

# Biosinteza bakterijske nanoceluloze uzgojem kokulture vodenih kefirnih zrnaca i kombuche u kokosovoj vodi

---

**Kovačina, Antonela**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:276136>

*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 2018.

Antonela Kovačina  
954/BPI

**BIOSINTEZA BAKTERIJSKE  
CELULOZE UZGOJEM  
KOKULTURE VODENIH  
KEFIRNIH ZRNACA I *KOMBU*CHE  
U KOKOSOVOJ VODI**

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 izv. prof. dr. sc. Sunčici Beluhan na ukazanom povjerenju, brojnim savjetima, susretljivosti i razumijevanju, čime mi je uvelike pomogla pri izvedbi eksperimentalnog i izradi pismenog dijela diplomskog rada.*

*Zahvaljujem ostalim djelatnicima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva koji su pomogli u izvedbi eksperimenata.*

*Zahvaljujem i izv. prof. dr. sc. Senki Djaković na nesebičnoj pomoći prilikom izvedbe FT-IR spektroskopije.*

*Posebno zahvaljujem svojim roditeljima, sestrama, prijateljima i ostatku obitelji na podršci i motivaciji tijekom školovanja.*

*Zadnje, ali ne i manje bitno, od srca zahvaljujem Mateju što je vjerovao u mene i pomogao mi da studiranje privedem kraju.*

## 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 NANOCELULOZE UZGOJEM KOKULTURE VODENIH KEFIRNIH ZRNACA I *KOMBUCHÉ* U KOKOSOVOJ VODI

*Antonela Kovačina, 954/BPI*

**Sažetak:** Kefir i *kombucha* su tradicionalni fermentirani napitci proizvedeni simbiotskim djelovanjem kultura bakterija mliječne i octene kiseline te kvasaca. U ovom je radu proučavan uzgoj kokulture vodenih kefirnih zrnaca i *kombuche* u kokosovoj vodi tijekom 14 dana fermentacije na sobnoj temperaturi uz dodatak različitih koncentracija saharoze. Praćene su promjene pH vrijednosti, koncentracija etanola, octene, glukonske i mliječne kiseline, kao i prinos bakterijske nanoceluloze (BNC) u kokulturi. Svojstva, kristaliničnost i strukturna karakterizacija BNC proučavane su pomoću difrakcije rendgenskim zrakama (XRD), FT-IR spektroskopije i skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM). Antimikrobna aktivnost BNC testirana je na bakterijama *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis* te na kvascima vrsta *Candida albicans* i *Schizosaccharomyces pombe*. Rezultati određivanja kapaciteta zadržavanja vode (WHC) i otpuštanja vode (WRR) dokazali su moguću primjenu BNC kao antimikrobnog pokrovnog materijala za rane. Bakterijska nanoceluloza (BNC) dobivena djelovanjem kokulture vodenih kefirnih zrnaca i *kombuche*, sa svojim jedinstvenim svojstvima mikrofibrilne strukture, može se smatrati mnogostranim biomaterijalom za različita područja primjene.

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

**Rad sadrži:** 63 stranice, 28 slika, 4 tablice, 112 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:** 19. srpnja, 2018.

## 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 NANOCELLULOSE ASSISTED BY COCULTURE OF WATER KEFIR GRAINS AND *KOMBUCHA* IN FERMENTED COCONUT WATER

*Antonela Kovačina, 954/BPI*

**Abstract:** Kefir and *kombucha* are traditional fermented drinks produced by adding symbiotic cultures of lactic and acetic acids and yeasts to medium. This work studies cultivation of coculture of water kefir grains and *kombucha* in aerobic conditions over a period up to 14 days of fermentation in coconut water, at room temperature with different sucrose concentrations added. Changes in pH value, ethanol, acetic acid, gluconic acid, and lactic acid were observed, as well as yield of bacterial nanocellulose (BNC) in coculture. Properties, crystallinity and structural characterization of BNC produced from coculture were evaluated by employing X-ray diffractometry, FT-IR and SEM. The antimicrobial activity of BNC was tested against bacteria *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, as well as yeasts *Candida albicans* and *Schizosaccharomyces pombe*. The water holding capacity (WHC) and release rate (WRR) were calculated, and the results supported its anticipated use as antimicrobial wound dressing material. Bacterial nanocellulose (BNC) produced from coculture of water kefir grains and *kombucha* shown its unique microfibril characteristic properties, which make it a versatile biomaterial for application in various domains.

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

**Thesis contains:** 63 pages, 28 figures, 4 tables, 112 references

**Original in:** Croatian

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

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

#### **Reviewers:**

1. PhD *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:** July 19<sup>th</sup>, 2018

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
2.1. <i>Kombucha</i> .....	3
2.1.1. Mikrobiološki sastav i biokemijska aktivnost <i>kombuche</i> .....	3
2.1.2. Primjena <i>kombuche</i> .....	5
2.1.3. Antimikrobna aktivnost <i>kombuche</i> .....	6
2.2. Vodeni kefir .....	7
2.2.1. Metabolizam šećera u mikroorganizmima vodenog kefira .....	8
2.2.1.1. <i>Bakterije mliječne kiseline</i> .....	8
2.2.1.2. <i>Bakterije octene kiseline</i> .....	11
2.2.1.3. <i>Bifidobakterije</i> .....	12
2.2.1.4. <i>Kvasci</i> .....	13
2.2.1.5. <i>Egzopolisaharidi</i> .....	14
2.2.2. Simbioza u fermentaciji hrane .....	15
2.3. Bakterijska celuloza .....	16
2.3.1. Struktura bakterijske celuloze .....	16
2.3.2. Sinteza bakterijske celuloze .....	17
2.3.3. Uzgoj bakterijske celuloze .....	20
2.3.3.1. <i>Laktat</i> .....	21
2.3.3.2. <i>Etanol</i> .....	21
2.3.3.3. <i>Supstrati bogati ugljikom</i> .....	21
2.3.3.4. <i>Kukuruzna močevina</i> .....	22
2.3.4. Primjena bakterijske celuloze .....	22
2.3.4.1. <i>Medicina</i> .....	22
2.3.4.2. <i>Industrija</i> .....	24
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>25</b>
3.1. Tijek istraživanja .....	25
3.2. Materijali i metode rada .....	26
3.2.1. Priprava kokulture vodenih kefirnih zrnaca i <i>kombuche</i> .....	26
3.2.2. Hranjiva podloga za uzgoj kokulture .....	27
3.2.3. Određivanje pH vrijednosti .....	28
3.2.4. Određivanje koncentracije octene kiseline .....	28
3.2.5. Određivanje koncentracije glukonske kiseline .....	28
3.2.6. Određivanje koncentracije mliječne kiseline .....	29
3.2.7. Određivanje alkohola kemijskom metodom .....	29
3.2.8. Izračunavanje mase i prinosa celulozne biomase <i>kombuche</i> .....	30
3.2.9. Određivanje kapaciteta zadržavanja vode (eng. Water-holding capacity; WHC) .....	31
3.2.10. Određivanje brzine otpuštanja vode (eng. Water-release rate; WRR) .....	31
3.2.11. FT-IR spektroskopija .....	32
3.2.12. Difrakcija rendgenskim zrakama (eng. X-ray diffraction; XRD) .....	32
3.2.13. Pretražna elektronska mikroskopija (eng. Scanning electron microscopy; SEM) .....	32
3.2.14. Određivanje kristaliničnosti bakterijske celuloze (jodni broj) .....	32
3.2.15. Određivanje antimikrobne aktivnosti .....	33
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>35</b>
4.1. Promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije .....	35
4.2. Organske kiseline i etanol .....	36
4.3. Sinteza bakterijske celuloze .....	41
4.4. Difrakcija rendgenskim zrakama (XRD) .....	43
4.5. Kristaliničnost bakterijske nanoceluloze .....	44
4.6. FT-IR .....	45
4.7. Morfologija površine bakterijske nanoceluloze .....	47
4.7.1. SEM .....	48
4.8. Kapacitet zadržavanja i brzina otpuštanja vode .....	48
4.9. Antimikrobno djelovanje fermentirane kokosove vode .....	50



<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>52</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>53</b>

# 1. UVOD

Bakterijska nanoceluloza (BNC) je vrlo čist i kristaliničan materijal kojega proizvode aerobne bakterije, a osobit interes stekao je zbog svojih jedinstvenih fizikalno-kemijskih karakteristika u usporedbi s biljnom celulozom (Moniri i sur., 2017). BNC, sama ili u kombinaciji s drugim komponentama (npr. biopolimeri i nanočestice), zbog svoje poroznosti i čvrstoće, može se koristiti za širok raspon primjena, kao što su medicinski proizvodi, električni instrumenti i prehrambeni sastojci.

*Kombucha* je nutritivno bogat napitak pripremljen fermentacijom pomoću „čajne gljive“ *kombuche*, združene zajednice mikroorganizama, od kojih su najčešći bakterije octene kiseline i osmofilni kvasci. Tradicionalno se proizvodi iz zaslađenog zelenog ili crnog čaja uz naciepljivanje *kombuchom*, a fermentacija traje 10-14 dana (Teoh i sur., 2004). Dobiveni napitak je slatko-kiseo i pjenušav, a preporučuje se svakodnevna konzumacija zbog brojnih dokazanih ljekovitih svojstava, kao što su poboljšanje općeg zdravlja i antimikrobno djelovanje na razne patogene mikroorganizme.

Vodeni kefir je napitak pripremljen djelovanjem simbiotske mikrobiološke zajednice bakterija (bakterije mliječne i octene kiseline) i kvasaca (Franzetti i sur., 1998; Neve i Heller, 2002; Pidoux, 1989), ugrađene u vodena kefirna zrnca. Proizvodi se iz vodene otopine saharoze nadopunjene voćem, voćnog soka ili kokosove vode naciepljene zncima, a fermentacija traje 2-3 dana pri sobnoj temperaturi (Stadie, 2013). Tako dobiven napitak je gorko-kiseo i pjenušav te s blagim udjelom alkohola.

Tijekom fermentacije, bakterije i kvasci iz *kombuche* i vodenih kefirnih zrnaca metaboliziraju ugljikohidrate, čime nastaju organske kiseline (octena, glukonska, mliječna) i etanol (Sievers i sur., 1995), a na površini hranjive podloge sintetizira se bakterijska nanoceluloza (BNC) u obliku plutajuće pelikule koja tijekom trajanja fermentacije svakodnevno povećava svoj volumen i površinu (Chen i Liu, 2000).

U ovom radu istraživana je biotransformacija združene kulture bakterija octene i mliječne kiseline te kvasaca tijekom 14 dana uzgoja u kokosovoj vodi kao kompleksnoj podlozi. Glavni izvor ugljika bila je saharoza dodana u različitim koncentracijama (50, 75, 100, 125, 150, 175 i 200 g/L). Tijekom fermentacije, provedene pomoću kokulture vodenih kefirnih zrnaca i *kombuche* u kokosovoj vodi, praćeni su i određivani sljedeći parametri:

- promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije
- promjena koncentracije octene, glukonske i mliječne kiseline te etanola u aerobnim uvjetima uzgoja tijekom 14 dana
- kinetika sinteze bakterijske nanoceluloze
- prinos bakterijske nanoceluloze sintetizirane u kokulturi kefirnih zrnaca i *kombuche*
- utjecaj površine bakterijske nanoceluloze na kapacitet zadržavanja i brzinu otpuštanja vode
- određivanje kristaliničnosti sintetizirane bakterijske nanoceluloze
- antimikrobna aktivnost fermentirane kokosove vode

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. *Kombucha*

*Kombucha* je slatko-kiseli, pjenušavi napitak pripremljen fermentacijom zaslađenog čaja pomoću *kombuche* – simbiotske zajednice bakterija octene kiseline (BOC) i različitih kvasaca, poznate kao SCOBY (eng. *Symbiotic Community Of Bacteria and Yeast*) (Sreeramulu i sur., 2000), iz koje je izolirano i nekoliko vrsta bakterija mliječne kiseline (BMK) (Marsh i sur., 2014). Fermentacijski proces vodi do formacije sloja celulozne pelikule koji pluta na površini hranjive podloge. Uobičajene podloge za pripremu *kombucha* napitka su crni i zeleni čaj, no koriste se i voćni sokovi, koji sadrže više vitamina i hranjivih tvari za ljudsko tijelo (Ayed i Hamdi, 2015).

*Kombucha* se konzumira još od 220. g. pr. Kr. (Stadelmann, 1961), a poznata je i pod nazivima „Čajna gljiva“, „Kargasok čaj“, „Mandžurijska gljiva“ i „Haipao“ (Greenwalt i sur., 2000). U Mandžuriji su tada smatrali da čaj pripremljen pomoću *kombuche* ima čarobna svojstva te se polako s Dalekog istoka proširio do Istočne Europe i Rusije; ondje je stekao veliku popularnost i koristio se kao lijek za metaboličke poremećaje, hemoroide i reumu. Većina literature i informacija o tom čaju potječe od ruskih liječnika, navodeći njegove medicinske primjene. Npr., nakon Drugog svjetskog rata, zabilježeno je da su dijelovi Rusije, u kojima se konzumirala *kombucha*, imali znatno manju stopu pojave raka (usprkos industrijskom onečišćenju i toksinima prisutnim od rata) (Frank, 1991), od onih dijelova čiji stanovnici čaj nisu konzumirali. Nakon rata, konzumacija *kombuche* širila se dalje na Zapadnu Europu i Sjevernu Afriku (Blanc, 1996), gdje je korištena zbog navodnog detoksikacijskog učinka na krv i probavni sustav.

#### 2.1.1. Mikrobiološki sastav i biokemijska aktivnost *kombuche*

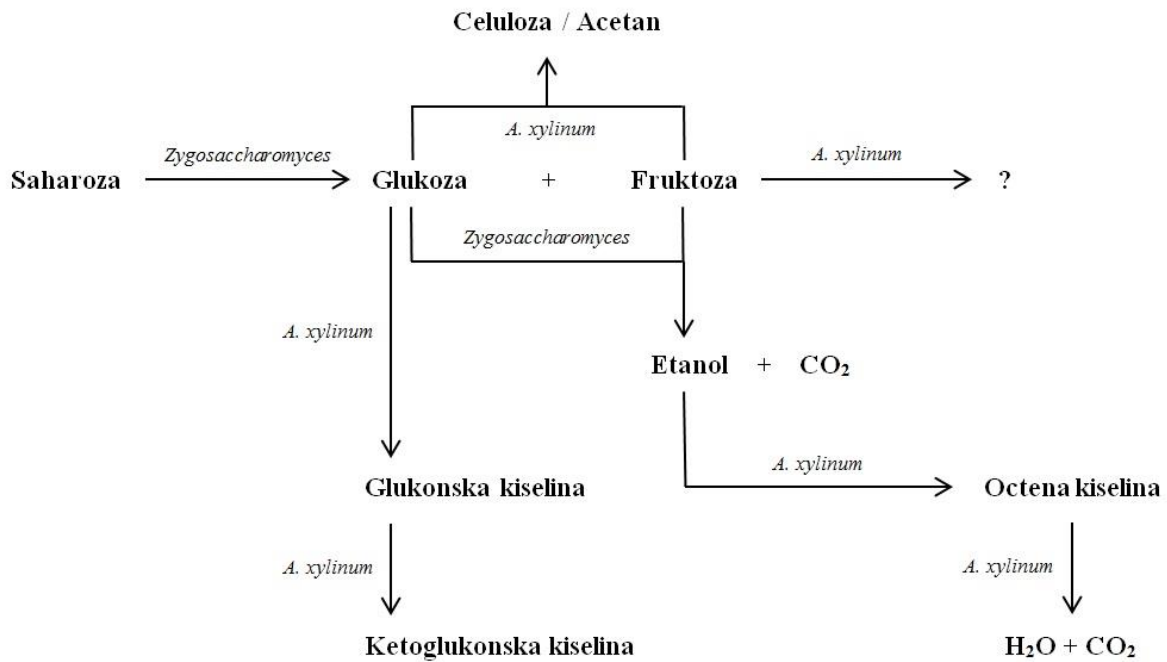
Sastav kvasaca i bakterija u zajednici *kombuche* varijabilan je, ali glavne pronađene vrste BOC su *Acetobacter xylinum* (Balentine, 1997), *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* i *Gluconobacter oxydans* (Liu i sur., 1996; Greenwalt i sur., 2000; Kurtzman i sur., 2001). Marsh i sur. (2014) su u svom istraživanju pokazali da su dominantni bakterijski rodovi *Gluconacetobacter* i *Lactobacillus*. Također su identificirani i brojni kvasci, kao što su

*Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces*, *Candida*, *Torulospora*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Mycotorula* i *Mycoderma* (Jayabalan i sur., 2014).

Fermentacija *kombuche* obuhvaća transformaciju saharoze u glukozu, fruktozu, glukonsku kiselinu, etanol i octenu kiselinu (Sievers i sur., 1995). Stanice kvasaca glikolizom konvertiraju šećer u etanol (Sievers i sur., 1995). BOC konvertiraju glukozu u glukonsku kiselinu, a fruktozu u octenu; dodatno je zabilježeno da nastaju i glicerol (Dufresne i Farnworth, 2000) te mliječna kiselina (Reiss, 1994). Octena kiselina stimulira kvasac na proizvodnju etanola, čija prisutnost olakšava rast BOC, te posljedično i proizvodnju octene kiseline (Liu i sur., 1996). Ustanovljeno je da i etanol i octena kiselina imaju antimikrobno djelovanje prema patogenim bakterijama (Liu i sur., 1996).

Fermentacija zaslađenog čaja ili voćnog soka započinje dodavanjem dijela prethodno uzgojene kulture, *kombuche*, koja služi kao starter. Tijekom uzgoja, kao rezultat proizvodnje kiseline, pH hranjivog medija pada s 3,75 na 2,42 (Sievers i sur., 1995). Sastav metabolita i njihove koncentracije ovise o izvoru *kombuche*, koncentraciji šećera i trajanju fermentacije (Dufresne i Farnworth, 2000). Utvrđeno je da optimalna koncentracija saharoze za proizvodnju etanola i mliječne kiseline iznosi 50 g/L (Dufresne i Farnworth, 2000; Reiss, 1994; Greenwalt i sur., 2000).

Slika 1 daje pregled o iskorištenju saharoze te proizvodnji etanola i octene kiseline. Shema je, po mišljenju autora (Sievers i sur., 1995), često krivo protumačena, implicirajući na potpunu konverziju proizvedenog etanola u octenu kiselinu. Ako se octena kiselina dalje prevodi u vodu i CO<sub>2</sub>, manje etanola ipak može zaostati nakon potpune potrošnje šećera. Međutim, nastanak viška CO<sub>2</sub>, nakon što je *kombucha* napitak zatvoren u bocu, uzročnik je prekomjernog tlaka i može dovesti do pucanja boce. U istraživanjima nedostaje informacija o količini proizvedenog alkohola i onoga prisutnog u odležanim *kombucha* napitcima (El-Siddig Ahmed, 2003).



