

# Biosinteza i karakterizacija bakterijske nanoceluloze uzgojene u statičnim uvjetima u soku od borovnica

---

**Nemec, Vili**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*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:159:611042>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-24**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2020. godine

Vili Nemeč

1330/MB

**BIOSINTEZA I  
KARAKTERIZACIJA  
BAKTERIJSKE NANOCELULOZE  
UZGOJENE U STATIČNIM  
UVJETIMA U SOKU OD  
BOROVNICA**

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

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Beluhan na povjerenju, savjetima, te velikoj pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada, kako laboratorijskog tako i pisanog dijela. Također zahvaljujem svojim roditeljima, bratu te prijateljima na podršci i razumijevanju prilikom studiranja.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

### BIOSINTEZA I KARAKTERIZACIJA BAKTERIJSKE NANOCELULOZE UZGOJENE U STATIČNIM UVJETIMA U SOKU OD BOROVNICA

Vili Nemeč, 1330/MB

**Sažetak:** Bakterijska nanoceluloza (BNC) je održivi prirodni egzopolisaharid, kojeg karakteriziraju izvrsna svojstva, kao što su hidrofilnost, biorazgradivost, velika sposobnost kemijske modifikacije, te sposobnost oblikovanja različitih polukristaliničnih morfologija. Tijekom 21 dana fermentacije kombuche u soku od borovnica u aerobnim uvjetima, uz dodatak 40 do 120 g/L saharoze, praćene su promjene pH vrijednosti, kinetika nastajanja organskih kiselina (octene, glukonske, mliječne i glukuronske), etanola i prinosa sintetizirane BNC. Smanjenje pH vrijednosti posljedica je simbiotičko-metaboličkih aktivnosti osmofilnih kvasaca i bakterija octene kiseline i nastajanja organskih kiselina. Debljina i prinos BNC se povećavala tijekom fermentacije. Uzorci su analizirani FT-IR spektroskopijom te je utvrđeno da su svi imali visoki postotak kristaliničnosti. Uočena je antimikrobna aktivnost BNC prema bakterijama *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, i *Pseudomonas aeruginosa* i kvascu *Candida albicans*, ali ne i prema bakterijama *Vibrio cholerae* i *Staphylococcus aureus*.

**Ključne riječi:** kombucha, organske kiseline, bakterijska nanoceluloza (BNC), karakterizacija, antimikrobna aktivnost

**Rad sadrži:** 66 stranica, 23 slike, 1 tablicu, 137 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

#### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

**Datum obrane:** 29. rujna 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

### BIOSYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF BACTERIAL NANOCELLULOSE FROM STATIC CULTIVATION IN BLUEBERRY JUICE

*Vili Nemec, 1330/MB*

**Abstract:** *Bacterial nanocellulose (BNC) is a sustainable natural egzopolysaccharide characterized by excellent properties such as hydrophilicity, biodegradability, broad chemical-modifying capacity, and the formation of different semicrystalline fiber morfologies. Changes in pH value, the formation of organic acids (acetic, gluconic, lactic, and glucuronic), ethanol and synthesized BNC yield were observed over a period up to 21 days of fermentation in sucrose-sweetened blueberry juice (40 to 120 g/L). Altering in pH was due to the symbiotic metabolic activity of osmophilic yeast and acetic acid bacteria and declined with the formation of organic acids. The BNC thickness and yield increased with fermentation time. Analyzing samples by FT-IR spectroscopy, it was detected that all samples had a higher percentage of crystallinity. Antimicrobial activity was observed against bacteria Salmonella typhimurium, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, and yeast Candida albicans, but not against the bacteria Vibrio cholerae and Staphylococcus aureus.*

