. Polym.* **87**, 1026-1037.

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

Haigler, C. H., Weimer, P. J. (1991) Biosynthesis and biodegradation of cellulose. Marcel Dekker Inc., New York.

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

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

Hioki, N., Hori, Y., Watanabe, K., Morinaga, Y., Yoshinaga, F. (1995) Bacterial cellulose as a new material for papermaking. *Kami-Gikyo-Shi.* **49**, 82-87.

Hirai, A., Horii, F., Kitamaru, R. (1987) Transformation of native cellulose crystals from cellulose I $\beta$  to I $\alpha$  through solid state chemical reactions. *Macromolecules.* **20**, 1440-1442.

- Hiremath, U. S., Vaidehi, M. P. and Mushtari, B. J. (2002) Effect of fermented tea on the blood sugar levels of NIDDM subjects. *Indian Practit.* **55**, 423- 425
- Horii, F., Yamamoto, H., Hirai, A. (1997) Microstructural analysis of microfibrils of bacterial cellulose. *Macromol. Symp.* **120**, 197-205.
- Hu, Y., Catchmark, J. M., Vogler, E. A. (2013) Factors impacting the formation of sphere-like bacterial cellulose particles and their biocompatibility for human osteoblast growth. *Biomacromolecules* **14**, 3444–3452.
- 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.
- Iguchi, M., Yamanaka, S., Budhiono, A. (2000) Bacterial cellulose – a masterpiece of nature arts. *J. Material Sci.* **35**, 261-270.
- Imai, K., Suga, K., Nakachi K. (1997) Lead article. Cancer-preventive effects of drinking green tea among a Japanese population, *Prev. Med.* **26**, 769-775.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., Golden, D. A. (2005) *Modern food microbiology*, 7. izd. Springer, New York.
- 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.
- Kakuda, T., Takihara, T., Sakane, I., Mortelmans, K. (1994) Antimicrobial activity of tea extracts against periodontopathic bacteria. *Nippon Nogeiki. Kaishi* **68**, 241-243.
- Katiyar, S. K., Mukhtar, H. (1996) Tea in chemoprevention of cancer: epidemiologic and experimental studies (review). *Int. J. Oncol.* **8**, 221-238.

Kawecki, M., Krystynowicz, A., Wysota, K., Czaja, W., Sakiel, S. (2004) Bacterial cellulose biosynthesis, properties and applications. *Int. Rev. Conf. Biotechnol.*, Vienna, Austria, 14–18.

Keshk, S. M. A. S. (1999) Nascent structure of microbial cellulose. *Polymer journal*. **31**, 61-65.

Keshk, S. M. A. S., Nada, A. (2003) Heterogeneous Derivatization of Bacterial and Plant Celluloses. *Biotech. Biosci. Asia*. **1**, 39.

Keshk, S.M.A.S., Sameshima, K. (2006) Utilization of Sugar Cane Molasses With/without the Presence of Lignosulfonate for the Production of Bacterial Cellulose. *Appl. Microb. Biotech.* **72**, 291-296.

Keshk, S. M. A. S. (2008) Homogenous Reaction of Cellulose from Different Natural Sources. *Carbohydr. Polym.* **74**, 942-945.

Keshk, S. M. A. S., Haijia, M. (2011) A New Method for Producing Microcrystalline Cellulose from *Gluconacetobacter xylinus* and Kenaf. *Carbohydr. Polym.* **84**, 1301-1305.

Keshk, S.M.A.S. (2014) Bacterial cellulose production and its industrial applications. *J. Bioprocess Biotech.* **4**, 1-10.

Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P., Bohn, A. (2005) Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew. Chem. Int. Edit.* **44**, 3358–3393.

Koyama, M., Sugiyama, J., Itoh, T. (1997) Systematic survey on crystalline features of algal celluloses. *Cellulose*. **4**, 147-160.

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

Kudlicka, K., Brown, R. M. (1997) Cellulose and callose biosynthesis in higher plants. *Plant Physiol.* **115**, 643-656.

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.

Masaoka, S., Ohe, T., Sakota, N. (1993) Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. *J. Ferment. Bioeng.* **75**, 18-22.

Matsuoka, T., Tsushida, T., Matsushita, K., Adachi, O., Yoshinaga, F. (1996) A synthetic medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans*. *Biosci. Biotech. Bioch.* **60**, 575-579.

Matthysse, A. G., Thomas, D. O. L., White, A. R. (1995) Mechanism of cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriology.* **177**, 1069-1081.