**Slika 1.** Temeljna shema metaboličke aktivnosti bakterija roda *Acetobacter* i kvasaca *Zygosaccharomyces* izoliranih iz *kombuche* (Sievers i sur., 1995). Kvasac hidrolizira saharozu na glukozu i fruktozu pomoću enzima invertaze te glikolizom proizvodi etanol, s fruktozom kao preferiranim supstratom

### 2.1.2. Primjena *kombuche*

*Kombucha* napitci imaju brojna ljekovita svojstva, kao što su poboljšanje općeg zdravlja i liječenje gastrointestinalnih poremećaja (Dufresne i Farnworth, 2000; Jayabalan i sur., 2007), a tradicionalno se vjeruje i da pridonose povećanju dugovječnosti. Korisna svojstva *kombuche* dugo su pripisivana prvenstveno njenom sastavu kiselina (glukonska, glukuronska, octena, mliječna) (Pauline i sur., 2001); glukuronska kiselina poznata je kao detoksikant, čija konjugacija s nepoželjnim spojevima povećava njihovu topljivost i olakšava transport iz tijela (Vīna i sur., 2013). Ostale komponente *kombucha* napitka su šećeri, etil-glukonat, oksalna, mliječna i 5-ketoglukonska kiselina, vitamini topljivi u vodi (B1, B6, B12 i C), komponente čaja i hidrolitički enzimi (Jayabalan i sur., 2014).

Zdravstvene prednosti *kombucha* napitka pripisane su i prisutnosti fenolnih antioksidansa (Vijayaraghavan i sur., 2000), koji ovise primarno o sadržaju fenola u supstratu i

normalnoj mikrobioti *kombucha* kulture, a u tijelu uklanjaju štetne slobodne radikale uključene u degenerativne bolesti.

### 2.1.3. Antimikrobna aktivnost *kombuche*

Mnoga istraživanja *kombuche* bavila su se antimikrobnom aktivnošću protiv širokog spektra organizama. Između 264 reference u razdoblju od 1852. do 1961. godine, postoje izvještaji o antibiotskoj aktivnosti prema *Agrobacterium tumefaciens* te medicinskoj vrijednosti u borbi protiv raznih bolesti (Steinkraus i sur., 1996). *Kombucha* također ima antimikrobnu aktivnost za *Bacillus cereus*, *Salmonella choleraesuis* ser. *typhimurium*, *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* (Greenwalt i sur., 1998). Dodatno, utječe i na *Shigella sonnei*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *Helicobacter pylori* i *Listeria* (Guttapadu, 2000).

S druge strane, Steinkraus i sur. (1996) izvijestili su da nema antimikrobne aktivnosti prema pojedinim mikroorganizmima (*E. coli*, *H. pylori*, *S. aureus*, *A. tumefaciens*), već je kiselost proizvoda zaslužna za ograničavanje sposobnosti njihovog rasta. Iako je *kombucha* gljiva pri normalnom, kiselom pH imala antimikrobno djelovanje protiv *Staphylococcus* sp. i *Streptococcus* sp. na nerazrijeđenoj koncentraciji, dvostrukim i trostrukim razrjeđivanjem otopine, pri pH 7, nije pokazivala iste rezultate.

Toda i sur. (1989) pokazali su da nefermentirani čaj (20 % suhih listića čaja) može spriječiti rast *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae* i *Vibrio* spp. Pri koncentraciji od 200 g/L čaja, Diker i Hascelik (1994) pokazali su da ekstrakti crnog i zelenog čaja imaju antimikrobnu aktivnost prema *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* i *Helicobacter pylori*.

## 2.2. Vodeni kefir

Vodeni kefir je stabilna mikrobiološka zajednica različitih mikroorganizama, koja se koristi za pripremu fermentiranih napitaka. Kefirna zrnca se uranjaju u otopinu saharoze (8 %) nadopunjenu suhim ili svježim voćem (mogu se koristiti i voćni sok ili kokosova voda) uz opcionalni dodatak limuna (doprinosi okusu, ali ne i rastu mikroorganizama); tako dobivena suspenzija 2-3 dana fermentira na sobnoj temperaturi (Stadie, 2013). Nakon fermentacije, zrnca se uklanjaju i ispiru, te postaju spremna za novu fermentaciju, a dobiveni napitak je gaziran, pretežito gorko-kiselog okusa, djelomično sladak i s blagim udjelom alkohola (ovisno o duljini fermentacije). Porijeklo vodenog kefira je nepoznato, a prvi zapisi o sličnim zrnima naziva „Biljka đumbirovog piva“ datiraju iz 1892. (Ward, 1892), gdje je autor zapisao da su zrnca donijeli britanski vojnici iz Krimskog rata 1855. godine. Ostali zapisi povezuju zrnca (naziva *Tibi*) s meksičkim kaktusima roda *Opuntia*, gdje su skinuta s listova (Lutz, 1899). Do danas je poznata nekolicina sinonima, kao što su „Kalifornijske pčele“, „Afričke pčele“, „Ale orasi“, „Melem Gileada“, „Japansko pivsko sjeme“ ili „Šećerna kefirna zrnca“ (Kebler, 1921; Pidoux i sur., 1988).

U nekoliko istraživanja otkriveno je da su mikrobne vrste, koje čine združenu kulturu vodenih kefirnih zrnaca, laktobacili, bakterije octene kiseline i kvasci (Franzetti i sur., 1998; Neve i Heller, 2002; Pidoux, 1989). Gulitz i sur. (2011) ustanovili su da se nakupina zrnaca sastoji od  $10^8$  laktobacila,  $10^6 - 10^8$  bakterija octene kiseline te  $10^6 - 10^7$  kvasaca po gramu zrnaca. Dodatno, još nekultivirane bifidobakterije otkrivene su u nekoliko vrsta kefirnih zrnaca drugog porijekla (Gulitz i sur., 2013). Ovi organizmi pokazuju obligatni sinergizam između mikrobiota i zajednice vodenog kefira. Mikroorganizmi su ugrađeni u prozirna, želatinozna zrnca izgleda zdrobljenog leda, koja se većinom sastoje od netopljivog dekstrana s  $\alpha$ -1,6 vezanom glukozom i  $\alpha$ -1,3 grananjem (Pidoux i sur., 1989). Pidoux i sur. (1988) i Waldherr i sur. (2010) otkrili su i da je *Lactobacillus hilgardii* važna vrsta za egzopolisaharide, a posljedično i formaciju zrnaca tijekom fermentacije vodenog kefira.

Leroi i Pidoux (1993a) ustanovili su prvi sinergizam izolata vodenog kefira, interakciju između *Lactobacillus hilgardii* i *Saccharomyces florentinus* (reklasificiran kao *Zygorulaspora florentina*) (Kurtzman, 2003). U mješovitoj kulturi, *L. hilgardii* se pokazao kao izdržljiviji i bolji mikroorganizam u proizvodnji mliječne kiseline, ali rast *S. florentinus* je drastično usporio, te su pronašli parazitsku interakciju između ovih mikroorganizama. Dokazano je da su CO<sub>2</sub>, piruvat, propionat, acetat i sukcinat, što su metaboliti kvasaca,



odgovorni za prednosti *L. hilgardii*. S druge strane, otkrili su i da kombinacija *L. hilgardii* i *Candida lambica* nije pokazala nikakvu stimulaciju, već se dogodilo potpuno suprotno, imobilizacijom u kalcijevim alginatnim zrcima, bakterijski rast i proizvodnja mliječne kiseline bili su inhibirani (Leroi i Pidoux, 1993a, 1993b).



**Slika 2.** Kefirna zrnca koja se koriste kao starter kultura za fermentaciju vodenog kefira (Leroi i Pidoux, 1993a)

## **2.2.1. Metabolizam šećera u mikroorganizmima vodenog kefira**

### **2.2.1.1. Bakterije mliječne kiseline (BMK)**

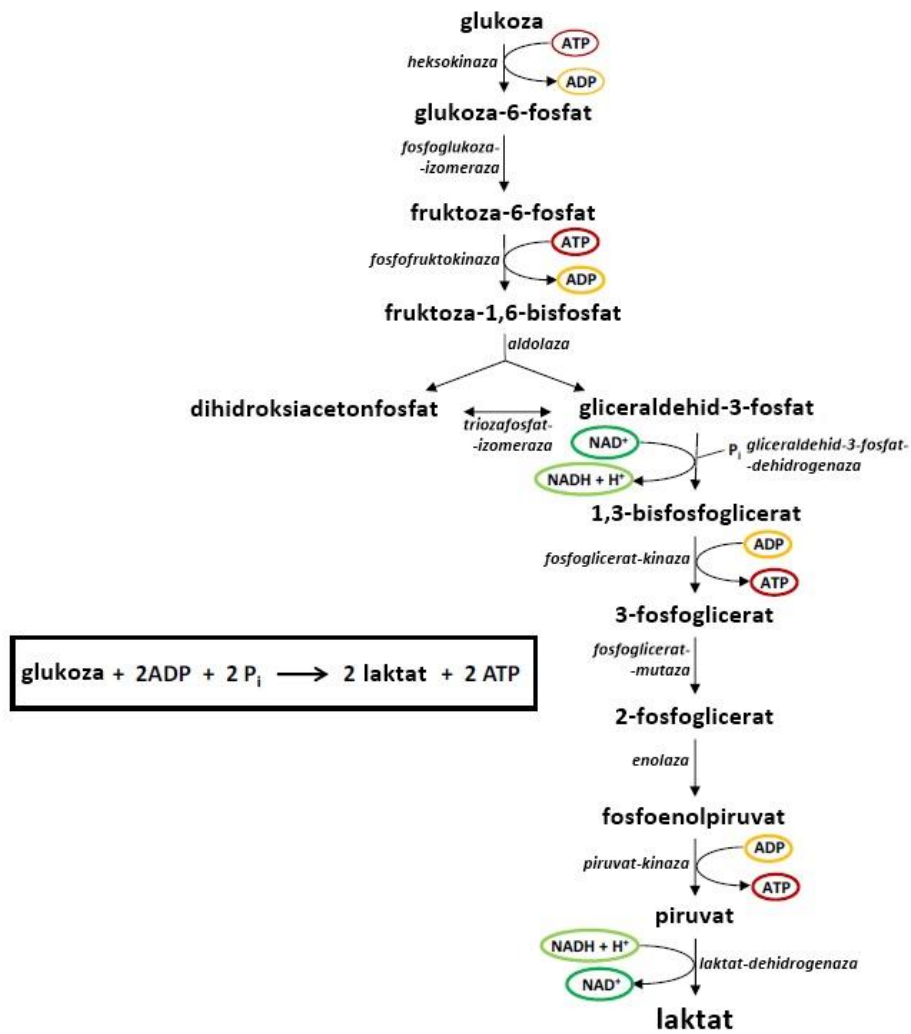
BMK su Gram-pozitivne bakterije koje proizvode mliječnu kiselinu koristeći ugljikohidrate kao izvore energije. U skupinu BMK pripadaju rodovi *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus* i *Vagococcus* (Jay, 1992), a u vodenom kefiru može se naći nekoliko vrsta prva dva roda (Gulitz i sur., 2013). S obzirom na metabolizam šećera, BMK se dijele u dvije skupine: homofermentativne i heterofermentativne. Homofermentativne BMK kataboliziraju glukozu Embden-Meyerhof-Parnasovim putem s laktatom kao krajnjim produktom (najmanje 85 % laktata iz 100 % glukoze; Slika 3). S obzirom na nedostatak aldolaze i trioza fosfat izomeraze, heterofermentativne BMK metaboliziraju glukozu proizvodeći ekvimolarne količine laktata, etanola i CO<sub>2</sub> pentoza fosfatnim putem. Tijekom ovih reakcija, samo jedan mol ATP-a proizlazi iz jednog mola glukoze (ogranak [A], Slika 4), dok iz homolaktične fermentacije proizlaze 2 mola ATP-a. U prisutnosti elektron akceptora, kao što su fruktoza, citrat, malat,

fumarat, kisik ili nezasićene masne kiseline (Stolz, Böcker i sur., 1995) te uz zadanu količinu enzima (acetat kinaza), acetat i ATP mogu se ugraditi umjesto etanola (ogranak [B], Slika 4). U ovim uvjetima, heterolaktična fermentacija glukoze također rezultira s 2 mola ATP-a. Fakultativno heterofermentativni laktobacili fermentiraju heksoze do laktata kao i homofermentativne bakterije, ali imaju dodatnu mogućnost iz pentoza proizvoditi etanol i laktat bez proizvodnje CO<sub>2</sub>. Ova vrsta fermentacije nije detektirana kod organizama vodenog kefira. Tablica 1 prikazuje homo- i heterofermentativne vrste BMK uključene u združenu zajednicu vodenog kefira.

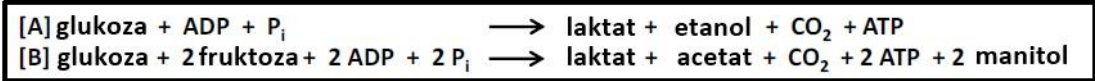
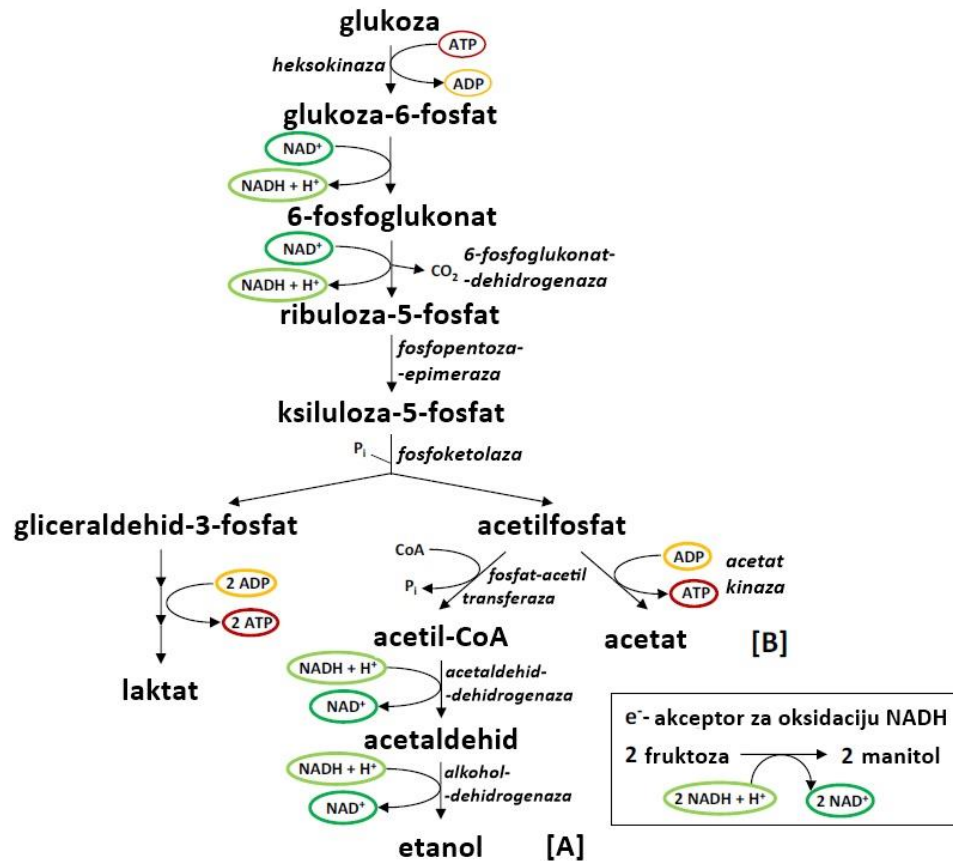
Transport saharoze u stanice može se odviti uglavnom pomoću fosfotransferaznog sustava uz simultanu fosforilaciju saharoze u saharoza-6-fosfat ili, alternativno, putem kationskog simport sustava (Kaditzky, 2008).

**Tablica 1.** Homo- i heterofermentativne vrste BMK u vodenom kefiru (Gulitz i sur., 2013, 2011)

Homofermentativne BMK	Heterofermentativne BMK
<i>Lactobacillus hordei</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Lactobacillus nagelii</i>	<i>Leuconostoc citreum</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>
<i>Lactobacillus satsumensis</i>	



**Slika 3.** Mliječno-kiselo vrenje homofermentativnih BMK (Doenecke i sur., 2005)



**Slika 4.** Mliječno-kiselno vrenje heterofermentativnih BMK (Goyal, 1999)

### 2.2.1.2. Bakterije octene kiseline (BOC)

BOC su Gram-negativne, kiselinsko rezistentne (do pH 2,6), obligatno aerobne bakterije koje obuhvaćaju rodove *Acetobacter* i *Gluconobacter*, a u prirodi se mogu pronaći na biljnim staništima bogatim ugljikohidratima i etanolom. *Gluconobacter* mikroorganizmi generiraju energiju nepotpunom oksidacijom ugljikohidrata ili alkohola, što rezultira odgovarajućim oblicima kiselina (npr. glukonska kiselina nastaje iz glukoze, a octena kiselina iz etanola) (Jakob i sur., 2012; Krämer, 2007), dok *Acetobacter* sp. dalje oksidiraju octenu kiselinu u CO<sub>2</sub> i vodu. Danas su BOC vrlo važne za komercijalnu proizvodnju octene kiseline (Gullo i Giudici, 2008; Krämer, 2007), a upravo to je razlog zašto su nepoželjne tijekom

fermentacije vina. Mnogi sojevi BOC mogu se identificirati kao proizvođači fruktana, čiji egzopolisaharid sadrži samo monomere fruktoze (Jakob i sur., 2013, 2012).

### **2.2.1.3. Bifidobakterije**

Bifidobakterije (*Bifidobacterium*) su Gram-pozitivni, saharolitički mikroorganizmi. Mliječna kiselina je jedan od njihovih glavnih metabolita, stoga su bifidobakterije dugo bile klasificirane kao BMK, međutim, zbog filogenetskih i metaboličkih razlika su 1974. razdvojene u zasebne skupine (Ballongue, 1993). Monosaharidi se metaboliziraju unutar tzv. bifidus skretnice koja je drugačija od homo- i heterofermentativnog puta kod BMK. Umjesto aldolaze i glukoza-6-fosfat dehidrogenaze, bifidobakterije imaju fruktoza-6-fosfat fosfoketolazu, ključni enzim u njihovom metaboličkom putu i taksonomski marker za *Bifidobacteriaceae*. Slično homofermentativnom putu, bifidus skretnica počinje s konverzijom glukoza-6-fosfata u fruktoza-6-fosfat djelovanjem glukoza-6-fosfat izomeraze, nakon čega se fruktoza-6-fosfat cijepa na acetilfosfat i eritroza-4-fosfat. Konačno, bifidus skretnica rezultira 1,5 molom acetata, 1 molom laktata i 2,5 mola ATP-a iz 1 mola glukoze (Kaditzky, 2008; Pokusaeva i sur., 2011). S obzirom na njihovu sposobnost iskorištavanja različitih tipova oligosaharida, bifidobakterije su prilagođene specifičnim ekološkim nišama te mogu preživjeti u zahtjevnim uvjetima. Dio su bakterijske kolonizacije humanog i životinjskog gastrointestinalnog trakta, a osobito velike količine mogu se naći u fecesu dojene novorođenčadi zbog njihovog metabolizma neprobavljivih oligosaharida iz majčinog mlijeka (Pokusaeva, 2011). Osim korištenja oligosaharida, bifidobakterije su sposobne inhibirati patogene proizvodnjom kiselina, rezultat čega je pad pH, proizvodnjom bakteriocina te blokiranjem adhezijskih receptora za patogene i toksina. Iz tog razloga se kombiniraju za blagotvorni učinak na zdravlje te se često koriste kao probiotici u hrani (Collado i sur., 2005; Rastall i sur., 2005).