**Keywords:** *Kombucha, Organic acids, Bacterial nanocellulose (BNC), Characterization, Antimicrobial activity*

**Thesis contains:** 66 pages, 23 figures, 1 table, 137 references

**Original in:** Croatian

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

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

**Reviewers:**

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

**Thesis defended:** 29 September 2020

# Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>3</b>
2.1. <i>Kombucha</i> : PRIPRAVA I FERMENTACIJA.....	3
2.2. MIKROBIOLOŠKI SASTAV <i>kombuche</i> .....	4
2.3. ZDRAVSTVENI UČINCI <i>kombuche</i> .....	5
2.3.1. Antimikrobna aktivnost .....	6
2.3.2. Probiotičko djelovanje.....	7
2.3.3. Antikancerogena svojstva.....	8
2.3.4. Detoksikacija .....	9
2.3.5. Antioksidacijska aktivnost.....	9
2.4. BAKTERIJSKA NANOCELULOZA (BNC).....	11
2.4.1. Sinteza i struktura BNC .....	12
2.4.2. Sinteza BNC .....	14
2.5. BAKTERIJE OCTENE KISELINE I GLAVNE POTEŠKOĆE U PROCESU PROIZVODNJE BNC... ..	17
2.6. UZAJAMNO DJELOVANJE IZMEĐU SVOJSTAVA I NATIVNE STRUKTURE BNC.....	18
2.7. MEHANIZAM AKTIVNOSTI CELULOZA SINTAZE.....	21
2.8. INDUSTRIJSKA PROIZVODNJA BNC .....	22
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>25</b>
3.1. TIJEK ISTRAŽIVANJA .....	25
3.2. MATERIJALI I METODE RADA .....	26
3.2.1. Priprava kulture <i>kombuche</i> .....	26
3.2.2. Vrsta hranjive podloge.....	26
3.2.3. Fermentacija i biosinteza BNC.....	26
3.2.4. Određivanje pH vrijednosti.....	26
3.2.5. Određivanje koncentracije octene kiseline .....	27
3.2.6. Određivanje koncentracije glukonske kiseline .....	27
3.2.7. Određivanje koncentracije mliječne kiseline .....	27
3.2.8. Određivanje koncentracije glukuronske kiseline .....	28
3.2.9. Određivanje etanola kemijskom metodom .....	28



3.2.10. Izračunavanje debljine, mase i prinosa nanocelulozne biomase <i>kombuche</i> .....	29
3.2.11. Određivanje kapaciteta zadržavanja vode ( <i>eng.</i> Water-Holding Capacity; WHC) .....	29
3.2.12. Određivanje brzine otpuštanja vode ( <i>eng.</i> Water-Release Rate; WRR) .....	30
3.2.13. FT-IR spektroskopija .....	30
3.2.14. Pretražna elektronska mikroskopija ( <i>eng.</i> Scanning Electron Microscopy; SEM) .....	30
3.2.15. Određivanje kristaliničnosti bakterijske celuloze (jodni broj) .....	30
3.2.16. Određivanje antimikrobne aktivnosti <i>kombucha</i> soka od borovnice .....	31
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>32</b>
4.1. pH VRIJEDNOST, ORGANSKE KISELINE I ETANOL .....	33
4.1.1. pH vrijednost .....	33
4.1.2. Organske kiseline .....	35
4.1.2.1. <i>Octena kiselina</i> .....	35
4.1.2.2. <i>Glukonska kiselina</i> .....	36
4.1.2.3. <i>Mliječna kiselina</i> .....	37
4.1.2.4. <i>Glukuronska kiselina</i> .....	38
4.1.3. Koncentracija etanola .....	40
4.2. BIOSINTEZA I PRINOS BAKTERIJSKE NANOCELULOZE (BNC) .....	41
4.3. KAPACITET ZADRŽAVANJA I KINETIKA OTPUŠTANJA VODE ( <i>ENG.</i> WHC I WRR) .....	43
4.4. KRISTALINIČNOST I MORFOLOGIJA POVRŠINE BAKTERIJSKE NANOCELULOZE (BNC)....	45
4.4.1. Kristaliničnost BNC .....	46
4.4.2. FT-IR spektroskopska analiza .....	47
4.4.3. Pretražna elektronska mikroskopija ( <i>eng.</i> SEM) .....	48
4.5. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST FERMENTIRANOG <i>KOMBUCHA</i> SOKA OD BOROVNICA.....	49
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>51</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>52</b>