Mayser, P., Fromme, S., Leitzmann, C., Grunder, K. (1995) The yeast spectrum of the „the fungus Kombucha“. *Mycoses* **38**, 289-295.

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

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.

Montezinos, D., Brown, R. M. (1976) Cellulose microfibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 6985-6989.

Moosavi-Nasab, M., Yousefi, M. (2011) Biotechnological production of cellulose by *Gluconacetobacter xylinus* from agricultural waste. *Iranian J. Biotech.* **9**, 94-101.

Movasaghi, Z., Rehman, S., Rehman, I. (2008) Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Appl. Spectrosc.* **43**, 134-179.

Mühlethaler, K. (1949) The structure of bacterial cellulose. *Biochem. Biophys. Acta.* **3**, 527-535.

Murphy, O. (2001) Non-polyol low-digestible carbohydrates: food applications and functional benefits. *Br. J. Nutr.* **85**, 47–53.

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

Ogawa, R., Tokura, S. (1992) Preparation of bacterial cellulose containing N-acetylglucosamine residues. *Carbohydr. Polym.* **19**, 171-178.

Oikawa, T., Morino, T., Ameyama, M. (1995) Production of cellulose from D-Arbitol by *Acetobacter xylinum* KU-1. *Biosci. Biotech. Bioch.* **59**, 1564-1565.

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

Okubo, T., Juneja, R. (1997) Effects of green tea polyphenols on human intestinal microflora. U: Chemistry and Applications of Green Tea (Yamamoto, T., Juneja, R., Chu, D. C., Kim, M., ured.), CRC Press LLC, New York, str. 109-122.

Ougiya, H., Watanabe, K., Morinaga, Y., Yoshinaga, F. (1997) Emulsion effect of bacterial cellulose. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 1541-1545.

Park, J. K., Park, Y. H., Jung, J. Y. (2003) Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* PJK isolated from rotten apple. *Biotechnol. Bioproc. E.* **8**, 83–88.

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

Premjet, S., Ohtani, O., Someshima, K. (1994) The contribution of high molecular lignosulfonate to the powerful bacterial cellulose production system with *Acetobacter xylinum* ATCC 10245. *Sen'i Gakkaishi*. **50**, 458-463.

Premjet, S., Ohtani, Y., Saeshima, K. (1996) X-ray diffraction diagram of the bacterial cellulose membrane produced by *Acetobacter xylinum* in the medium with lignosulfonate. *Sen'i Gakkaishi*. **52**, 169-174.

Ratner, B. D., Bryant, S. J. (2004) Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **6**, 41–75.

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

Rivas, B., Moldes, A. B., Domínguez, J. M., Parajó, J. C. (2004) Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. *Int. J. Food Microbiol.* **97**, 93–98.

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

Ryser, U. (1985) Cell wall biosynthesis in differentiating cotton fibers. *Eur. J. Cell Biol.* **39**, 236-265.

Saibuatong, O. A., Phisalaphong, M. (2010) Novo aloe vera-bacterial cellulose composite film from biosynthesis. *Carbohydr. Polym.* **79**, 455–460.

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.



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*. *Biosci. Biotech. Bioch.* **60**, 745-749.

Sani, A., Dahman, Y. (2010) Improvements in the production of bacterial synthesized biocellulose nanofibres using different culture methods. *J. Chem. Technol. Biot.* **85**, 151–164.

Shah, N., Ul-Islama, M., Khattaka, W. A., Parka, J. K. (2013) Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material. *Carbohydr. Polym.* **98**, 1585– 1598.

Sheykhnazaria, S., Tabarsaa, T., Ashorib, A., Shakeric, A., Golalipourd, M. (2011) Bacterial synthesized cellulose nanofibers; effects of growth times and culture mediums on the structural characteristics. *Carbohydr. Polym.* **86**, 1187– 1191.

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. *Carbohydr. Polym.* **82**, 173–180.

Shi, Q. S., Feng, J., Li, W. R., Zhou, G., Chen, A. M., Ouyang, Y. S., Chen, Y. B. (2013) Effect of different conditions on the average degree of polymerization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter intermedius* BC-41. *Cell. Chem. Technol.* **47**, 503-508.

Shimoda, M., Shigematsu, H., Shiratsuchi, H., Osajima, Y. (1995) Comparison of volatile compounds among different grades of green tea and their relations to odor attributes. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 1621-1625.

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.

Siro, I., Plackett, D. (2010) Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. *Cellulose* **17**, 459–494.