Većina *Bifidobacterium* vrsta može se izolirati iz humanog i životinjskog crijeva i obično rastu striktno anaerobno na 37 °C, što je tipično za takvo okruženje. Neke vrste pronađene su i u mliječnom i u vodenom kefiru (Dobson i sur., 2011; Gulitz i sur., 2013). *B. psychraerophilum* je jedina vrsta koja je kultivirana iz vodenog kefira (Gulitz i sur., 2013) i neuobičajena je *Bifidobacterium* vrsta jer može rasti pri niskim temperaturama (do 4 °C) i u aerobnim uvjetima, ali ipak pokazuje optimum rasta pri 37 °C (Simpson i sur., 2004).

#### 2.2.1.4. Kvasci

Kao glavni izvor energije, kvasci glikolizom kataboliziraju glukozu u piruvat. U prisutnosti kisika, NADH mora biti reoksidiran tijekom alkoholne fermentacije. Piruvat se konvertira u acetaldehid i CO<sub>2</sub>, nakon čega se acetaldehid reducira u etanol, što katalizira alkohol-dehidrogenaza (Dickinson i Kruckeberg, 2006). U prisutnosti kisika, piruvat se može prevesti putem staničnog disanja u CO<sub>2</sub> i energiju u obliku ATP-a, stoga je piruvat transportiran u mitohondrij, konvertiran u acetil-CoA i oksidiran putem ciklusa limunske kiseline. Primljeni reducirani koenzimi tijekom glikolize i citratnog ciklusa, NADH i FADH<sub>2</sub>, reoksidiraju se u respiratornom lancu s ciljem proizvodnje energije u obliku ATP-a (Dickinson i Kruckeberg, 2006; Feldmann, 2005). Citratni ciklus nije samo katabolički put za proizvodnju energije, već i anabolički dio proizvodnje intermedijera za formaciju aminokiselina i nukleotida (Feldmann, 2005). *Saccharomyces cerevisiae*, kvasac sadržan u vodenim kefirnim zrnima, fakultativno je anaeroban i sposoban je katabolizirati glukozu aerobno i anaerobno. Respiracija je u mediju koji sadrži glukozu (više od 0,1 %) limitirana i čini manje od 10 % katabolizma glukoze zbog Crabtree efekta (represije glukoze). U prisutnosti glukoze, respiratorni i enzimi glukoneogeneze nisu više sintetizirani te se piruvat koji nastaje prevodi u etanol čak i u prisutnosti kisika (Barnett i Entian, 2005).

Prijenos heksoza u stanice reguliraju heksoza-transportni sustavi inducirani permeazama (Dickinson i Kruckeberg, 2006). Medij vodenog kefira sadrži glukozu i fruktozu, ali glavni šećer korišten za pripremu je saharoza, disaharid ekstracelularno hidroliziran invertazama kvasaca na fruktozu i glukozu (Dickinson i Kruckeberg, 2006; Feldmann, 2005). Naposljetku, heksoze su transportirane u stanice.

*Zygosaccharomyces* vrste su osmotolerantni kvasci, sposobni rasti na supstratima s visokom koncentracijom šećera (Dickinson i Kruckeberg, 2006). Medij vodenog kefira s puno šećera (otprilike 90 g/L) i niskom koncentracijom aminokiselina čini zahtjevno okruženje za mikroorganizme. *Zygorulaspora florentina*, glavni predstavnik kvasaca u vodenom kefiru (Gulitz i sur., 2011), također je osmotolerantni kvasac i može lako izazvati kvarenje hrane, ali je u proizvodnji vodenog kefira poželjan.

### 2.2.1.5. Egzopolisaharidi

Polisaharidi su spojevi velike molekulske mase koji se sastoje od monosaharida vezanih glikozidnim vezama. U prirodi, polisaharidi su široko rasprostranjeni kao strukturne sastavnice (npr. celuloza ili hitin), rezervni materijali (npr. škrob ili glikogen) te tvari koje vežu vodu (npr. agar ili pektin). Funkcionalna svojstva ovise o različitim tipovima veza i grananja, kao i o njihovoj masi i monomerima šećera (Belitz i sur., 2011). Mikrobnim polisaharidima izlučenim ekstracelularno nazivaju se egzopolisaharidima (EPS). EPS se proizvode kao zaštitni agensi protiv dehidracije i različitih napada, npr. toksinima, antibioticima, fagima, predacijom protozoa ili osmotskim stresom. Još jedna funkcija je sposobnost bakterija za prianjanje na čvrste površine s EPS te tvorba biofilma (De Vuyst i Degeest, 1999). Npr., dentalni plak je kompleks biofilma od različitih EPS. Fruktani se mogu koristiti za pohranu energije za druge bakterije u zajednici, a glukani su važni kao adhezijski i agregacijski faktori za kolonizaciju bakterijskog plaka (Russel, 2009).

EPS koji su vezani na površinu stanice izgledaju kao kapsula, dok je EPS koji slobodno difundira sluzav te u nekim slučajevima obje vrste mogu proizvesti isti organizmi. Dodatno, EPS se može klasificirati s obzirom na njihov sastav monomera. Heteropolisaharidi (HePS) sadrže različite monomere šećera s ponavljajućim prekursorskim jedinicama, koje su intracelularno sintetizirane te ekstracelularno polimerizirane, što je energetski ovisan proces (De Vuyst i Degeest, 1999). HePS su važni za okus u ustima i reologiju u fermentiranim mliječnim proizvodima, npr. kefir (50 % glukoze i 50 % galaktoze) u mliječnom kefiru (La Rivière i Kooiman, 1967). Suprotno, homopolisaharidi (HoPS) sadrže samo jedan tip monomera; EPS sastavljen od glukoze naziva se glukani, a onaj od fruktoze fruktan. Također, HoPS se razlikuju i po dominantnim tipovima veza;  $\alpha$ -D-glukani s  $\alpha$ -1,6-vezama i granama na pozicijama 3, 2 i 4 nazivaju se dekstrani, dok je grananje specifično za soj.

Sojevi nekoliko vrsta BMK mogu proizvesti EPS tijekom fermentacije. Za vrijeme mliječno-kisele fermentacije, proizvedeni EPS utječe na teksturu, okus u ustima, percepciju okusa i stabilnost krajnjeg produkta (npr. jogurt, mliječni kefir) (Jolly i sur., 2002). Upotrebom bakterijskih fruktana, Jakob i sur. (2012) su eksperimentima na pšeničnom kruhu ustanovili povećanje volumena i mekoće kruha te usporavanje starenja djelovanjem fruktana. Ipak, EPS nisu u svim slučajevima poželjni. Npr., *Leuconostocaceae* ili BOC proizvode sluz koja uzrokuje začepljenje cijevi i gubitke u industriji šećera te kvarenje zaslađenih bezalkoholnih pića, što rezultira sluzavošću (De Vuyst i Degeest, 1999; Korakli i Vogel, 2006).

### 2.2.2. Simbioza u fermentaciji hrane

U prirodi, mikrobnе vrste koegzistiraju i međusobno djeluju jedna na drugu. Simbioza podrazumijeva međudjelovanje dvaju mikroorganizama koje je nužno za opstanak jedne vrste, a generalno uključuje mutualizam (oba mikroorganizma imaju korist od međudjelovanja, ali mogu živjeti i zasebno), komenzalizam (jedna vrsta potpomaže rast druge) i parazitizam (međudjelovanje je korisno za parazita, ali štetno za mikroorganizam domaćina) (Görtz, 1988).

Najbolji okus fermentirane hrane osigurava se mješavinom starter kultura koje proizvode aktivne komponente željenih aroma. Simbioza u vidu mutualizma i komenzalizma široko je rasprostranjena u fermentiranoj hrani, npr. u jogurtu, mliječnom kefiru ili kiselom tijestu. Pozadinu interakcija teško je odrediti, posebice jer postoji širok raspon mikroorganizama u različito združenim zajednicama (De Vuyst i Neysens, 2005; Farnworth, 2005; Gulitz i sur., 2011).

Primjer simbioze mikroorganizama je mliječni kefir, gdje organizmi stanuju u zrcima temeljenim na polisaharidu kefiranu (La Rivière i Kooiman, 1967; Lopitz-Otsoa i sur., 2006). Interakcije između mikroorganizama koji sudjeluju nisu potpuno razjašnjene, do danas nije izvedena uspješna rekonstrukcija mliječnih kefirnih zrnaca iz mješavine izolata. Ipak, Cheirsilp i sur. su istražili interakciju između *Lactobacillus kefiranofaciens* i *Saccharomyces cerevisiae* u mješovitoj kulturi, stavljajući naglasak na poboljšanje proizvodnje kefirana i kapsularnog kefirana (Cheirsilp, Shimizu i sur., 2003). Ustanovili su da su brzine rasta *Lactobacillus kefiranofaciens* i proizvodnje kefirana veće zbog toga što *Saccharomyces cerevisiae* troši mliječnu kiselinu. Lopitz-Osoa i sur. (2006) u svojoj su recenziji pretpostavili da laktoza-negativni, ali galaktoza-pozitivni kvasci u mliječnom kefiru imaju koristi od galaktoze koju otpuštaju BMK nakon hidrolize laktoze.



## 2.3. Bakterijska nanoceluloza

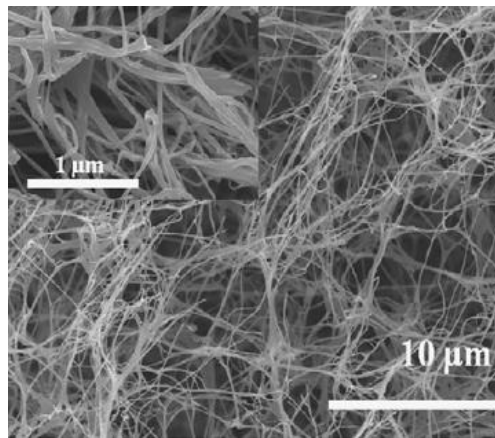
Smatra se da je polisaharid celuloza najprisutniji prirodni polimer u svijetu. U prirodi je u velikim količinama proizvode biljke i alge, gdje je prisutna kao esencijalna komponenta staničnih stijenki. Osigurava ne samo mehaničku čvrstoću u zidu koji okružuje stanice ovih organizama, već i doprinosi smjeru rasta stanica, a u ostalim organizmima izlučuje se kao ekstracelularni produkt. Bakterijska nanoceluloza (BNC) je materijal s jedinstvenim svojstvima, proizvod je primarnog metabolizma nekoliko vrsta bakterija, najčešće roda *Acetobacter*. Najvažnija je *Acetobacter xylinum*, preimenovana u *Gluconacetobacter xylinus* (Yamada i sur., 1997); široko je rasprostranjena i nalazi se posvuda gdje se odvija fermentacija šećera ili biljnih ugljikohidrata, npr. na površini trulog voća ili u nepasteriziranom i nesteriliziranom soku, pivu i vinu. Iako su molekulska formula  $((C_6H_{10}O_5)_n)$  i struktura slične onima celuloze proizvedene iz drveta, najveća prednost je ta što bakterije proizvode čistu celulozu, bez ostalih biljnih komponenata (hemiceluloza i lignin), te mikrofibrili tvore trodimenzionalnu mrežu koja osigurava poroznost i visoku mehaničku čvrstoću (Mohite i sur., 2014). U usporedbi s biljnom celulozom, BNC ima značajno veću kristaliničnost (80-90 %) (Keshk, 2014), kapacitet apsorpcije vode zbog velike površine i hidrofilne prirode, tvoreći vrlo čvrst hidrogel (Gama i sur., 2013) i stupanj polimerizacije (do 8000) (Dahman, 2009). Još neke prednosti BNC su odličan biološki afinitet, biokompatibilnost, biorazgradivost, odlična fleksibilnost i mogućnost oblikovanja, zbog čega BNC ima raznu komercijalnu primjenu koja uključuje tekstil, kozmetiku, hranu te za medicinsku primjenu.

### 2.3.1. Struktura bakterijske celuloze

Celuloza se sastoji od  $\beta$ -1,4-glukanskih lanaca koji se nakupljaju i tako tvore kristalinične i amorfne oblike, ovisno o tome kako se lanci formiraju. Struktura celuloze koju proizvode žive stanice usko je povezana s njenom sintezom, a organizacija i raspored mjesta sinteze celuloze na staničnoj membrani važne su za paralelan raspored  $\beta$ -1,4-glukanskih lanaca (Brown, 2000). *G. xylinus* celulozu proizvodi u dva oblika: celulozu I i celulozu II, koja je termodinamički stabilnija. Iako je kristalinična celuloza I oblik koji je nastao pomoću živih stanica, stabilniji oblik celuloze je celuloza II, u kojoj su glukanski lanci orijentirani antiparalelno (Yu i Atalla, 1996). Ovaj oblik celuloze stanice obično ne sintetiziraju te je najčešće dobiven kemijskom obradom native celuloze I. Celuloza I sastoji se od dva

polimorfna strukturalna oblika,  $I_{\alpha}$  i  $I_{\beta}$ , koji koegzistiraju u različitim udjelima, ovisno o izvoru celuloze.  $I_{\alpha}$  struktura je dominantni polimorf u većini alga i bakterija, dok je  $I_{\beta}$  dominantni polimorf u biljnoj celulozi.  $I_{\alpha}$  polimorf je metastabilni oblik i može se konvertirati do  $I_{\beta}$  oblika blagim toplinskim obradama u lužnatim otopinama ili pri vrlo visokim temperaturama u organskim otapalima (Czaja i sur., 2007).

Istraživanja o strukturi, sintezi i primjeni celuloze najviše se fokusiraju na biljke, s obzirom na to da su one glavni proizvođači celuloze. Međutim, značajna otkrića o sintezi celuloze proizlaze iz istraživanja bakterija i BNC koja pronalazi brojne primjene u industriji.



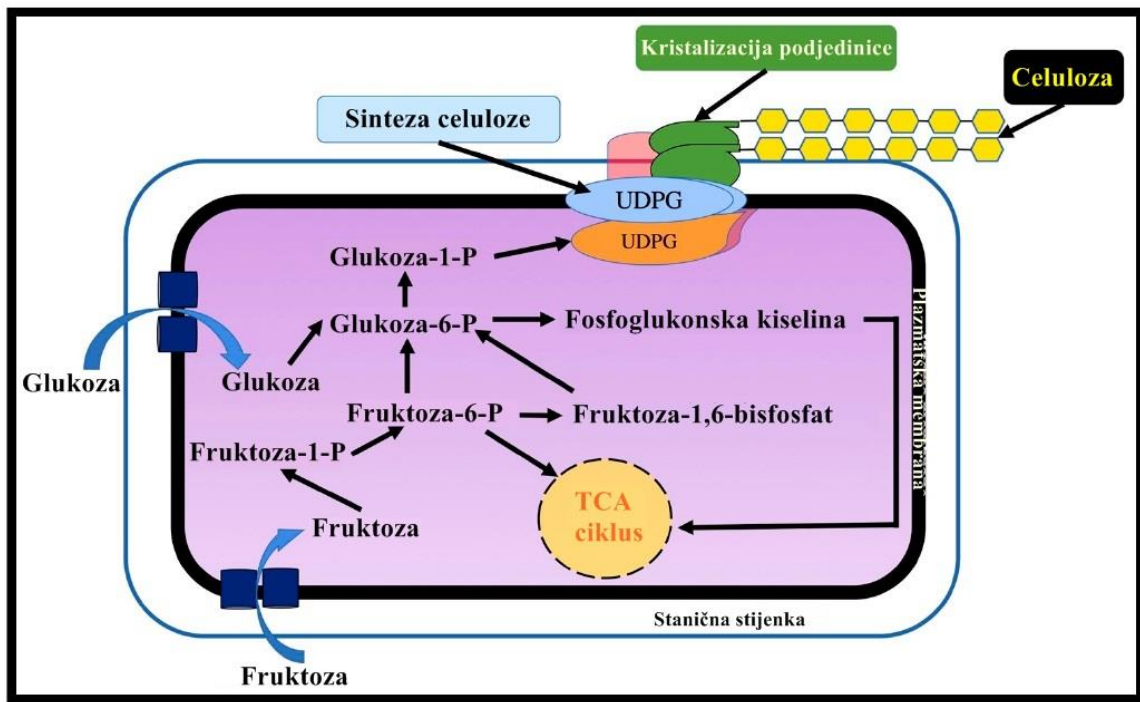
**Slika 5.** SEM snimka bakterijske celuloze koja prikazuje koherentnu 3D mrežu formiranu pomoću celuloznih vlakana povezanih fizičkim zglobovima (Ul-Islam i sur., 2012)

### 2.3.2. Sinteza bakterijske celuloze

Bakterije koje proizvode celulozu koriste pentoza fosfatni ili Krebsov ciklus, ovisno o fiziološkom stanju stanice, u kombinaciji s glukoneogenezom (Ross i sur., 1991). Ipak, *G. xylinus* ne može anaerobno metabolizirati glukozu zbog nedostatka fosfofruktokinaze, enzima nužnog za glikolizu (Gromet i sur., 1957). Sinteza BNC točan je i specifično reguliran višestupanjski proces koji uključuje veći broj enzima, kao i skupina katalitičkih i regulatornih proteina.

Biosinteza BNC odvija se u 4 enzimska koraka (Slika 6): 1) fosforilacija glukoze, djelovanjem glukokinaze u glukoza-6-fosfat, ili fruktoze, djelovanjem fruktokinaze u fruktoza-6-fosfat, nakon čega slijedi reakcija fosfoglucoizomeraze u glukoza-6-fosfat; 2) izomerizacija

glukoza-6-fosfata u glukoza-1-fosfat djelovanjem fosfoglukomutaze; 3) konverzija glukoza-1-fosfata u uridin difosfat glukoze (UDP-glukoza) pomoću UDPGlc pirofosforilaze; 4) sinteza celuloze iz UDP-glukoze pomoću celuloza sintaze (Ross i sur., 1991). UDP-glukoza direktni je prekursor celuloze i prisutna je u brojnim organizmima (Morgan i sur., 2013). Kada se disaharidi, kao što su saharoza i maltoza, koriste kao izvor ugljika za bakterije koje proizvode celulozu, biosinteza BNC započinje hidrolizom na monosaharide, kao što su glukoza i fruktoza.