# 1. UVOD

*Kombucha* je nutritivno vrijedni napitak dobiven biotransformacijom saharozom zaslađenog čaja ili soka sa simbiotičkim, odnosno združenim kulturama bakterija octene kiseline i raznih vrsta osmofilnih kvasaca koji, tijekom 10-14 dana fermentacije, sintetiziraju „čajnu gljivu“, odnosno nanoceluloznu pelikulu (opnu) na površini kiselkaste tekućine (Chen i Liu, 2000). Tijekom fermentacije, bakterije i kvasci metaboliziraju saharozu ili neki drugi izvor ugljika do različitih organskih kiselina, uglavnom octene i glukonske u većim koncentracijama, te glukuronske, mliječne i limunske, čije koncentracije ne prelaze  $1 \text{ g L}^{-1}$  (Jayabalan i sur., 2007). Kvaščeve stanice hidroliziraju saharozu do glukoze i fruktoze pomoću enzima invertaze i proizvode etanol putem glikolize, a bakterije octene kiseline koriste glukozu za proizvodnju glukonske kiseline i etanol za proizvodnju octene kiseline.

Usporedno s proizvodnjom organskih kiselina i etanola, na površini tekuće faze se stvaraju tanke celulozne pelikule (opne), odnosno bakterijska nanoceluloza (BNC) koja, ovisno o dužini fermentacije sve više dobiva na volumenu. BNC je ekstracelularni polisaharid, koji se može sintetizirati u statičnim uvjetima, submerzno i u trešenim kulturama. BNC mogu proizvesti razne bakterijske vrste, uključujući vrste *Rhizobium leguminosarum*, *Burkholderia* spp., *Pseudomonas putida*, *Dickeya dadantii*, *Erwinia chrysanthemi*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli* i *Salmonella enterica* (Jahn i sur., 2011; Chawla i sur., 2009). Unutar porodice *Acetobacteriaceae*, različiti rodovi su proizvođači BNC, poput *Gluconacetobacter*, *Acetobacter* i *Komagataeibacter* (Valera i sur., 2014; Gullo i sur., 2012). Vrsta *Gluconoacetobacter xylinus* se smatra modelnim mikroorganizmom u proizvodnji BNC zbog svojeg svojstva da asimilira različite šećere kao izvore ugljika i sintetizira velike količine BNC uzgojem u tekućim hranjivim podlogama.

Celuloza je jedan od najzastupljenijih biopolimera na Zemlji, a sastavni je dio trava, viših biljaka i drveća, no često je i bakterijskog porijekla. Bakterijska nanoceluloza (BNC), za razliku od biljne celuloze, izrazito je visoke molekularne čistoće i zbog toga je privukla zanimanje mnogih istraživača i industrijskih sektora. Općenito, sastoji se od nasumično sastavljenih, <100 nm širokih vlaknastih vrpca, sastavljenih od nanofibrila širine 7–8 nm, združenih u snopove. Posjeduju posebna kemijsko-fizikalna svojstva, poput fleksibilnosti, velike sposobnost zadržavanja i otpuštanja vode, hidrofilnosti, kristaliničnosti, oblikovanja u različite oblike i biomimetičke trodimenzionalne (3D) umrežene strukture (Gorgieva i Trček, 2019).

BNC je ultratanki tip celuloze s trodimenzijskom nanofibrilarnom strukturom i ekskluzivnom kombinacijom svojstava kao što su visoka kristaliničnost (84 %-89 %) i stupanj polimerizacije, velika površina vlakana promjera 20–100 nm, izrazita fleksibilnost i vlačna čvrstoća (Youngov modul od 15-18 GPa), visok kapacitet zadržavanja vode (oko 99 %). Zbog visoke čistoće, odnosno odsutnosti lignina, pektina i hemiceluloze, BNC se smatra ne-citotoksičnim, ne-genotoksičnim i visoko biokompatibilnim hidrogelom koji privlači zanimanje za različita područja primjene (Chawla i sur., 2009). Zbog navedenih svojstava ima širok raspon primjena u biomedicini i prehrani (Dufresne i Farnworth, 2000). U području biomedicine, BNC se zbog velike mehaničke čvrstoće u vlažnom obliku, permeabilnosti za tekućine i plinove, primjenjuje kao umjetna koža, za izradu umjetnih krvnih žila i kao nosač u tkivnom inženjerstvu (Keshk, 2014). U prehrambenoj se industriji BNC koristi u proizvodnji hrane, dijetalnih vlakna, te kao sredstvo za zgušnjavanje i stabilizaciju gotovih proizvoda (Okiyama i sur., 1993).