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

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

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

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

Sun, R. C. (2008) Detoxification and separation of lignocellulosic biomass prior to fermentation for bioethanol production by removal of lignin and hemicelluloses. *Bioresources* **4**, 452-455.

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.

Tanaka, M., Murakami, S., Shinke, R., Aoki, K. (2000) Genetic characteristics of cellulose-forming acetic acid bacteria identified phenotypically as *Gluconacetobacter xylinus*. *Biosci. Biotechnol. Bioch.* **64**,757-60.

Tang, X., Kumar, P., Alavi, S., Sandeep, K. (2012) Recent advances in biopolymers and biopolymer-based nanocomposites for food packaging materials. *Crc Cr. Rev. Food Sci.* **52**, 426–442.

Tanskul, S., Amorntharee, K., Jaturonlak, N. (2013) A new cellulose-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. MI 2: screening and optimization of culture conditions. *Carbohydr. Polym.* **92**, 421-428.

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

Tijburg, L. B. M., Mattern, T., Folts, J. D., Weisgerber, U. M., Katan, M. B. (1997) Tea flavonoids and cardiovascular diseases: a review. *Crit. Rev. Food. Sci.* **37**, 771-785.

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.

Tonouchi, N., Tahara, N., Tsuchida, T., Yoshinaga, F., Beppu, T. (1995) Addition of a small amount of an endoglucanase enhances cellulose production by *Acetobacter xylinum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 805-808.

Tonouchi, N., Tsuchida, T., Yoshinaga, F., Beppu, T., Horinouchi, S. (1996) Characterization of the biosynthetic pathway of cellulose from glucose and fructose in *Acetobacter xylinum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**,1377–1379

Torres, F. G., Commeaux, S., Tronsoco, O. P. (2012) Viocompatibility of bacterial cellulose based biomaterials. *J. Funct. Biomater.* **3**, 864-878.

Ul-Islam, M., Khan, T., Park, J. K. (2012) Water Holding and Release Properties of Bacterial Cellulose Obtained by in Situ and ex Situ Modification. *Carbohydr. Polym.* **88**, 596–603.

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

Vanderhart, D. L., Atalla, R. H. (1984) Studies of microstructure in native cellulose using solid-state <sup>13</sup>C NMR. *Macromolecules.* **17**, 1465-1472.

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

Wu, S. C., Lia, Y. K. (2008) Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization. *J. Mol. Catal.* **54**, 103–108.

Yamada, Y., Hoshino, K., Ishikawa, T. (1997) The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 1244-1251.

Yamada, Y. (2000) Transfer of *Acetobacter oboediens* and *Acetobacter intermedius* to the genus *Gluconacetobacter*. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **50**, 2225-2227.

Yamamoto, H., Horii, F. (1993) CP/Mass Carbon 13 NMR analysis of the crystal transformation induced for Valonia cellulose by annealing at high temperatures. *Macromolecules.* **26**, 1313-1317.

Yamamoto, H., Horii, F. (1994) In situ crystallization of bacterial cellulose I. Influences of polymeric additives, stirring and temperature on the formation cellulose I<sub>α</sub> and I<sub>β</sub> as revealed by cross polarization/magic angle spinning (CP/ Mass) 13C NMR spectroscopy. *Cellulose.* **1**, 57.

Yamamoto, H., Horii, F., Hirai, A. (1996) In situ crystallization of bacterial cellulose II. Influences of polymeric additives with different molecular weight on the formation cellulose I<sub>α</sub> and I<sub>β</sub> at the early stage of incubation. *Cellulose.* **3**, 229-242.

Yan, Z., Chen, S., Wang, H., Wang, B., Jiang, J. (2008) Biosynthesis of bacterial cellulose/multi-walled carbon nanotubes in agitated culture. *Carbohydr. Polym.* **74**, 659–665.

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

Yokozawa, T., Dong, E., Nakagawa, T., Kim, D. W., Hattori, M., Nakagawa, H. (1998) Effects of Japanese black tea on atherosclerotic disorders. *Biosci. Biotech. Bioch.*, **62**, 44-48.

Yu, X., Atalla, R. (1996) Production of cellulose II by *Acetobacter xylinum* in the presence of 2,6-dichlorobenzonitrile. *Int. J. Biol. Macromol.* **19**, 145-146.

Zhu, H., Jia, S., Yang, H., Tang, W., Jia, Y., Tan, Z. (2010) Characterization of bacteriostatic sausage casing: A composite of bacterial cellulose embedded with polylysine. *Food Sci. Biotechnol.***19**,1479-1484.