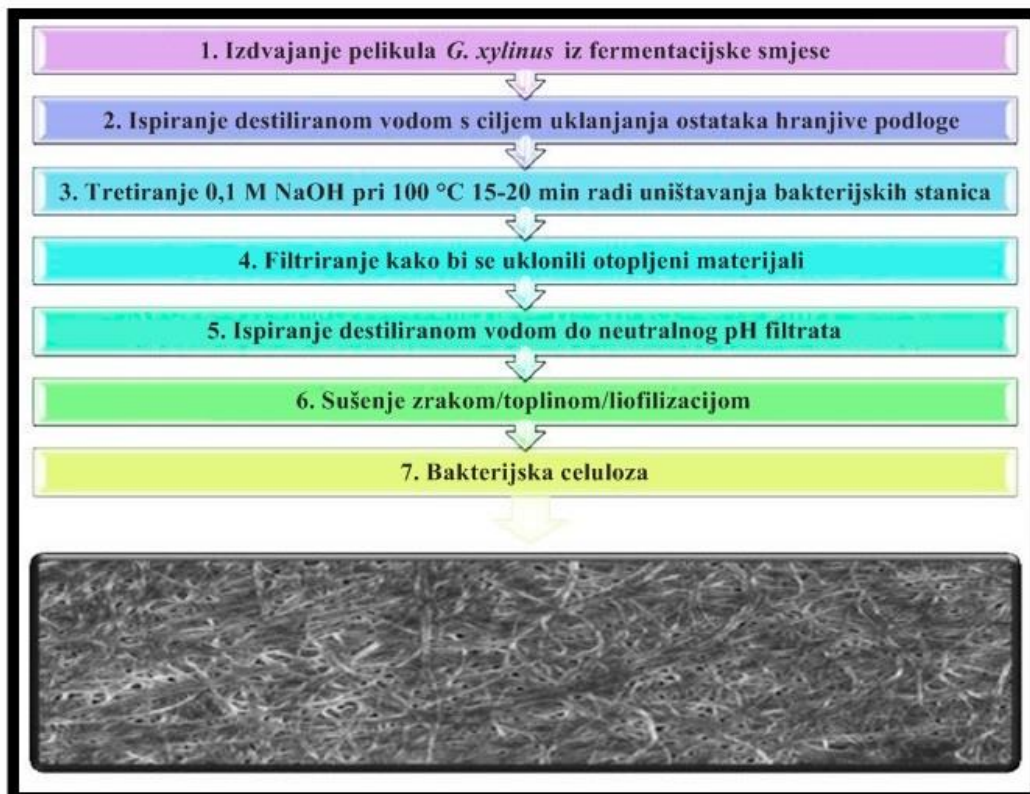


**Slika 6.** Biosintetski put nanoceluloze u stanicama mikroorganizama (Moniri i sur., 2017)

Kod mutanata *G. xylinus*, koji su celuloza negativni (Cel<sup>-</sup>), nedostaje UDPGlc pirofosforilaza, stoga ne mogu proizvesti UDP-glukoze u BNC (Krystynowicz i sur., 2005). Organizacija celuloza sintaze na membrani ključna je radi regulacije različitih staničnih funkcija, uključujući motilitet, formiranje biofilma, progresiju ciklusa stanica i virulenciju kod bakterija. Celuloza sintazu regulira nukleotid bis-(3',5')-ciklički dimerni gvanozin monofosfat (c-di-GMP), koji djeluje kao reverzibilni alosterički aktivator enzima; kada c-di-GMP veže celuloza sintazu, na mjestu udaljenom od aktivnog mjesta, povećava se aktivnost enzima. Koncentraciju c-di-GMP zauzvrat regulira digvanilat ciklaza; ona aktivira c-di-GMP i fosfodiesteraze A i B (PDE-A i PDE-B) koje razgrađuju c-di-GMP. Mehanizam degradacije još uvijek je nerazjašnjen (Ross i sur., 1990). PDE-A je Ca<sup>2+</sup> osjetljiva i istraživanja su pokazala da je inhibirana Ca<sup>2+</sup> ionima, s obzirom na to da je pretpostavljeno da se Ca<sup>2+</sup> natječu za mjesto vezanja s Mg<sup>2+</sup>, ionom nužnim za aktivnost PDE-A (Ross i sur., 1990).

Sinteza celuloze u mikroorganizmima i biljkama slijedi dva međukoraka: 1) stvaranje  $\beta$ -1,4-glukanskog lanca polimerizacijom jedinica glukoze i 2) sintezu i kristalizaciju lanca celuloze (Czaja i sur., 2007). Nakon završetka sinteze (Slika 7), BNC je formirana između vanjske i citoplazmatske membrane stanice (De Ley i sur., 1984). Molekule celuloze sintetiziraju se unutar bakterije, prolaze kroz mjesta za transport celuloze, te formiraju protofibrile promjera 2-4 nm iz kojih nastaje mikrofibril oblika vrpce, duljine otprilike 80 nm (Iguchi i sur., 2000).

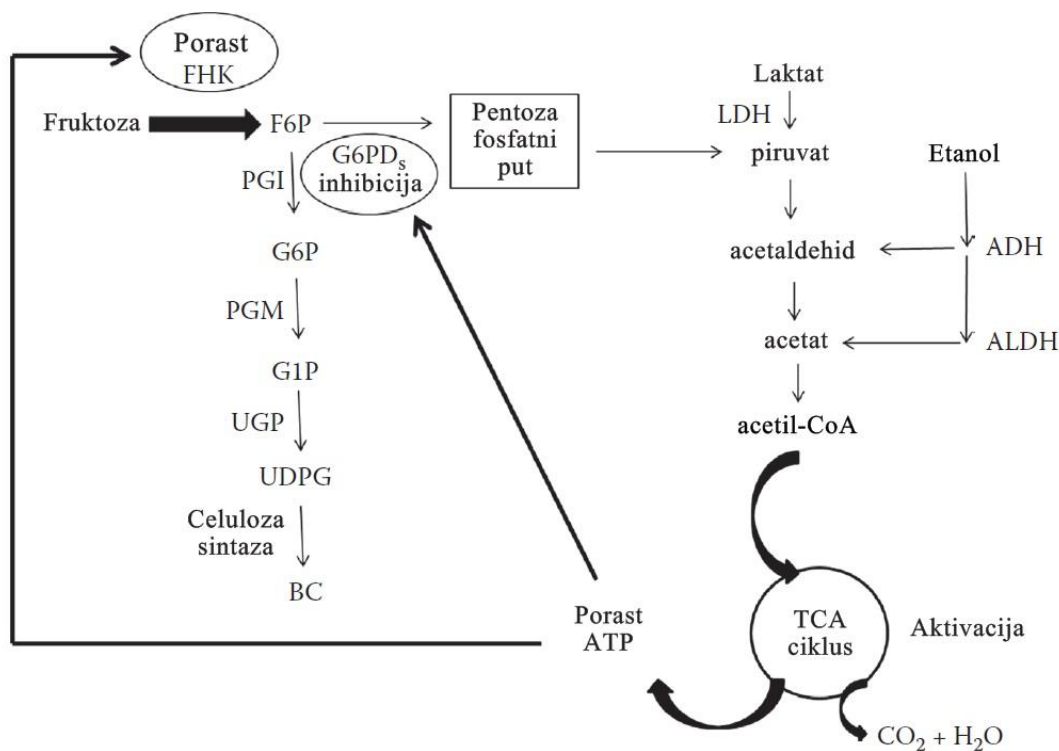
Nakon fermentacije, kako bi se dobila potpuno čista celuloza, nastalu mikrobnu celulozu potrebno je pročititi od prisutnih nečistoća, kao što su stanice i/ili sastojci hranjive podloge. Proces pročišćavanja prikazan je na Slici 7. Najopsežniji primijenjeni proces pročišćavanja BNC u hranjivoj podlozi uključuje korištenje alkalnih tvari, kao što su natrijev i kalijev hidroksid, ili organske kiseline, kao što je octena; moguće je i uzastopno ispiranje fermentirane smjese vrućom ili vodom pročišćenom reverznom osmozom, a navedeni procesi mogu se odvijati odvojeno ili zajedno.



**Slika 7.** Proces pročišćavanja BNC iz *G. xylinus* (Moniri i sur., 2017)

### 2.3.3. Uzgoj bakterijske nanoceluloze

Komponente hranjivog medija imaju značajan utjecaj na proizvodnju BNC u vidu povećanja stope rasta BNC, prinosa i direktnog utjecaja na formaciju mrežne celulozne strukture; bakterije ih često koriste kao izvore energije, a ne kao supstrate za proizvodnju BNC. Spojevi koji poboljšavaju proizvodnju ekstracelularnih polisaharida topljivih u vodi, vjerojatno će utjecati na celuloznu mrežu, budući da na raspored celuloznih lanaca utječe interferencija ekstracelularnih polisaharida. Ostali spojevi u hranjivom mediju mogu utjecati na enzime uključene u metabolički put kojim se sintetizira BNC. Prisutnost lako razgradivog izvora ugljika može dovesti do veće proizvodnje ATP-a, koji ima inhibitoran učinak na enzim glukoza-6-fosfat dehidrogenazu (Slika 8).



**Slika 8.** Utjecaj etanola na proizvodnju BNC u kontinuiranom uzgoju na fruktozi kao izvoru ugljika (Naritomi i sur., 1998)

### **2.3.3.1. Laktat**

Dodatak laktata u hranjivu podlogu pospješuje proizvodnju nanoceluloze kod *G. xylinus*. Laktat generira energiju i povećava koncentraciju bakterija (tj. biomase) tijekom ranih stadija uzgoja, što dovodi do povećanja proizvodnje BNC. Dodajući još laktata u medij, doći će do povećanja koncentracije ATP-a. Utvrđena je korelacija između visoke koncentracije ATP-a i učinkovitosti sinteze BNC (Naritomi i sur., 1998), a taj fenomen vjerojatno je posljedica aktivnosti fruktokinaze koja je pojačana s ATP-om i činjenicom da ATP inhibira glukoza-6-fosfat dehidrogenazu. Ovaj enzim ključan je za „ubacivanje“ glukoza-6-fosfata u pentoza fosfatni put (Kornmann i sur., 2003).

### **2.3.3.2. Etanol**

Oksidacija etanola ima potencijal za proizvodnju dodatne energije za bakterije na sličan način kao i laktat. Ipak, učinak dodatka etanola nije tako značajan kao kod laktata, što vjerojatno ovisi o činjenici da oksidacijom etanola nastaju veće količine acetata koji ima negativan utjecaj na bakterije. Etanol mora biti potpuno oksidiran prije početka oksidacije acetata i porasta biomase. Iz navedenog proizlazi da etanol može povećati proizvodnju BNC putem veće proizvodnje energije, ali ne učinkovito kao laktat, zbog kasnijeg početka proizvodnje biomase (Kornmann i sur., 2003).

### **2.3.3.3. Supstrati bogati ugljikom**

Koncentracija izvora ugljika također utječe na sintezu celuloze; kada koncentracija supstrata poraste, smanjuje se njegovo iskorištenje. Iz tog razloga se mora postići optimalna koncentracija supstrata radi učinkovite i kontinuirane proizvodnje celuloze tijekom kultivacije (Embuscado i sur., 1994). Bez obzira na upotrijebljeni izvor ugljika, prema Kornmann i sur., (2003) postoje dvije glavne faze kultivacije: u prvoj fazi proizvodi se biomasa i dolazi do oksidacije acetata, a druga započinje kad je sav acetat oksidiran i asimilira se samo šećer.

#### **2.3.3.4. Kukuruzna močevina**

Kukuruzna močevina (CSL) može se koristiti kao komponenta kompleksnih mikrobnih hranjivih podloga zato što sadrži različite aminokiseline, od kojih je najvažnija metionin (Matsuoka i sur., 1996); on stimulira rast bakterija tijekom ranih faza kultivacije te smanjuje vrijeme kašnjenja (lag-faza). Dodatak aminokiselina u medij potiče povećanje proizvodnje celuloze, a isti porast u proizvodnji uočen je pri dodatku samostalnog metionina. Metionin povećava proizvodnju biomase u ranim fazama kultivacije, što zauzvrat ima pozitivan učinak na proizvodnju BC (Matsuoka i sur., 1996).

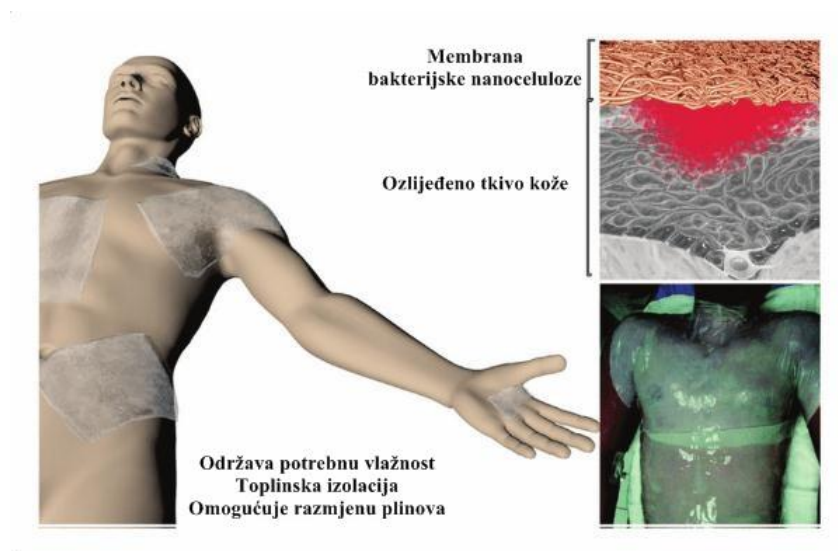
Aminokiseline i amonijak u CSL čine više od 95 % ukupne koncentracije dušika (Cardinal i Hendrick, 1947) i mogu se koristiti kao izvori dušika u hranjivom mediju za razne mikroorganizme. Ustanovljeno je da u različitim CSL šaržama varira i ukupan udjel dušika i mliječne kiseline (Noro i sur., 2004), što može utjecati i na proizvodnju BNC. Verschuren i sur. (2000) dokazali su i da je pH bitan čimbenik u proizvodnji BNC te da je optimalni pH 4-5.

#### **2.3.4. Primjena bakterijske celuloze**

##### **2.3.4.1. Medicina**

BNC je jedinstveni, netoksični hidrogel s dobrim mehaničkim svojstvima koji ima širok raspon primjene u humanoj i veterinarskoj medicini, stomatologiji i farmaceutici. Dokazano je da je biokompatibilan te se pokazao kao kvalitetan sastojak kozmetičkih preparata s hidratantnim i anti-aging svojstvima (Gama i sur., 2013). U medicini primjenu nalazi u izradi obloga s ciljem pospješivanja brzog, gotovo bezbolnog zacjeljivanja rana i opekлина zbog svojih brojnih svojstava: u dugotrajnom kontaktu s ranama ne uzrokuje toksične i alergijske nuspojave, njegov visok kapacitet zadržavanja vode (do 100 puta veći od mase suhe tvari) hidratizira površinu rane, čime sprječava dodatan gubitak tkiva zbog dehidracije, stimulira reakcije litičkih enzima koji uklanjaju rezidualne ostatke u početnim stadijima zarastanja rana, ubrzava obnavljanje ranjenog tkiva do normalnog stanja te značajno umanjuje bol. Visoko je porozan, stoga simultano hidratizira okolinu i apsorbira eksudate, odgovara bilo kojem obliku rane, vrlo je lagan i proziran, formira mehanički izdržljivu i čvrstu fizikalnu barijeru za mikrobnu kontaminaciju i dodatne ozljede te istovremeno omogućava izmjenu plinova, dopušta lako i bezbolno uklanjanje pokrova rana, može se sterilizirati i ne razgrađuje se u sustavima

sisavaca. Fleksibilan je, elastičan i dostupan u bilo kojem obliku i veličini, u njega se mogu injektirati ostale terapijske tvari bez pogoršanja inherentnih svojstava, svojstva mu se mogu prilagoditi individualnim potrebama pomoću namjernih promjena u uvjetima bakterijske kulture te tvori homogenu mješavinu s ostalim biokompatibilnim polimerima, kao što su alginati, hijaluronska kiselina ili topljivi celulozni derivati (Slika 9).



**Slika 9.** Hidrogelna membrana BNC koja održava vlagu tkiva i značajno olakšava bol i zacjeljivanje rana nakon opekline (Czaja i sur., 2006)

Zbog svoje mogućnosti oblikovanja u trodimenzionalnu strukturu tijekom biosinteze, BNC se koristi i u medicinskim implantatima i nosačima za tkivno inženjerstvo. Npr. u slučaju vaskularnih implantata, sinteza materijala i oblikovanje cjevastih proizvoda odvijaju se simultano. Biomehanički učinak (npr. tlak pucanja) i usklađenost, zajedno s biološkim odgovorom (endotelijalizacija, krvna kompatibilnost), ovisni su o morfologiji vlaknaste mreže. Na formaciju mreže utječu nakupina celuloze, pokretljivost bakterija i stopa proliferacije, stoga je razumijevanje utjecaja uvjeta kultivacije na formaciju BNC mreže od velike važnosti. Ipak, prisutan problem je nedostatak kapaciteta za proizvodnju u velikom mjerilu.

Biotehnološka proizvodnja ne dopušta samo kontrolu strukture celulozne mreže, već i oblikovanje i dizajn površine BNC implantata. U koracima nakon sinteze, može se provesti parcijalno ili potpuno sušenje implantata u vakuumu, zagrijavanjem, liofilizacijom ili izmjenom otapala. Dodatno, mogu se pouzdano provesti specifične perforacije materijala promjera kanalića do 300  $\mu\text{m}$ . Kombinacijom BNC s ostalim polimerima ili anorganskim



komponentama (npr. hidroksiapatit) tijekom biosinteze ili nakon nje, formiraju se anokompoziti ili se površine materijala presvlače s BNC. Također, metali i metalni oksidi mogu se lako taložiti na BNC mreži vlakana te se reverzibilno ili ireverzibilno mogu inkorporirati razni aktivni agensi, kao što su farmaceutici i boje.

Kroz pažljivu kontrolu pokretljivosti bakterija, moguće je proizvesti dobro definirane, trodimenzionalne nosače za tkivnu rekonstrukciju. Poseban naglasak je na korištenju električnih polja za proizvodnju prilagođenih i visoko orijentiranih celuloznih mreža, također i na razvoju mikrovaskularnih mreža unutar BNC struktura. Manipulacijom elektrokinetičkim silama, koje djeluju na bakterijsku stanicu, mogu se proizvesti složeni celulozni uzorci u nano-mjerilu, nemoguće ih je postići u statičkim kulturama. Sposobnost upravljanja smjerom orijentacije vlakana može se lako proširiti na tkanje struktura višestrukih slojeva vlakana, i to promjenom orijentacije primijenjenog električnog polja za svaki sloj. Korištenjem takve metode mogu se kreirati strukture sa željenim mehaničkim svojstvima za različite primjene, uključujući tkivno inženjerstvo, mikroelektromehaničke sustave, tekstil i elektroniku.