Cilj ovog rada bio je istražiti biokemijske promjene koje se zbivaju tijekom biotransformacije simbiotički združene kulture bakterija octene kiseline i osmofilnih kvasaca (*kombucha*) tijekom 21 dana uzgoja u kompleksnoj podlozi (sok od borovnica) s različitim koncentracijama saharoze. Tijekom fermentacija praćeni su i određivani sljedeći parametri:

- promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije,
- kinetika nastajanja etanola i organskih kiselina (octene, glukonske, mliječne i glukuronske),
- kinetika sinteze i prinos BNC u kompleksnoj podlozi (sok od borovnice),
- kristaliničnost i morfološka struktura bakterijske celuloze,
- utjecaj specifične površine bakterijske celuloze na kapacitet zadržavanja i brzinu otpuštanja vode,
- antimikrobna aktivnost *kombucha* napitka od soka borovnica.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. *Kombucha*: PRIPRAVA I FERMENTACIJA

*Kombucha* je tradicionalni napitak pripravljen od crnog ili zelenog čaja koji se konzumira diljem svijeta, a posebice u Aziji. Smatra se da najstarija primjena datira iz 220. godine prije Krista kada je dr. Kombu ovim napitkom liječio japanskog Cara (Srihari i Satyanarayana, 2012; Greenwalt i sur., 2000). Čaj od *kombuche* je poznat pod različitim imenima poput: Champignon de longue vie, Ling zhi, Kocha kinoko, Chainii grib, i Chainii kvass (Malbaša i sur., 2011). Tradicionalno se priprema fermentacijom zašćerenog crnog čaja sa simbiotskom kulturom kvasaca i bakterija. U mnogim državama ovaj napitak se proizvodi u velikom mjerilu za komercijalnu, ali i za kućnu uporabu. Unatoč tome što je to fermentirani napitak, aroma čaja od *kombuche* se smatra zadovoljavajućom, blago kiselom s niskim udjelom alkohola, okusom sličnim jabukovači (Marsh i sur., 2014). Produženjem tijeka fermentacije, koja obično traje od 6 do 14 dana, okus čaja od *kombuche* se mijenja od ugodno voćnog, do lake i pjenušave arome s blagim okusom na vinski ocat, zadovoljavajući time prihvatljivost arome i ostalih senzorskih svojstava pića potrošača (Marsh i sur., 2014; Goh i sur., 2012). Poznato je da se mikrobni sastav kulture čaja od *kombuche* razlikuje od jedne kulture do druge ovisno o čimbenicima poput geografskog mjesta, klime, lokalne vrste bakterija i kvasaca te izvora inokuluma (Jayabalan i sur., 2014). U nekim istraživanjima je dokazano da uporaba različitih starter kultura *kombuche* može rezultirati različitom antioksidacijskom aktivnosti iako je korišten isti supstrat za fermentaciju (Malbaša i sur., 2011; Chu i Chen, 2006). Kod tradicionalne, kućne pripreme, starter kultura se dodaje u infuziju zašćerenog crnog čaja, a fermentacija traje od 6 do 14 dana pri sobnoj temperaturi (Jayabalan i sur., 2014). Količina i vrsta čaja ili bilo kojeg soka korištenog za proces fermentacije i metoda pripremanja se razlikuju ovisno o osobnim sklonostima. Aroma i koncentracija spojeva pronađenih u ovom napitku se razlikuje ovisno o mikrobiološkom sastavu i masi dodane starter kulture, vrsti i sastavu hranjive podloge, kao i vrsti i koncentraciji dodanog šećera (Jayabalan i sur., 2014). Iako se tradicionalno koriste crni ili zeleni čaj kao kompleksna hranjiva podloga, uobičajeno je dostupna i *kombucha* pripremljena s različitim sokovima, melasom, te ostacima voća i povrća (Velićanski i sur., 2007; Greenwalt i sur., 1998). U nekim rijetkim slučajevima ovo piće je bilo pripremljeno s čajem od limuna, šljiva, jasmina i pepermintu (Jayabalan i sur., 2014; Velićanski i sur., 2013, 2007). Starter kultura koja se prvotno dodaje u čaj se zove “majčinska kultura”, a prilikom fermentacije se razvija nova