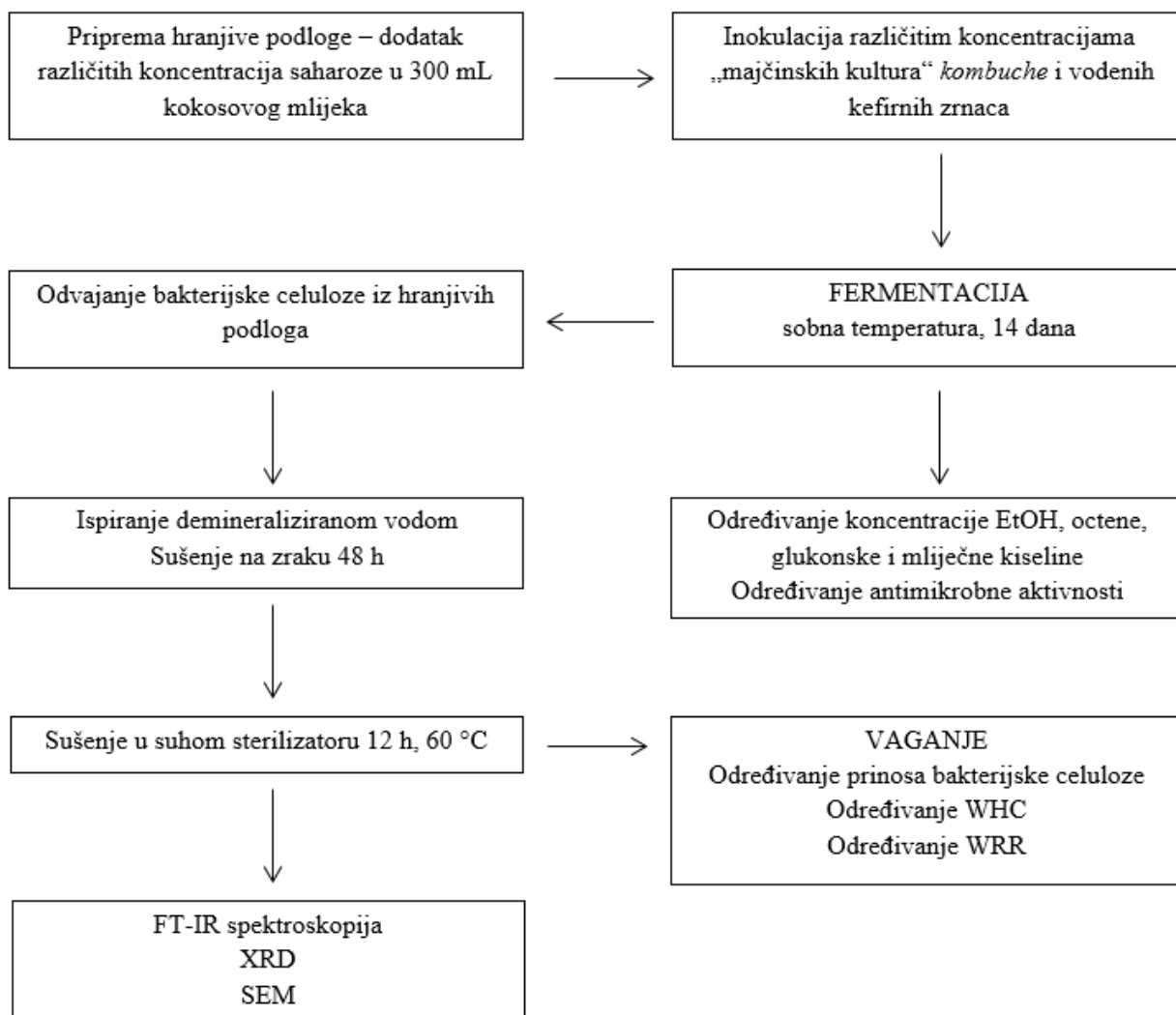
#### **2.3.4.2. Industrija**

Osim u medicini, BNC koristi se u akustičnim i filter membranama, biotehnološkim uređajima te prehrambenoj i industriji proizvodnje papira. Ovisno o primjeni, kemijskim modifikacijama, ugradnji bioaktivnih molekula te modifikacijama poroznosti, moguće je pospješiti kristaliničnost i biorazgradnju, čime se dodatno povećava potencijal BNC.

Jedan od prvih komercijalno dostupnih proizvoda BNC je „nata de coco“. To je bijeli, želatinozni materijal koji se koristi u proizvodnji slatkiša i deserata; proizvodi se fermentacijom kokosove vode ili mlijeka, a potječe s Filipina još od 1990. godine (Gama i sur., 2013). „Nata de coco“ se obično proizvodi u obliku debelih listova čiste celuloze koji se zatim režu u male uniformne kocke, peru te prokuhavaju u vodi, nakon čega se kuhaju u šećernom sirupu. Koristi se u prehrambenim proizvodima, kao što su niskokalorični deserti i salate te hrani bogatoj vlaknima. Vrlo je cijenjen zbog visokog sadržaja dijetetskih vlakana te niskog udjela masti i kolesterola.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Tijek istraživanja



Slika 10. Shematski dijagram tijeka cjelokupnog istraživanja

## 3.2. Materijali i metode rada

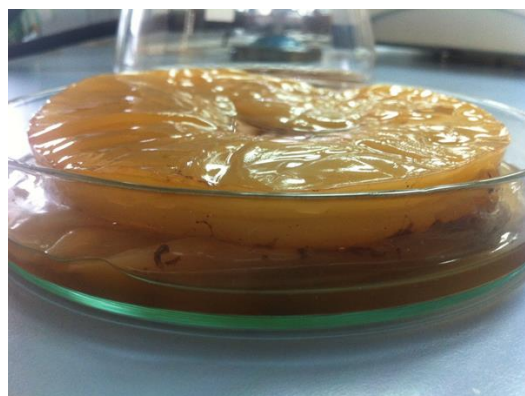
### 3.2.1. Priprava kokulture vodenih kefirnih zrnaca i *kombuche*

Komercijalna kultura vodenih kefirna zrnaca uzgojena je u vodi zaslađenoj s 40 g/L saharoze tijekom 5 dana uzgoja na sobnoj temperaturi.



**Slika 11.** Prikaz vodenih kefirnih zrnaca uporabljenih u istraživanju (osebna fotografija, Antonela Kovačina)

Komercijalna starter kultura *kombuche* pripravljena je s „majčinskom tekućinom“ u zelenom čaju (Franck d.d., Hrvatska) uz dodatak 70 g/L saharoze. Uzgoj je trajao 8 dana u aseptičnim uvjetima pri 28 °C u termostatu.



**Slika 12.** Prikaz *kombuche* uporabljene u istraživanju kao starter kultura (osebna fotografija, Antonela Kovačina)

### 3.2.2. Hranjiva podloga za uzgoj kokulture

Uzgojena vodena kefirna zrnca i *kombucha* nacijepjeni su u pasteriziranu 100 %-tnu kokosovu vodu proizvođača Galleria Internazionale d.o.d., Nizozemska.

**Tablica 2.** Nutritivni sastav kokosove vode uporabljene u istraživanju za uzgoj kokulture

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

**Tablica 3.** Koncentracije saharoze dodane u uzorke kokosovog mlijeka

Oznaka uzorka	$\gamma$ saharoze (g/L)
U1	50
U2	75
U3	100
U4	125
U5	150
U6	175
U7	200

### 3.2.3. Određivanje pH vrijednosti

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

### 3.2.4. Određivanje koncentracije octene kiseline

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

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

gdje je:

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

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

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

### 3.2.5. Određivanje koncentracije glukonske kiseline

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

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

gdje je:

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

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

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

### 3.2.6. Određivanje koncentracije mliječne kiseline

U Erlenmeyer tikvicu od 200 mL stavljeno je 25 mL uzorka fermentirane kokosove vode i dodano nekoliko kapi fenolftaleina. Ovako pripremljeni uzorak titiran je otopinom 0,1 M NaOH do prve pojave ljubičaste boje. Svaki mL 0,1 M NaOH ekvivalentan je 90,08 mg mliječne kiseline. Masena koncentracija mliječne kiseline (mg/mL) izračunata je prema jednadžbi:

$$\gamma(\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}) = (V(\text{NaOH}) \cdot M(\text{NaOH}) \cdot 90,08) / V(\text{uzorka}) \quad (3)$$

gdje je:

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

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

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

### 3.2.7. Određivanje alkohola kemijskom metodom

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

#### Postupak:

U odmjernu tikvicu od 50 mL stavljeno je 5 mL uzorka kokosove vode, koji je razrijeđen s demineraliziranom vodom do 50 mL (odnos kokosove vode i vode je 1:10). Uzorak je prebačen u tikvicu kruškastog oblika od 50 mL i neutraliziran s 0,1 M NaOH. U Erlenmeyer tikvicu od 100 mL, čija je namjena hvatanje destilata, stavljeno je 10 mL otopine kalijevog bikromata i 5 ml koncentrirane  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Destilat se preko hladila i lule uvodio u otopinu kalijevog bikromata u Erlenmeyer tikvicu od 100 mL, koja se držala u rashlađenoj vodi. Destilacija je morala biti polagana i postupna, a trajala je sve dok se sadržaj u tikvici za destilaciju nije smanjio na približno 3 mL (za to vrijeme je alkohol predestilirao). Po završetku destilacije, lula je isprana s nekoliko mlazova destilirane vode u istu Erlenmeyer tikvicu u koju je uzorak predestilirao. Sadržaj tikvice je promućkan, začepljen gumenim čepom i ostavljen stajati 5 minuta radi potpune oksidacije alkohola. Tijekom oksidacije,

utrošen je jedan dio bikromata, dok je drugi ostao u suvišku. Nakon toga je sadržaj kvantitativno prebačen u Erlenmeyer tikvicu od 500 mL uz ispiranje, dodano mu je oko 200 mL destilirane vode radi razrjeđenja i 10 mL 20 %-tne otopine KI (radi određivanja preostale količine kalijevog bikromata) te ostavljeno začepljeno 5 minuta.

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

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

$$\text{alkohol (vol \%)} = \left(10 - \frac{a}{6.9}\right) \cdot 2 \quad (4)$$

a = utrošak 0,1 M otopine  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (mL)

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

Nakon 14 dana fermentacije, plutajući gelovi nanocelulozne biomase, koji su formirani na površini hranjivih podloga, pažljivo su 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 nanoceluloze 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 te nakon toga stavljeni na sušenje u suhi sterilizator pri 50 °C/4 sata. Izmjerena je masa celulozne biomase (g) prema sljedećoj formuli:

$$m_{cb} \text{ (g)} = m_{bt} - m_i \quad (5)$$

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

$$Y_{cb} (\%) = \frac{(\gamma \text{ vlažne biomase nakon fermentacije} - \gamma \text{ vlažnog inokuluma})}{(\gamma \text{ izvora C na početku fermentacije})} \cdot 100 \quad (6)$$

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

Kapacitet zadržavanja vode bakterijske nanoceluloze određivan je nakon 14 dana fermentacije. Biomasa kokulture je iz prevrelih podloga izvađena pomoću plastične pincete, protresena da se ukloni višak tekućine te izvagana. Nakon vaganja, nanocelulozna biomasa pokrivena je filter papirom i ostavljena stajati 48 h na sobnoj temperaturi (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) izračunat je prema formuli (Shezad i sur., 2010):

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

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

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



### 3.2.11. FT-IR spektroskopija

Iz svih uzoraka bakterijske nanoceluloze izdvojeni su tanki slojevi, sušeni u Petrijevim zdjelicama u suhom sterilizatoru pri 60 °C te 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>.

### 3.2.12. Difrakcija rendgenskim zrakama (eng. X ray diffraction; XRD)

Rendgenska difrakcijska analiza provedena je korištenjem difraktometra Shimadzu XRD 6000 s CuK $\alpha$  zračenjem. Uzorci su snimljeni u području 2 $\theta$  5° – 40° s korakom od 0,02°. Veličina kristalita određena je Scherrerovom jednadžbom:

$$B(2\Theta) = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos\Theta} \quad (8)$$

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

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

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

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

#### Postupak:

Uzorak nanocelulozne biomase (0,3 g) stavljen je u Erlenmeyer tikvicu od 300 mL sa šlifom i 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, nakon čega je u reakcijsku smjesu dodano 100 mL zasićene Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sve promiješano

i ostavljeno na tamnom mjestu 1-4 h uz miješanje (magnetna miješalica). Nakon toga je preostali jod određen titracijom s 0,01 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> uz škrob kao indikator (na 50 mL otopine za pipetiranje dodano je 50 mL demineralizirane vode i 1 mL škroba (0,5 %-tna otopina)). Napravljena je i slijepa proba, u kojoj je sve pripremljeno na isti način, osim što se ne dodaje uzorak nanoceluloze, već voda.

Količina apsorbiranog joda izračunata je prema jednadžbi:

$$I \text{ broj} = \frac{(a-b) \cdot 2,04 \cdot 2,54}{m \cdot \left(1 - \frac{w}{100}\right)} \text{ (mg I}_2\text{/g celuloze)} \quad (9)$$

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 zbog toga što se odvija u amorfnim dijelovima molekule celuloze. Inverzna vrijednost jodnog broja razmjerna je kristaliničnim dijelovima celuloze, a izražava se kao indeks kristaliničnosti prema jednadžbi koju su predložili Nelson i sur. (1970):

$$Cr I = 100 - \frac{I \text{ broj}}{412 \cdot 100} \text{ (\%)} \quad (10)$$

### 3.2.15. Određivanje antimikrobne aktivnosti

Antimikrobna aktivnost inhibicija rasta odabranih test mikroorganizama, bakterija vrsta *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* i *Escherichia coli* te dva roda kvasaca, *Candida albicans* i *Schizosaccharomyces pombe*, određivana je metodom radijalne difuzije.

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

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

Nakon toga su očitani rezultati pokusa, pri čemu je zamjećivano postoji li zona inhibicije, je li područje zamućeno ili čisto, te su mjereni promjeri nastalih zona. Svi pokusi provedeni su u trima paralelama te je izračunata srednja vrijednost dobivenih rezultata.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu proučavana je fermentacija kokosove vode s kokulturom vodenih kefirnih zrnaca i *kombuche* te biotransformacija do sinteze bakterijske nanoceluloze. Tijekom 14 dana aerobne fermentacije na sobnoj temperaturi praćeni su različiti parametri: promjene pH vrijednosti kokosove vode, koncentracija octene, glukonske i mliječne kiseline, etanola, kinetika sinteze bakterijske nanoceluloze, sposobnost zadržavanja i brzina otpuštanja vode, određivanje kristaliničnosti bakterijske nanoceluloze te antimikrobna svojstva fermentirane kokosove vode.

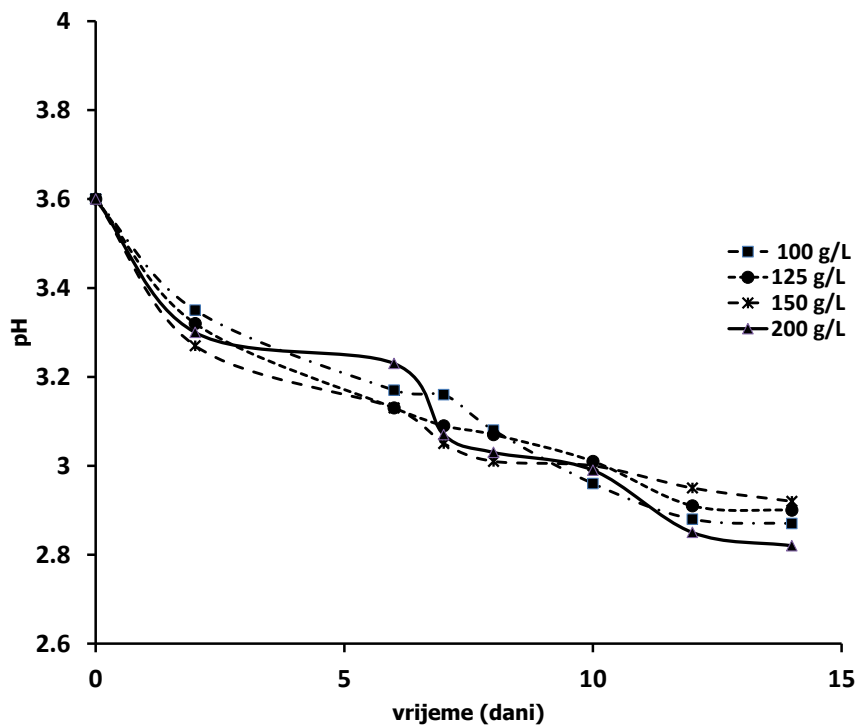
### 4.1. Promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije

Tijekom fermentacije kokosove vode, kao rezultat nastajanja organskih kiselina, pH vrijednost se smanjivala (Slika 13). Konačna pH vrijednost fermentirane kokosove vode nakon 14 dana uzgoja je bila između 2,91 i 2,8, što je puno niža vrijednost od optimalne pH vrijednosti za rast kvasaca (pH 4,8-5,2). 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 7,0-8,0 (Bergey i Holt, 1994). Rezultati dobiveni ovim istraživanjem ukazuju da su bakterije octene kiseline iz *kombuche* sposobne rasti te proizvoditi organske kiseline i bakterijsku nanocelulozu čak i pri pH vrijednostima nižim od 2,8 (Slike 14-16).

Međutim, ne postoji jednostavan odnos između pH vrijednosti metabolita i sadržaja nastalih kiselina. Smanjenje pH vrijednosti slijedi neku vrstu eksponencijalnog zakona s naglim padom vrijednosti u prvim danima fermentacije, dok se kasnije linearno snižava (Slika 13). Ovaj se fenomen može povezati s puferskim učinkom koji proizlazi iz reakcija između sintetiziranih organskih kiselina i minerala, sastavnih dijelova supstrata (Lončar i sur., 2000), a kokosova voda je vrlo bogata mineralima.

Istraživanjima je dokazano da optimalna pH vrijednost za proizvodnju bakterijske celuloze ovisi o vrsti bakterija octene kiseline, interval u kojem se te vrijednosti kreću je između 4,0 i 7,0, a prema Son i sur. (2001), najbolji rezultati dobiveni su pri pH 6,5. Ipak, u industrijskoj proizvodnji bakterijske celuloze za biomedicinske primjene (Biofill i Gengiflex),

pH mora biti održavan na niskim vrijednostima, između 4,0 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 nanoceluloze izrazito važno održavanje pH podloge na vrijednosti na kojoj se postiže maksimalni prinos BNC, uz minimalnu mogućnost kontaminacije.



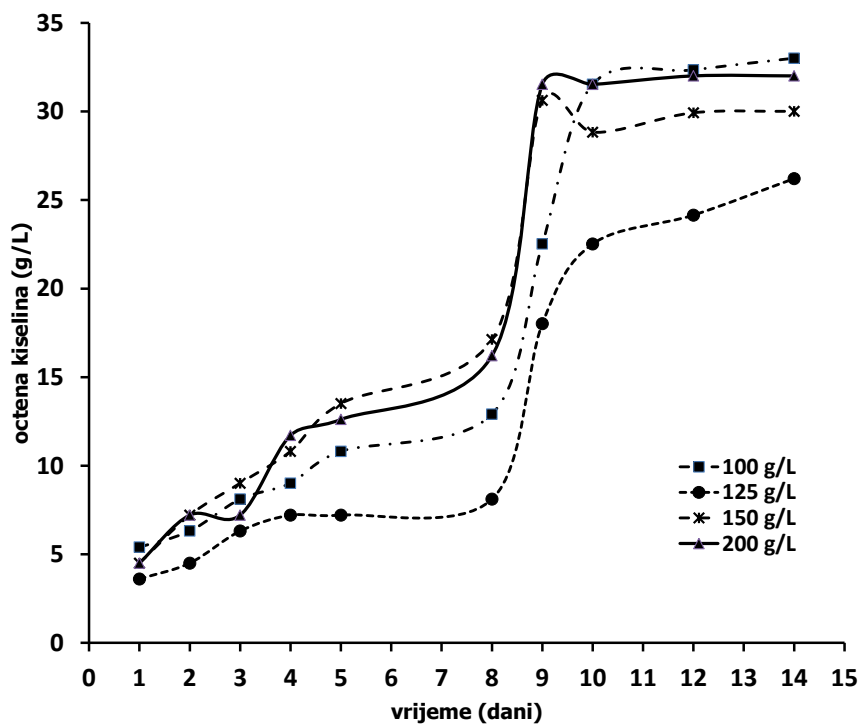
**Slika 13.** Promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije kokosove vode s kokulturom kefirnih zrnaca i kombuche

## 4.2. Organske kiseline i etanol

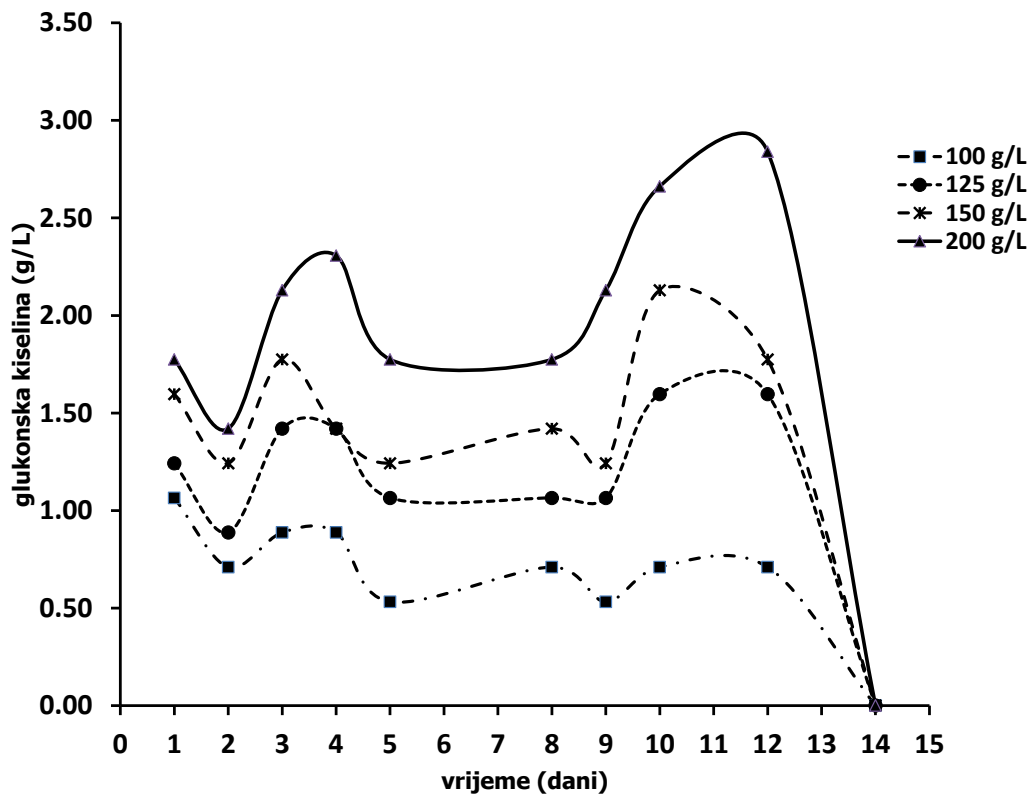
Tijekom fermentacije, bakterije i kvasci metaboliziraju različite izvore ugljika do organskih kiselina, uglavnom do octene i glukonske koje nastaju u većim koncentracijama, a u vrlo malim (manje od 1 g/L) i do glukuronske, mliječne i limunske (Jayabalan i sur., 2007). Invertaza iz kvašćevih stanica hidrolizira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

Koncentracija sintetiziranih organskih kiselina mijenjala se tijekom fermentacije, što je prikazano na Slikama 14-16. Koncentracija octene kiseline se tijekom 14 dana fermentacije, ovisno o koncentraciji dodane saharoze, povećavala od 3,6 g/L na početku istraživanja do 21 g/L na kraju (100 g/L), pri čemu je linearni rast izmjeren do 8. dana fermentacije, nakon čega se koncentracija nije značajnije mijenjala (Slika 14). Pri koncentracijama od 125 i 150 g/L primijećen je linearni rast koncentracije octene kiseline tijekom cijelog tijeka fermentacije, no konačne su se koncentracije dosta razlikovale, pa je pri 125 g/L izmjereno 15 g/L (Slika 14), a pri 150 g/L 19,2 g/L. Kod fermentacije s 200 g/L saharoze uočen je blagi rast koncentracije octene kiseline sve do 12. dana, nakon čega je naglo porasla te je na kraju fermentacije iznosila 12,00 g/L (Slika 14). Uz sposobnost sinteze relativno visokih koncentracija octene kiseline, bakterije octene kiseline pokazuju i toleranciju na kiselost, koja je rijetka među aerobnim homotrofima i heterotrofima. Ovo im svojstvo omogućava rast na hranjivoj podlozi koja već na početku uzgoja ima pH vrijednost nižu od 4,5 (Malbaša i sur., 2008); u ovom je radu početna koncentracija octene kiseline bila između 1,8 i 3,0 zato što je, s BNC uzgojenom u zelenom čaju, dodan i majčinski fermentirani čaj.

Glukozu bakterije octene kiseline oksidiraju u glukonsku kiselinu, što je druga glavna organska kiselina koja nastaje kao posljedica metabolizma *kombuche*. Kao što je vidljivo na Slici 15, koncentracija glukonske kiseline bila je i do 10 puta manja od koncentracije octene kiseline nakon 2 dana fermentacije (100 g/L), no rasla je tijekom fermentacije. Isti su rezultati dobiveni tijekom fermentacija s većim koncentracijama šećera, pri kojima je uočena niska koncentracija glukonske kiseline na početku i linearni rast do kraja istraživanja (Slika 15).

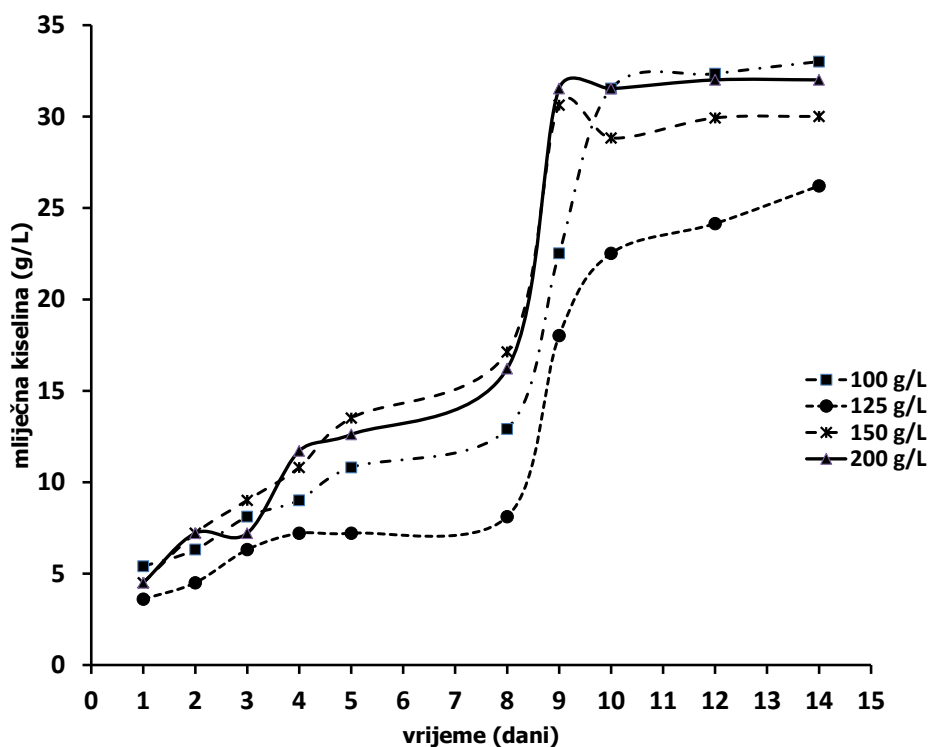


**Slika 14.** Kinetika nastajanja octene kiseline tijekom 14 dana fermentacije kokosove vode s kokulturom vodenih kefirnih zrnaca i *kombuche*



**Slika 15.** Kinetika nastajanja glukonske kiseline tijekom 14 dana fermentacije kokosove vode s kokulturom vodenih kefirnih zrnaca i *kombuche*

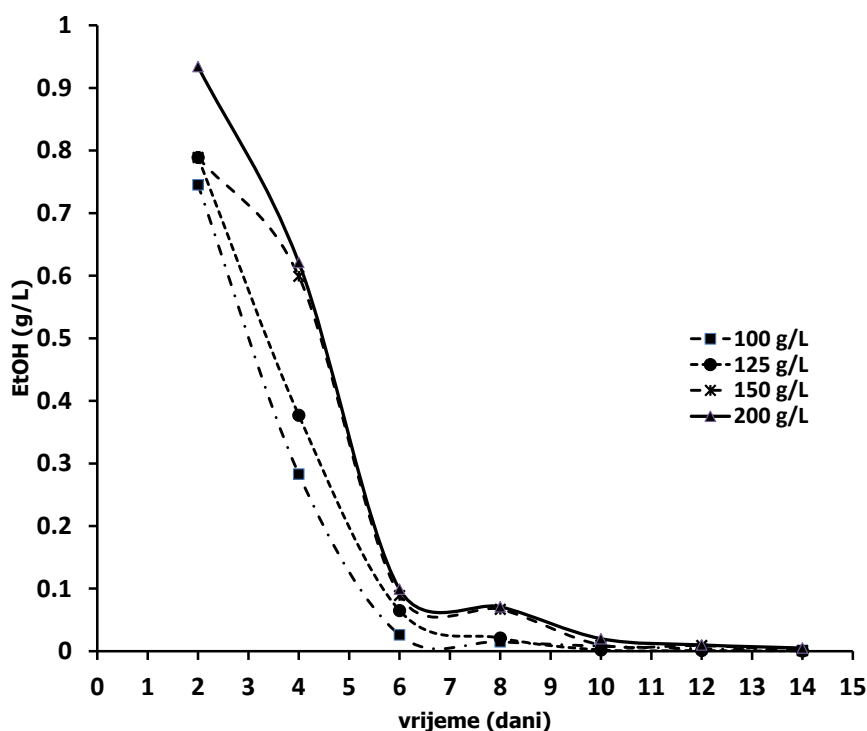
Porast koncentracije mliječne kiseline, tijekom fermentacije kokosove vode pri različitim koncentracijama dodane saharoze, prikazana je na Slici 16, gdje je vidljivo linearno, ali blago povećanje koncentracije mliječne kiseline do 8. dana, nakon čega je koncentracija naglo porasla kod svih koncentracija šećera, osim kod 125 g/L. Nastajanje mliječne kiseline je više nego poželjno, ne samo zbog punoće okusa fermentirane kokosove vode, već i zbog toga što je prirodni konzervans, a istovremeno na prirodni način potiče metabolizam *kombuche*. Pri nastajanju mliječne kiseline, piruvat i laktat su krajnji proizvodi prvog anaerobnog koraka u glikolizi. S obzirom da je kokultura vodenih kefirnih zrnaca i *kombuche* simbioza aerobnih bakterija octene kiseline, osmofilnih fakultativno anaerobnih kvasaca i mikroaerofilnih bakterija mliječne kiseline, može se zaključiti da ova združena kultura može djelovati bez dodatne aeracije, tako da proizvedena mliječna kiselina može poslužiti kao elektronski poticaj (Handy, 2006).



**Slika 16.** Kinetika nastajanja mliječne kiseline tijekom 14 dana fermentacije kokosove vode s kokulturom vodenih kefirnih zrnaca i *kombuche*



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. Reiss (1994) je ispitivao utjecaje različitih izvora ugljika (saharozu, laktozu, glukozu i fruktozu) na metabolizam *kombuche*, te uočio da koncentracija proizvedenog EtOH ovisi o vrsti i količini dodanog šećera. U ovom radu je u kokosove vode dodano od 100 do 200 g/L saharoze (konzumni bijeli šećer) i već nakon 2. dana fermentacije izmjerena je maksimalna koncentracija EtOH, od 0,75 do 0,92 g/L, koja se u 4. danu smanjila na vrijednosti od 0,29 do 0,61 g/L, a nakon toga je pala na manje od 0,05 g/L i nije se značajnije mijenjala do kraja fermentacije (Slika 17).



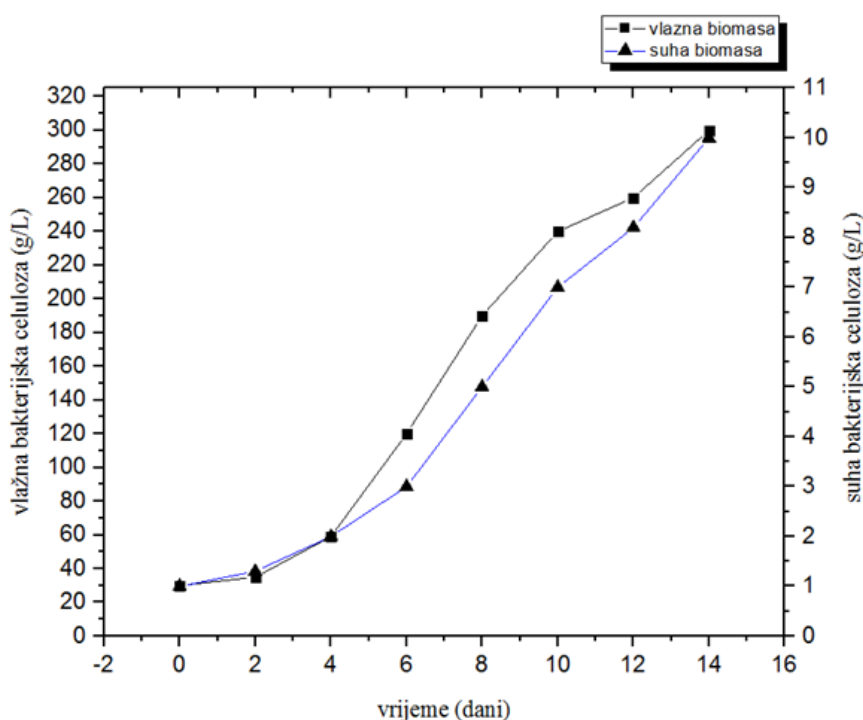
**Slika 17.** Kinetika nastajanja i biooksidacije etanola tijekom 14 dana fermentacije kokulture kefirnih zrnaca i *kombuche* u kokosovoj vodi

Važno je napomenuti da su uzorci naciepljenih kefirnih zrnaca i *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 rezultat različitosti mikroflore koja je posljedica izvorišta *kombuche*. Mayser i sur. (1995) objavili su 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).

### 4.3. Sinteza bakterijske nanoceluloze

Biotransformacijom kokosove vode nastaje celulozna opna koja se u tankom sloju oblikuje na površini tekućine (Sievers i sur., 1995). Na površini celulozne pelikule nalazi se velik 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 18 prikazana je kinetika nastajanja bakterijske nanoceluloze, iz koje je vidljivo linearno povećanje mase celuloze tijekom 14 dana uzgoja. Prinos biomase tijekom fermentacije usko je povezan s izvorom ugljika, odnosno supstratom. Prema dobivenim rezultatima, saharoza (100 g/L) je izvrstan supstrat jer je nakon 14 dana fermentacije izmjereno 300 g/L vlažne bakterijske celuloze, odnosno 10 g/L suhe bakterijske biomase (Slika 18).

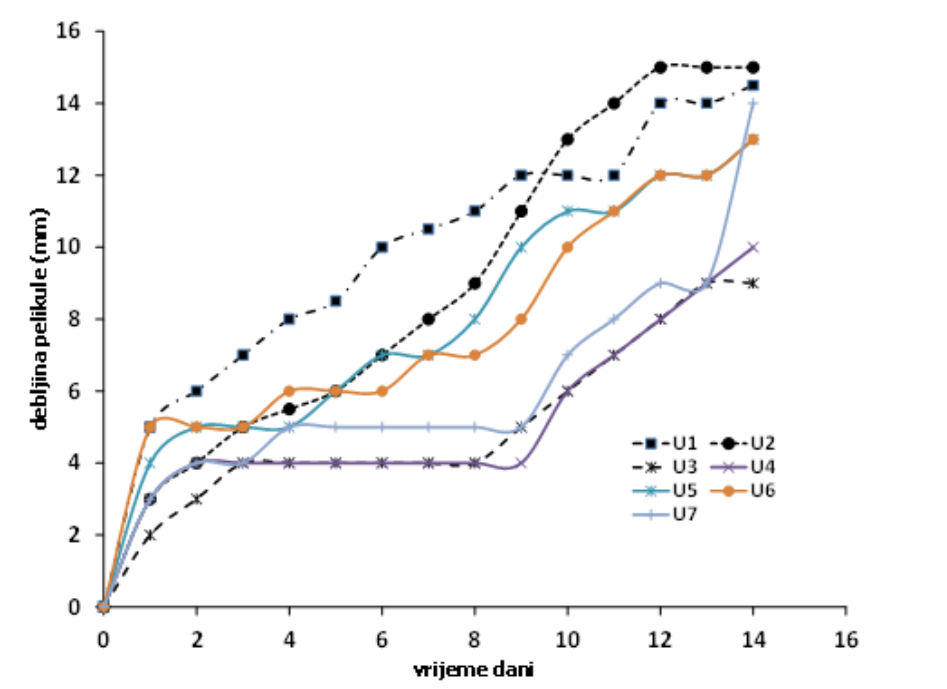


**Slika 18.** Utjecaj trajanja fermentacije na sintezu bakterijske nanoceluloze u kokosovoj vodi (150 g/L saharoze)

Posljednja 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).

Prinos bakterijske nanoceluloze rezultat je sposobnosti bakterija octene kiseline da apsorbiraju glukozu iz različitih supstrata s ugljikom, nakon čega je polimeriziraju do nanoceluloze. 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 19. prikazani su rezultati praćenja kinetike sinteze bakterijske nanoceluloze tijekom 14 dana uzgoja u kokosovoj vodi. Prema dobivenim rezultatima, u svim je uzorcima zabilježen linearni rast debljine sintetizirane BNC. Najmanja debljina nanocelulozne pelikule uočena je kod uzorka s 125 g/L šećera (U4).

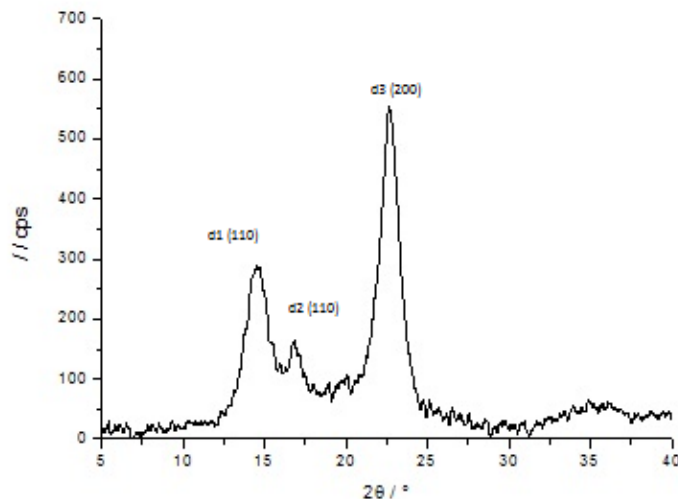


**Slika 19.** Kinetika sinteze bakterijske nanoceluloze u kokosovoj vodi uz dodatak različitih koncentracija šećera

#### 4.4. Difrakcija rendgenskim zrakama (XRD)

S ciljem istraživanja mikrostrukturnih promjena u uzorku BNC, kao i mogućih promjena u procesu kristalizacije, uzorak (150 g/L saharoze) analiziran je rendgenskom difrakcijom X-zrakama (XRD). Slika 20 prikazuje tipični izgled difraktograma koji predstavlja profil celuloze I. Kvantitativna analiza odziva, koji korespondira sa sva tri vrha, ukazuje na blage promjene u  $d$ -međuplošnom razmaku u kristalnoj rešetki BNC, a one predstavljaju različite udjele  $I_\alpha$  i  $I_\beta$  celuloznih alomorfa (Watanabe et al., 1998).

Istraživani uzorak pokazao je manje ili više izražene difrakcijske maksimume karakteristične za nanocelulozu te amorfni halo (odstupanje od ravne bazne linije), što pokazuje da je celuloza razmjerno dobro kristalna (Slika 20).