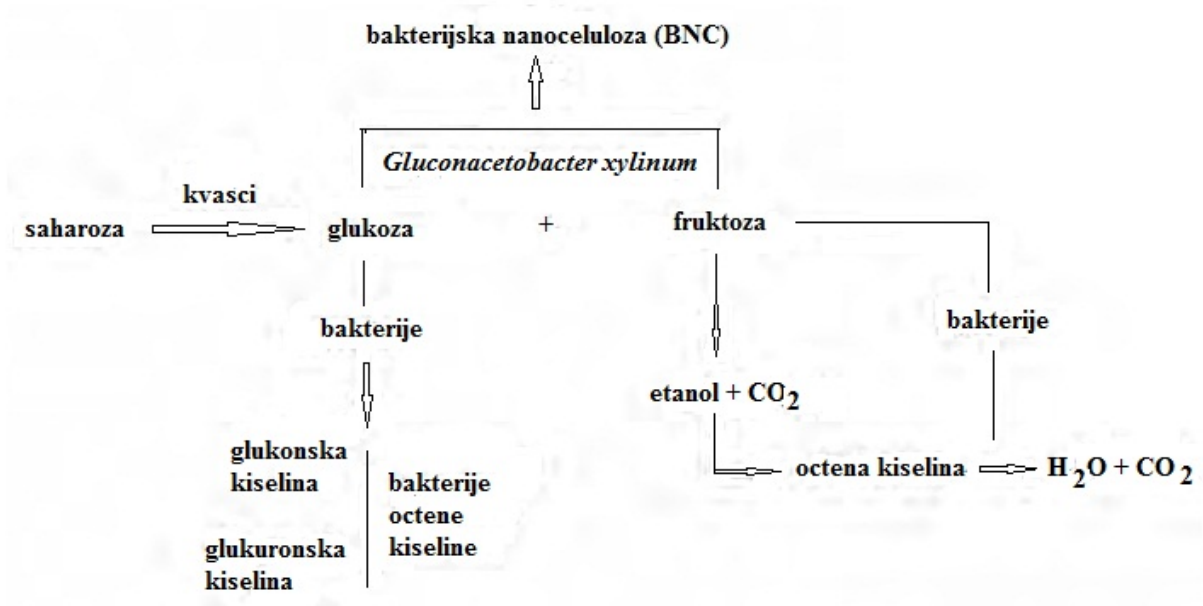
pelikula (opna) koja će na kraju fermentacija poslužiti kao inokulum za novi uzgoj. Celulozne pelikule se skupljaju na površini čaja kao novi sloj iznad stare *kombuchine* kulture. Na početku fermentacije, mali dio prethodno pripremljene *kombuche* dodaje se novoj hranjivoj podlozi kako bi se smanjio početni pH i time zaustavio rast neželjenih mikroorganizama (Dufresne i Farnworth, 2000).