**Slika 20.** Difraktogram rendgenskim zrakama bakterijske nanoceluloze nakon 14 dana fermentacije kokulture vodenih kefirnih zrnaca i *kombuche* u kokosovoj vodi (koncentracija šećera 150 g/L)

**Tablica 3.** Rezultati XRD mjerenja uzorka BNC sintetizirane tijekom fermentacije kokulture vodenih kefirnih zrnaca i *kombuche* u kokosovoj vodi s dodatkom 45 g/L saharoze

Uzorak	$d_1 / \text{Å}$	$d_2 / \text{Å}$	$d_3 / \text{Å}$	$2\theta_2 - 2\theta_1 / ^\circ$	$t_1 / \text{nm}$	$t_2 / \text{nm}$	$t_3 / \text{nm}$
kokos 150 g/L	6,08	5,26	3,92	2,28	6,6	13	6,5

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

$t$  – veličina kristalita određena Scherrerovom jednačbom

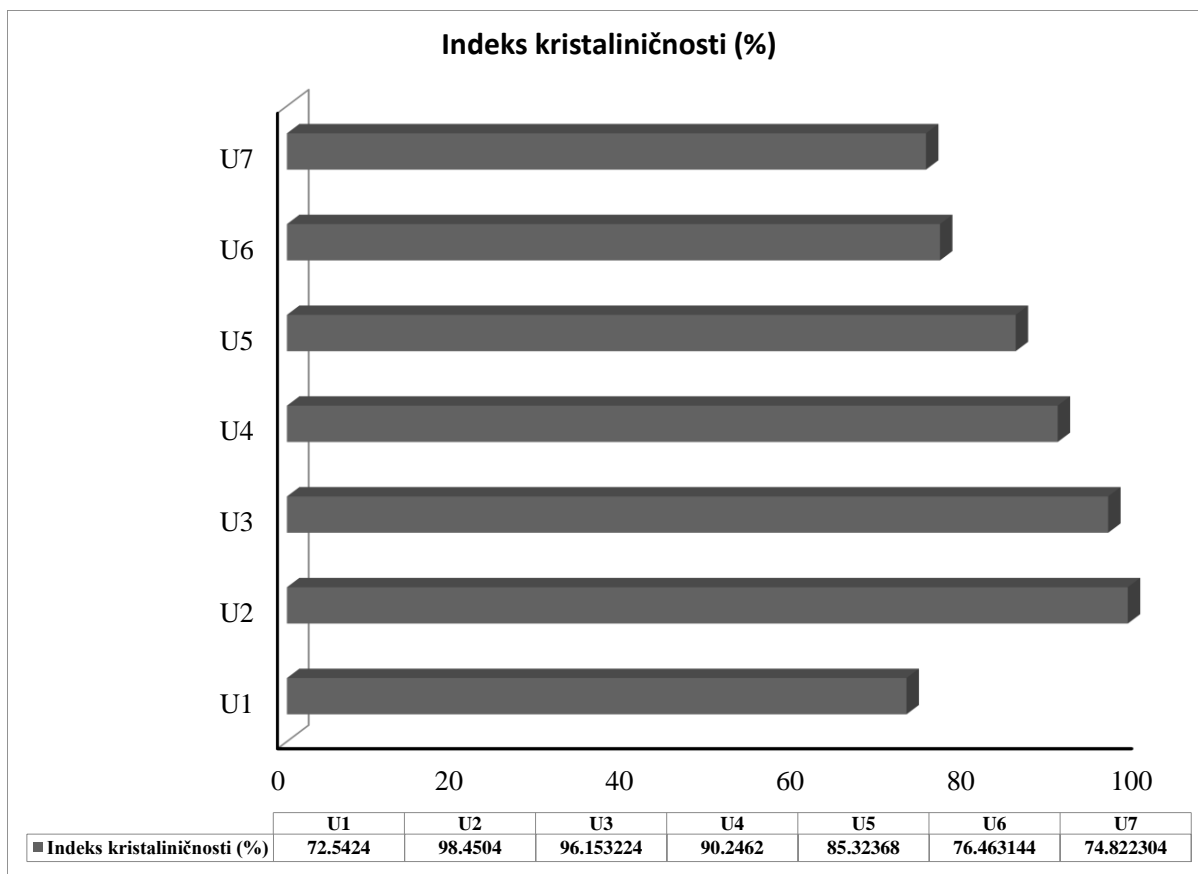
Razlika položaja prva dva maksimuma ( $2\theta_2-2\theta_1$ ): te se razlike u međuplošnim razmacima pripisuju se promjenama u omjeru  $I_\alpha$  i  $I_\beta$  celuloze (Czaja i sur., 2004), no u ovom radu dolazi do primjetne promjene samo u položaju prvog maksimuma, a ne oba kako je slučaj kod Czaja i sur. (2004). Veličina kristalita određena Scherrerovom formulom je od 7 do 9 nm, s iznimkom veličine određene iz srednjeg, najmanjeg maksimuma, kod kojega je i najveća pogreška određivanja zbog djelomičnog preklapanja s prvim maksimumom.

#### **4.5. Kristaliničnost bakterijske nanoceluloze**

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

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

Indeks kristaliničnosti BNC uzgojene u kokosovoj vodi prikazan je na Slici 20. Dobiveni rezultati pokazuju da kristaliničnost bakterijske nanoceluloze varira ovisno o koncentraciji dodane saharoze u podlogu.



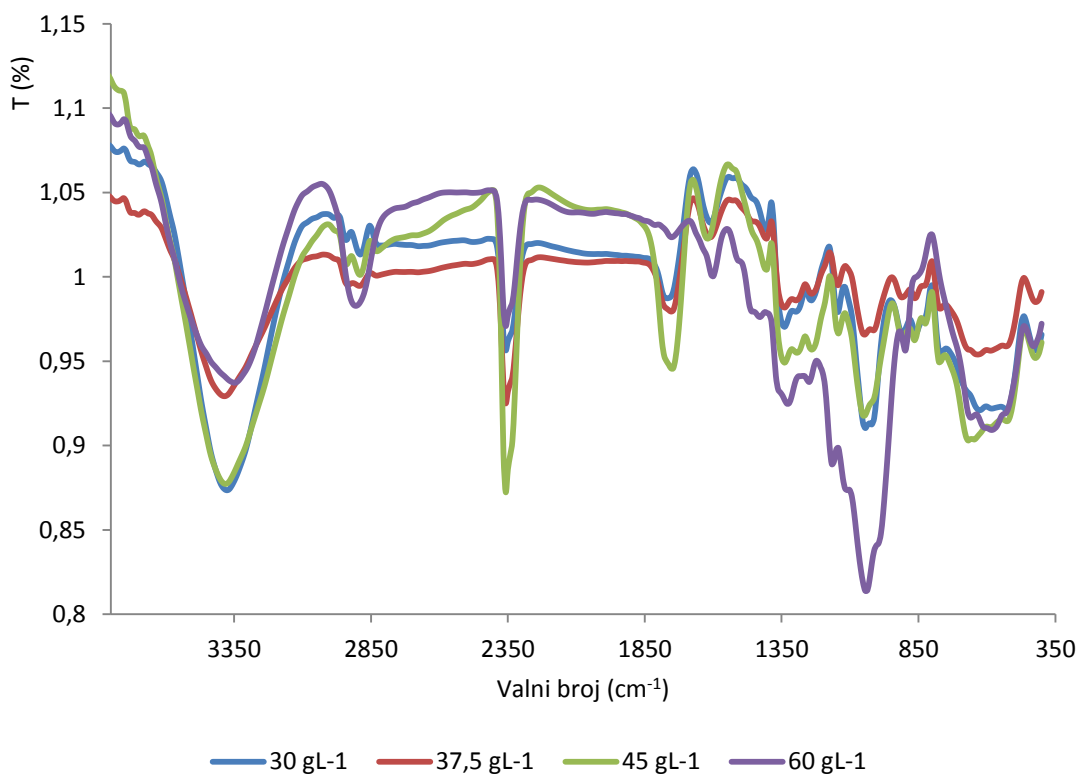
**Slika 21.** Kristaliničnost uzgojenih bakterijskih nanoceluloza u kokosovoj vodi uz dodatak različitih koncentracija saharoze

#### 4.6. FT-IR

S ciljem analize egzaktnih vrijednosti masenih udjela celuloze  $I_{\alpha}$  i  $I_{\beta}$ , napravljene su analize putem FT-IR spektroskopije. 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).

Rastezne vibracije hidroksilnih skupina alkohola pojavljuju se kao široke apsorpcijske vrpce u području  $3200$  do  $3600\text{ cm}^{-1}$ . Slobodna hidroksilna skupina registrira se kao uska vrpca kod približno  $3600\text{ cm}^{-1}$ , a obično se zamjećuje širok signal koji odražava vodikovu vezu između hidroksilnih skupina molekula alkohola. U IR-spektrima sva četiri uzorka (Slika 22), vidljiva je apsorpcijska vrpca pri  $3350\text{ cm}^{-1}$  koja se pripisuje hidroksilnoj skupini.

Intenzitet tih apsorpcijskih vrpca jak je i širok, što može ukazivati na prisutnost slobodnih hidroksilnih skupina u spojevima koji se nalaze u ispitivanim uzorcima. Alkani (zasićeni spojevi) imaju apsorpcijske vrpce između 2800 i 3000  $\text{cm}^{-1}$  jer je to područje svojstveno za rastezne frekvencije veze C–H. U sve četiri frakcije asignirane su vrpce slabog intenziteta oko 2936  $\text{cm}^{-1}$ , što se pripisuje rasteznoj frekvenciji veze C–H. Apсорpcijske vrpce u dijelu spektra od 1030 do 1100  $\text{cm}^{-1}$  odgovaraju rasteznoj frekvenciji jednostruke veze C–O. U sve tri frakcije pokazuje se srednje jaka apсорpcijska vrpca oko 1042  $\text{cm}^{-1}$ , a može se pripisati eterskoj vezi prisutnoj u ugljikohidratima. Asignirana apсорpcijska vrpca puno slabijeg intenziteta, pri 669  $\text{cm}^{-1}$  u spektrima svih ekstrakta potvrđuje prisutnost glikozidne veze.



**Slika 22.** FT-IR spektri bakterijske nanoceluloze sintetizirane fermentacijom kokosove vode kokulturom vodenih kefirnih zrnaca i *kombuche* (100, 125, 150 i 200 g/L preračunato na 30, 37,5, 45 i 60 g/L saharoze)

#### 4.7. Morfologija površine bakterijske nanoceluloze

Sinteza bakterijske nanoceluloze počinje stvaranjem vrlo tanke opne (pelikule) koja nastaje svakodnevno (Slika 23), a u konačnici se dobiva višeslojna želatinozna struktura koja se sastoji od puno slojeva tankih pelikula (Slika 24). Stanice bakterija i kvasaca imaju periodične faze sinteze pelikule za vrijeme kojih imaju ciklus sinteze, odvajanje od tekuće podloge, spajanje u jedinstvenu plohu i iniciranje stvaranja tanke površinske opne (Czaja i sur., 2004).



**Slika 23.** Prikaz tanke pelikule uzgojene bakterijske nanoceluloze u kokosovoj vodi (osobna fotografija, Antonela Kovačina)

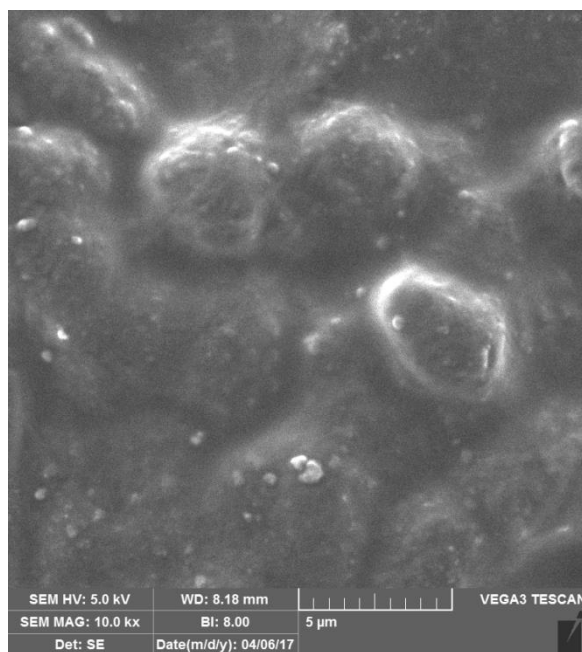


**Slika 24.** Prikaz višeslojne strukture pelikule nakon 14 dana fermentacije kokulture vodenih kefirnih zrnaca i *kombuche* u kokosovoj vodi (osobna fotografija, Antonela Kovačina)



#### 4.7.1. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)

Površina bakterijske celuloze snimana je pretražnim elektronskim mikroskopom. Na Slici 25 jasno su vidljive stanice bakterija i kvasaca na površini pelikule bakterijske celuloze.



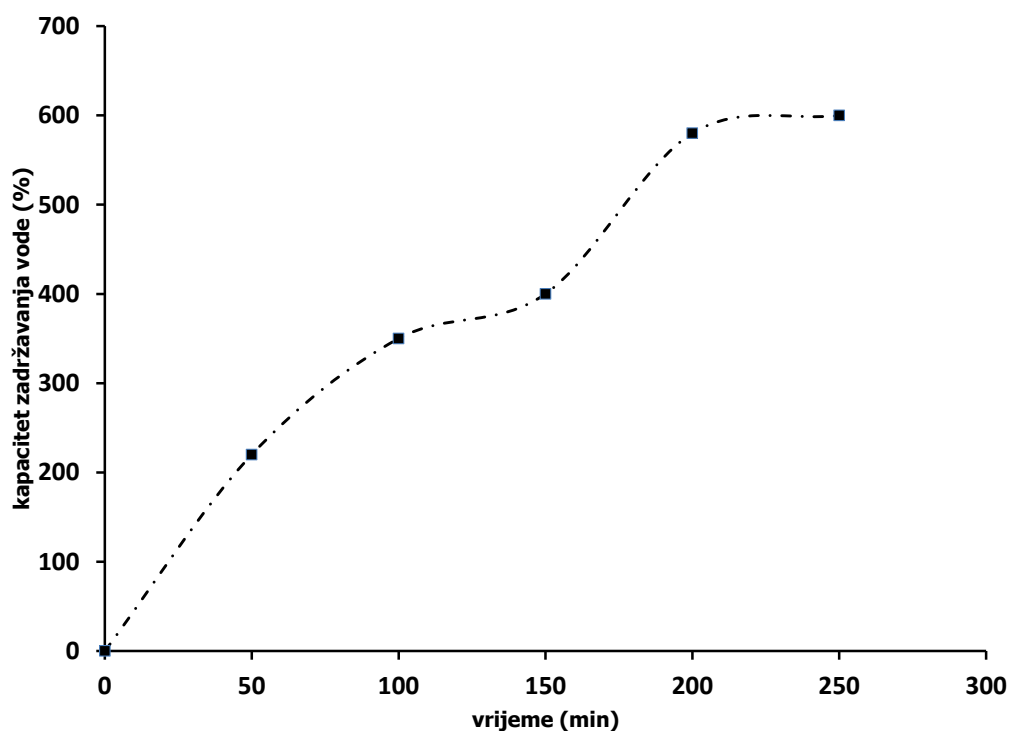
**Slika 25.** SEM snimka površine bakterijske celuloze nakon 14 dana fermentacije kokulture vodenih kefirnih zrnaca i *kombuche* u kokosovoj vodi s koncentracijom šećera 45 g/L

#### 4.8. Kapacitet zadržavanja i brzina otpuštanja vode

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

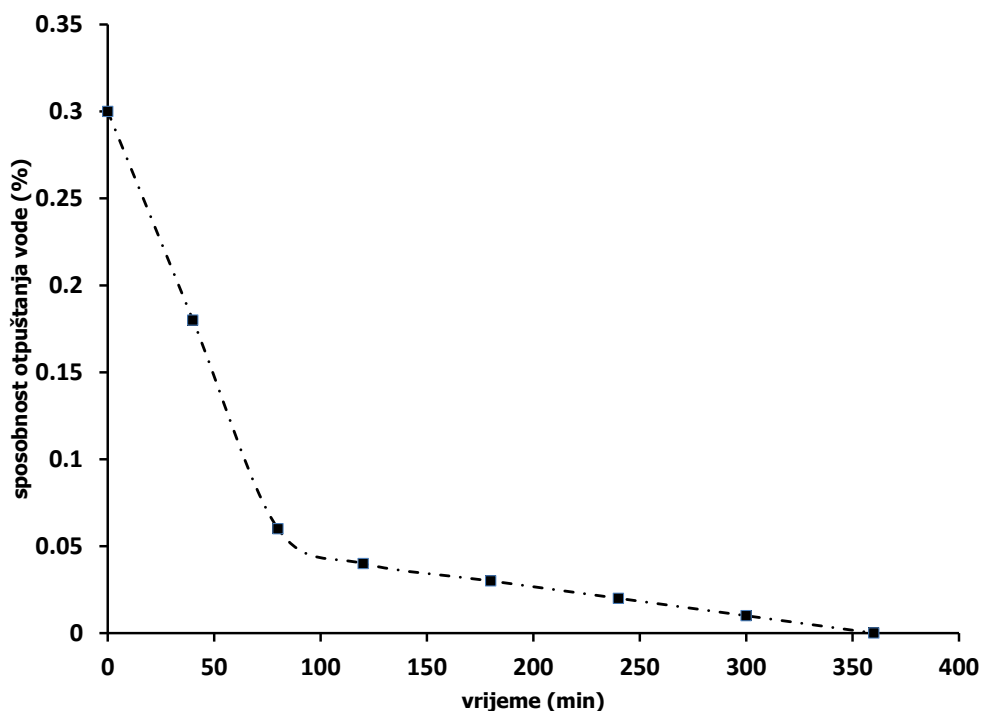
U ovom su radu provedeni testovi kojima su mjereni WHC i WHR kapaciteti sintetizirane bakterijske nanoceluloze uzgojene u kokosovoj vodi (Slike 26 i 27).

Matriks bakterijske nanoceluloze sastoji se od isprepletenih 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 BNC (Guo i Catchmark, 2012).



**Slika 26.** Kapacitet zadržavanja vode (WHC) u sintetiziranoj bakterijskoj nanocelulozi sintetiziranoj nakon 14 dana fermentacije u kokosovoj vodi (150 g/L saharoze)

Sposobnost otpuštanja vode drugo je važno svojstvo bakterijske celuloze. Na Slici 26 prikazana je sposobnost otpuštanja vode tijekom 360 minuta pokusa. Izlazak molekula vode iz matriksa bakterijske celuloze uglavnom ovisi o rasporedu mikrovlakana (Shezad i sur., 2010). Gusto pakirana mikrovlakna vrlo učinkovito vežu molekule vode zbog jačih interakcija među vodikovim vezama u strukturi celuloznog matriksa (Shah i sur., 2013). Prema literaturnim podacima, i kapacitet zadržavanja (WHC) i brzina otpuštanja vode (WRR) jako su ovisni o strukturnim značajkama BNC, posebice o veličini i ukupnom volumenu pora. Uzorci s manjim promjerima pora mogu duže zadržati vodu u matriksu, ali veći promjer pora znači da će uzorak akumulirati više vode i time povećati kapacitet zadržavanja (Ul-Islam i sur., 2012).



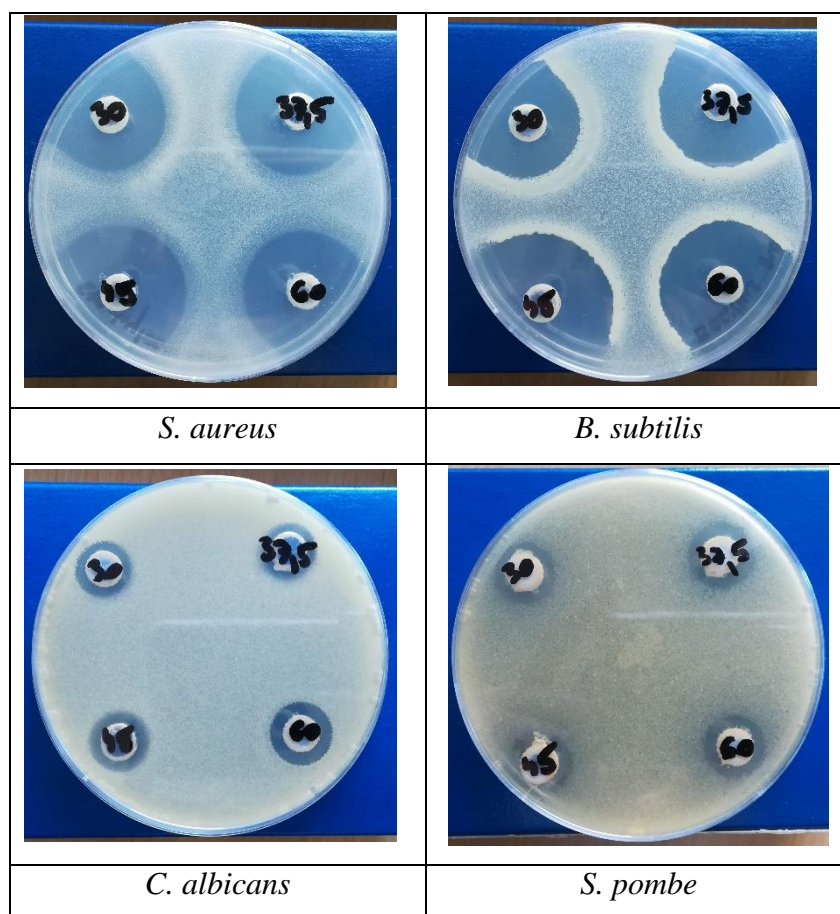
**Slika 27.** Spособnost otpuštanja vode (WRR) sintetizirane bakterijske nanoceluloze nakon 14 dana fermentacije u kokosovoj vodi (150 g/L saharoze)

#### 4.9. Antimikrobno djelovanje fermentirane kokosove vode

Zbog određivanja antimikrobne aktivnosti kokulture vodenih kefirnih zrnaca i *kombuche*, uzgajane u kokosovoj vodi s različitim koncentracijama dodanog bijelog konzumnog šećera, uzorci su testirani na hranjivim podlogama naciepljenim s bakterijama *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis* te kvascima *Candida albicans* i *Schizosaccharomyces pombe*. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 4. Može se uočiti da je dvostruko veća antimikrobna aktivnost postignuta prema bakterijama, pri svim koncentracijama bijelog konzumnog šećera dodanog u kokosovu vodu, nego prema kvascima. Najveće zone inhibicije, i kod bakterija i kod kvasaca, postignute su pri koncentraciji 150 g/L, tek malo manje pri 200 g/L, dok su pri 100 g/L postignute najmanje zona inhibicije prema rodovima kvasaca *C. albicans* i *S. pombe* (1,5 cm). Fermentirana kokosova voda s dodatkom 150 g/L saharoze pokazala se izrazito djelotvornom za inhibiciju rasta svih vrsta ispitivanih mikroorganizama.

**Tablica 4.** Antimikrobna aktivnost fermentirane kokosove vode pomoću kokulture vodenih kefirnih zrnaca i *kombuche* uz dodatak različitih koncentracija konzumnog bijelog šećera

Koncentracija saharoze (g/L)	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. pombe</i>
	Zone inhibicije (cm)			
100 (30)	2,8	3,2	1,1	1,5
125 (37,5)	3,0	3,1	1,5	1,6
150 (45)	3,3	4,0	1,6	1,6
200 (60)	3,0	3,7	1,4	1,5



**Slika 28.** Zone inhibicije ispitivanih mikroorganizama (razrjeđenje  $10^{-2}$ )

## 5. ZAKLJUČCI

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

1. Fermentirana kokosova voda je nutritivno vrijedan napitak bogat mineralima, a glavni metaboliti kokulture vodenih kefirnih zrnaca i *kombuche* su organske kiseline i mali udjel etanola te bakterijska nanoceluloza, koja se u obliku tanke opne (pelikule) svakodnevno sintetizira na površini napitka.

1. Uzgoj kokulture kefirnih zrnaca i *kombuche* proveden je u kompleksnoj podlozi s dodatkom saharoze kao jedinim izvorom ugljika.

3. U svim je uzorcima pad pH vrijednosti i koncentracije etanola bio u korelaciji s povećanjem koncentracije octene, mliječne i glukonske kiseline.

4. Sposobnost bakterijske nanoceluloze 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.

5. Difrakcijom rendgenskim zrakama i FT-IR spektroskopskom analizom je dokazana pretežito kristalinična struktura bakterijske celuloze uzgojene u kokosovoj vodi pri svim koncentracijama dodane saharoze.

6. Antimikrobna aktivnost ispitivana je mjerenjem zona inhibicije rasta bakterija *S. aureus* i *B. subtilis* te kvasaca *C. albicans* i *S. pombe*. Fermentirani napitak od kokosove vode pokazao je izvrsnu antimikrobnu aktivnost prema dvije bakterijske kulture i nešto slabiju prema kvascima.

## 6. LITERATURA

Ayed, L., Hamdi, M. (2015) Manufacture of a beverage from cactus pear juice using tea fungus fermentation. *Ann. Microbiol.* **65**, 2293-2299.

Balentine, D. A., Wiseman, S. A., Bouwens, L. C. (1997) The chemistry of tea flavonoids. *Crit. Rev. Food. Sci.* **37**, 693-704.

Ballongue, J. (1993) Bifidobacteria and probiotic action. U: *Lactic acid bacteria* (Salminen, S. i Wright, A., ured.), Marcel Dekker, Inc., New York, str. 357-428.

Barnett, J. A., Entian, K.-D. (2005) A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism. *Yeast* **22**, 835-894.

Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. (2001) Kohlenhydrate. U: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 5. izd. Springer-Verlag GmbH, Heidelberg, str. 236-329.

Bergey, H., Holt, J. (1994) Group I the Spirochetes. U: *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9. izd. (Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A. i sur., ured.), Williams & Wilkins, Baltimore, str. 27-38.

Blanc, P. J. (1996) Characterization of the tea fungus metabolites. *Biotechnol. Lett.* **18**, 139-142.

Brown, R. M., Saxena, I. M. (2000) Cellulose biosynthesis: a model for understanding the assembly of biopolymers. *Plant. Physiol. Biochem.* **38**, 57-67.

Cardinal, E. V., Hedrick, L. R. (1947) Microbiological assay of corn steep liquor for amino acid content. *J. Biochem.* **172**, 609-612.

Cheirsilp, B., Shimizu, H., Shioya, S. (2003) Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefirifaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* **100**, 43-53.

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

Collado, M. C., Hernandez, M., Sanz, Y. (2005) Production of bacteriocin-like inhibitory compounds by human fecal Bifidobacterium strains. *J. Food Prot.* **68**, 1034-1040.

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

Czaja, W. K., Young, D. J., Kawecki, M., 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.

De Ley, J., Gillis, M., Swings, J. (1984) Acetobacteraceae. U: *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Garrity, G., Boone, D. R., Castenholz, R. W., ured.), Williams & Wilkins, Baltimore, str. 267-278.

De Vuyst, L., Degeest, B. (1999) Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**, 153-177.

Dickinson, J. R., Kruckeberg, A. L. (2006) Carbohydrate metabolism. U: *Yeasts in food and beverages* (Querol, A., Fleet, G. H., ured.), Springer-Verlag, Berlin, str. 215-242.

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

Dobson, A., O'Sullivan, O., Cotter, P. D., Ross, P., Hill, C. (2011) High-throughput sequence-based analysis of the bacterial composition of kefir and an associated kefir grain. *FEMS Microbiol. Lett.* **320**, 56-62.

Doenecke, D., Koolman, J., Fuchs, G., Gerok, W. (2005) *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*, 15. izd., Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

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

El-Siddig Ahmed, S. (2003) *Biochemical and microbial changes during fermentation of tea fungus (kombucha)*. Doctoral dissertation, University of Khartoum, Khartoum.

Embuscado, M. E., Marks, J. S., Bemiller, J. N. (1994) Bacterial cellulose I. Factors affecting the production of cellulose by *Gluconacetobacter xylinus*. *Food Hydrocoll.* **8**, 407-418.

Farnworth, E. (2005) Kefir – a complex probiotic. *Food Sci. Technol.* **2**, 1-17.

Feldmann, H. (2005) Yeast metabolism. U: *Yeast molecular biology* (Feldmann, H., ured.), Adolf-Butenandt-Institut, München, str. 25-58.

Frank, G. W. (1991) *Kombucha: healthy beverage and natural remedy from the far east*. Wilhelm Ennstahaller, Austria.

Franzetti, L., Galli, A., Pagani, M. A., De Noni, L. (1998) Microbiological and chemical investigations on “Sugar Kefir” drink. *Ann. Microbiol. Enzimol.* **48**, 67-80.

Gama, M., Gatenholm, P., Klemm, D. (2013) *Bacterial nanocellulose: a sophisticated multifunctional material*. CRC Press, Boca Raton.

Görtz, H. D. (1988) *Formen des Zusammenlebens*. Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt.

Goyal, R. K. (1999) Biochemistry of fermentation. U: *Biotechnology: Food fermentation Volume 1*, Educational Publishers & Distributors, New Delhi.



Greenwalt, C. J., Ledford, R. A. L., Steinkraus, K. H. (1998) Determination and characterization of the anti-microbial activity of the fermented tea Kombucha. *Lebensm.-Wiss. Technol.* **31**, 291-296.

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.

Gromet, Z., Schramm, M., Hestrin, S. (1957) Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 4. Enzyme systems present in a crude extract of glucose-grown cells. *Biochem. J.* **67**, 679-689.

Gulitz, A., Stadie, J., Wenning, M., Ehrmann, M. A., Vogel, R. F. (2011) The microbial diversity of water kefir. *Int. J. Food Microbiol.* **151**, 284-288.

Gulitz, A., Stadie, J., Ehrmann, M. A., Ludwig, W., Vogel, R. F. (2013) Comparative phylobiomic analysis of the bacterial community of water kefir by 16S rRNA gene amplicon sequencing and ARDRA analysis. *J. Appl. Microbiol.* **114**, 1082-1091.

Gullo, M., Giudici, P. (2008) Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: Phenotypic traits relevant for starter cultures selection. *Int. J. Food Microbiol.* **125**, 46-53.

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.

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

Handy, J. (2006) Lactate – The bad boy of metabolism, or simply misunderstood? *Curr. Anaesth. Crit. Care* **17**, 71-76.

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

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.

Jakob, F., Steger, S., Vogel, R. F. (2012) Influence of novel fructans produced by selected acetic acid bacteria on the volume and texture of wheat breads. *Eur. Food Res. Technol.* **234**, 493-499.

Jakob, F., Pfaff, A., Novoa-Carballal, R., Rüksam, H., Becker, T., Vogel, R. F. (2013) Structural analysis of fructans produced by acetic acid bacteria reveals a relation to hydrocolloid function. *Carbohydr. Polym.* **92**, 1234-1242.

Jay, J. M. (1992) Fermented foods and related products of fermentation. U: *Modern Food Microbiology*, 4. izd. (Jay, J. M., ured.), Van Nostrand Reinhold, New York, str. 371-409.

Jayabalan, R., Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., Sathishkumar, M. (2014) A review on Kombucha tea - microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safe.* **13**, 539-550.

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.

Jolly, L., Vincent, S. F., Duboc, P., Neeser, J.-R. (2002) Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **82**, 367-374.

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

Kaditzky, S. B. (2008) *Sucrose metabolism in lactobacilli and bifidobacteria*. Technische Universität München, München.

Kebler, L. (1921) California bees. *J. Am. Pharm. Assoc.* **10**, 939-943.

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

Korakli, M, Gänzle, M. G., Vogel, R. F. (2002) Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *J. Appl. Microbiol.* **92**, 958-65.

Kornmann, H., Duboc, P., Marison, I., von Stockar, U. (2003) Influence of nutritional factors on the nature, yield, and composition of exopolysaccharides produced by *Gluconacetobacter xylinus* I-2281. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 6091-6098.

Krämer, J. (2007) *Lebensmittel-Mikrobiologie*, 5. izd., Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.

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

Krystynowicz, A., Koziolkiewicz, M., Wiktorowska-Jezierska, A., Bielecki, S., Klemenska, E., Masny, A., Płucienniczak, A. (2005) Molecular basis of cellulose biosynthesis disappearance in submerged culture of *Gluconacetobacter xylinus*. *Acta Biochim. Pol.* **52**, 691-698.

Kurtzman, C. P. (2003) Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorulaspora*. *FEMS Yeast Res.* **4**, 233-245.

Kurtzman, C. P., Robnett, C. J., Basehoar-Powers, E. (2001) *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, a new ascosporogeneous yeast from „Kombucha tea“. *FEMS Yeast Res.* **2**, 133-138.

La Rivière, J. W. M., Kooiman, P. (1967) Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. *Arch. Microbiol.* **59**, 269-278.

Leroi, F., Pidoux, M. (1993a) Detection of interactions between yeasts and lactic acid bacteria isolated from sugary kefir grains. *J. Appl. Microbiol.* **74**, 48-53.

Leroi, F., Pidoux, M. (1993b) Characterization of interactions between *Lactobacillus hilgardii* and *Saccharomyces florentinus* isolated from sugary kefir grains. *J. Appl. Microbiol.* **74**, 54-60.

Liu, C. H., Hsu, W. H., Lee, F. L., Liao, C. C. (1996) The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation. *Food Microbiol.* **13**, 407-415.

Lončar, E. S., Petrovič, S. E., Malbaša, R. V., Verac, R. M. (2000) Biosynthesis of glucuronic acid by means of tea fungus. *Mol. Nutr. Food Res.* **44**, 138-139.

Lopitz-Otsoa, F., Rementeria, A., Elguezabal, N., Garaizar, J. (2006) Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Rev. Iberoam. Micol.* **23**, 67-74.

Lutz, M. L. (1899) Recherches biologiques sur la constitution du Tibi. *Bull. Soc. Mycol. Fr.* **15**, 68-72.

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.

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

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.

- Mayser, P., Gromme, S., Leitzmann, C., Gründer, K. (1995) The yeast spectrum of the 'tea fungus Kombucha'. *Mycoses* **38**, 289-295.
- Mohite, B. V., Patil, S. V. (2014) A novel biomaterial: Bacterial cellulose and its new era applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **61**, 101-110.
- Moniri, M., Boroumand Moghaddam, A., Azizi, S., Abdul Rahim, R., Bin Ariff, A., Zuhainis Saad, W., Navaderi, M., Mohamad, R. (2017) Production and status of bacterial cellulose in biomedical engineering. *Nanomaterials* **7**, 257.
- Morgan, J. L. W., Strumillo, J., Zimmer, J. (2013) Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature* **493**, 181-186.
- Movasaghi, Z., Rehman, S., ur Rehman, I. (2008) Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Appl. Spectrosc. Rev.* **43**, 134-179.
- Naritomi, T., Kouda, T., Yano, H., Yoshinaga, F. (1998) Effect of ethanol on bacterial cellulose production in continuous culture from fructose. *J. Ferment. Bioeng.* **85**, 598-603.
- 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.
- Neve, H., Heller, K. J. (2002). The microflora of water kefir: a glance by scanning electron microscopy. *Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber.* **54**, 337-349.
- Noro, N., Sugano, Y., Shoda, M. (2004) Utilization of the buffering capacity of corn steep liquor in bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 199-205.
- 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.

Pidoux, M. (1989) The microbial flora of sugary kefir grain (the gingerbeer plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. *MIRCEN J.* **5**, 223-238.

Pidoux, M., Brillouet, J., Quemener, B. (1988) Characterization of the polysaccharides from a *Lactobacillus brevis* and from sugary kefir grains. *Biotechnol. Lett.* **10**, 415-420.

Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. F., Van Sinderen, D. (2011) Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes Nutr.* **6**, 285-306.

Rastall, R. A., Gibson, G. R., Gill, H. S., Guarner, F., Klaenhammer, T. R., Pot, B., Reid, G., i sur. (2005) Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: an overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiol. Ecol.* **52**, 145-152.

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

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

Ross, P., Mayer, R., Weinhouse, H., Amikam, D., Huggirat, Y., Benziman, Y. (1990) The cyclic diguanylic acid regulatory system of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinus*. *J. Biol. Chem.* **265**, 18933-18943.

Russel, R. R. B. (2009) Bacterial polysaccharides in dental plaque. U: *Bacterial Polysaccharides* (Ullrich, M., ured.), Caister Academic Press, Norfolk, str. 143-153.

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.

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.

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.

Simpson, P. J., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. (2004) *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 401-406.

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.

Stadelmann, E. (1961) Der Teepilz und Seine Antibiotische Wirkung. *Zentbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektkrankh. Hyg. Parasit. Inf. Hyg.* **180**, 401-435.

Stadie, J. (2013) *Metabolic activity and symbiotic interaction of bacteria and yeasts in water kefir*. Doctoral dissertation, Technische Universität München, München.

Steinkraus, K. H., Shapiro, K. B., Hotchkiss, J. H, Mortlock, R. P. (1996) Investigations into the antibiotic activity of the tea fungus/Kombucha beverage. *Biotechnol. Acta* **16**, 199-205.

Stolz, P, Böcker, G., Hammes, W. P., Vogel, R. F. (1995) Utilization of electron acceptors by lactobacilli isolated from sourdough. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **201**, 91-96.

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

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.

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.

Verschuren, P. G., Cardona, T. D., Nout, M. J., De Gooijer, K. D., Van den Heuvel, J. C. (2000) Location and limitation of cellulose production by *Acetobacter xylinum* established from oxygen profiles. *J. Biosci. Bioeng.* **89**, 414-419.

Vijayaraghavan, R., Singh, M., Rao, P. V. L., Bhattacharya, R., Kumar, P., Sugendran, K., Kumar, O., Pant, S. C., Singh, R. (2000) Subacute (90 days) oral toxicity studies of Kombucha Tea. *Biomed. Environ. Sci.* **13**, 293-299.

Vīna, I., Semjonovs, P., Linde, R., Patetko, A. (2013) Glucuronic acid containing fermented functional beverages produced by natural yeasts and bacteria associations. *Int. J. Res. Rev. Appl. Sci.* **14**, 17-25.

Waldherr, Florian W, Doll, V. M., Meißner, D., Vogel, R. F. (2010) Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. *Food Microbiol.* **27**, 672-678.

Ward, M. (1892) The ginger-beer plant, and the organisms composing it: a contribution to the study of fermentation yeasts and bacteria. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.* **183**, 125-197.

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

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

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.



## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Antanela Kavčina

Ime i prezime studentice