## 2.2. MIKROBIOLOŠKI SASTAV *kombuche*

Kvasci i bakterije uključeni u ovu mikrobnu fermentaciju tvore pelikulu (opnu) svakodnevno tijekom fermentacije. Kvašćev dio ove kulture se obično sastoji od osmofilnih vrsta kvasaca, dok bakterijski dio uključuje najvećim dijelom bakterije octene kiseline. U mnogim je istraživanjima otkriveno da su dominantne vrste bakterija octene kiseline *Acetobacter xylinum*, *A. xylinoides*, *A. aceti*, *A. pausterianus* i *Bacterium gluconicum*. Porodica *Acetobacteriaceae* se sastoji od grupe striktnih aeroba, gram-negativnih bakterija octene kiseline koje oksidiraju različite ugljikohidrate, alkohole i šećerne alkohole do octene kiseline i druge organske kiseline (glukonske, mravlje, limunske, okso-kiselina i ketona), čak i do aminokiselina. Od različitih rodova ove porodice, rodovi *Acetobacter* i *Gluconacetobacter* su najbolji proizvođači octene kiseline zbog svoje visoke tolerancije na kiseli i alkoholni okoliš, čime smanjuju mogućnost kontaminacije drugim mikroorganizmima. Bakterijske vrste iz roda *Acetobacter* posjeduju visoku sposobnost proizvodnje octene kiseline iz etanola, dok bakterije iz roda *Komagataeibacter* oksidiraju šećere bolje nego etanol. Ovi rodovi bakterija octene kiseline imaju diauksičnu krivulju rasta kada se uzgoj vodi u podlozi koja sadrži etanol, pri čemu je prva faza karakterizirana oksidacijom etanola do octene kiseline, a u drugoj fazi (naknadna oksidacija) je octena kiselina oksidirana do vode i CO<sub>2</sub>, potrebnih za daljnji rast i razmnožavanje bakterija (Dourado i sur., 2017).

Dokazano je da su dominantni kvasci u kulturi *kombuche* iz rodova i vrsta *Kloeckera* spp., *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces ludwigii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora* spp., *Zygosaccharomyces bailii* te *Pichia* spp. (Goh i sur., 2012). Celulozna opna se sintetizira stvaranjem tankog sloja plivajuće celuloze na kojoj se nalazi biomasa bakterija i kvasaca (Jayabalan i sur., 2014). Ova moćna simbiotska zajednica i njezini nusprodukti imaju sposobnost inhibicije rasta potencijalnih kontaminirajućih bakterija i plijesni (Jayabalan i sur., 2014). Općenito se smatra da broj bakterijskih stanica i stanica kvasaca doseže 10<sup>4</sup>-10<sup>6</sup> CFU mL<sup>-1</sup> u kulturi *kombuche* koja je fermentirala do 10 dana (Teoh i sur., 2004). Mnoga znanstvena istraživanja su dokazala da kvasci brojčano nadmašuju bakterije (Goh i sur., 2012;

Chen i Liu, 2000). Kako napreduje fermentacija, kiselost hranjive podloge se povećava zbog proizvodnje organskih kiselina (slika 1). Zbog nedostatka kisika uzrokovanim visokom kiselošću, također se smanjuje broj živih bakterijskih stanica prisutnih u čaju od *kombuche* (Chen i Liu, 2000). Broj kvasaca i bakterijskih stanica prisutnih u čaju je veći od broja stanica u nanoceluloznoj pelikuli (Goh i sur., 2012).



**Slika 1.** Proizvodnja organskih kiselina tijekom fermentacije *kombucha* napitaka (Goh i sur., 2012)

### 2.3. ZDRAVSTVENI UČINCI *kombuche*

Američko udruženje dijabetičara je definiralo funkcionalnu hranu kao proizvode koji uključuju hranu, obogaćenu ili poboljšanu, koja ima potencijalno blagotvoran učinak na zdravlje kada je redovito konzumirana kao dio raznolike prehrane (Hasler i sur., 2004). Zna se da napitak *kombuche* posjeduje mnoge profilaktične i terapijske koristi. Vjeruje se da pomaže u probavi, olakšava artritis, djeluje kao laksativ, sprječava mikrobne infekcije, djeluje protiv stresa i raka, pruža olakšanje kod hemeroida, ima pozitivan učinak na razinu kolesterola te olakšava izlučivanje toksina kao i pročišćavanje krvi (Jayabalan i sur., 2014; Malbaša i sur., 2011; Dufresne i Farnworth, 2000). Ovaj napitak se također povezuje s utjecajem na gastrointestinalnu mikrobiotu u ljudi tako što djeluje kao probiotičko piće i pomaže pri balansiranju crijevne mikrobiote, olakšavajući time do određene mjere normalizaciju crijevnih aktivnosti (Kabiri i sur., 2013; Malbaša i sur., 2011; Júnior i sur., 2009). Također je poznato da ima sposobnost poboljšavanja zdravlja kose, kože i noktiju, smanjuje stres i živčane poremećaje, smanjuje nesanicu, ublažuje glavobolju, smanjuje želju

za alkoholom kod alkoholičara te sprječava nastanak infekcija mokraćnog mjehura (Jayabalan i sur., 2014; Dufresne i Farnworth, 2000). Smanjenje kalcifikacije bubrega je također koristan učinak ovog napitka (Jayabalan i sur., 2014). Smanjenje menstrualnih poremećaja i problema kod menopauze, poboljšanje vida, regeneracija stanica, stimulacija žljezdanog tkiva u tijelu, ublažavanje bronhitisa i astme te općenito poboljšanje metabolizma predstavljaju zdravstvene prednosti koje su povezane s konzumacijom *kombuche* (Jayabalan i sur., 2014). Blagotvoran učinak ovog napitka se pripisuje prisutnosti metaboličkih produkata prilikom fermentacije, iako se smatra da je većina zdravstvenih prednosti zbog mogućnosti da neutralizira slobodne radikale. Mikrobna zajednica ima sposobnost povećati aktivnost neutraliziranja radikala crnog čaja procesom fermentacije (Dufresne i Farnworth, 2000). Također, prisutnost glukuronske kiseline daje korisna svojstva ovom piću (Teoh i sur., 2004). Glukuronsku kiselinu obično proizvodi zdrava jetra i ta je karboksilna kiselina lako topljiva u vodi. Ova se kiselina može pretvoriti u glukozamin i kondroitin sulfat koji su povezani s kolagenom i fluidom koji djeluje kao mazivo u zglobovima (Yavari i sur., 2011). Mikrobna zajednica proizvodi maslačnu kiselinu u procesu fermentacije za koju se zna da štiti ljudske stanične membrane. U kombinaciji s glukuronskom kiselinom, ovaj kompleks ima sposobnost očvršćivanja stijenke crijeva i davanja zaštite od parazita (Dufresne i Farnworth, 2000). Iako se može činiti da su mnogi izvještaji koji su dostupni o *kombuchi* bazirani na osobnim iskustvima i uvjerenjima, u novije vrijeme su znanstvenici objavili znanstvene dokaze koji objašnjavaju terapijske učinke napitka u *in vitro* i *in vivo* istraživanjima (Martinez-Leal i sur., 2018).

### 2.3.1. Antimikrobna aktivnost

Poznato je da čaj od *kombuche* pokazuje izvanrednu antimikrobnu aktivnost prema širokom rasponu mikroorganizama. Mnoga znanstvena istraživanja su se bavila ovom temom i *kombucha* napitak je pokazao inhibirajuću aktivnost protiv mnogih patogenih gram-pozitivnih i gram-negativnih mikroorganizama (Dufresne i Farnworth, 2000). Čaj od *kombuche* je pokazao sposobnost da inhibira rast patogena kao što su *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Entamoeba cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Leuconostoc monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* te *Candida albicans* (Sreeramulu i sur., 2001; Dufresne i Farnworth, 2000; Sreeramulu i sur., 2000). Antimikrobna aktivnost napitka se pripisuje niskoj pH vrijednosti ovog napitka, posebice zbog prisutnosti octene kiseline i niza drugih organskih

kiselina i katehina kao i mnogih velikih proteina koji se proizvode prilikom fermentacije (Dufresne i Farnworth, 2000; Sreeramulu i sur. 2000). Octena kiselina i katehini su posebno poznati po inhibiciji niza gram-pozitivnih i gram-negativnih mikroorganizama (Jayabalan i sur., 2014). Također su istraživanja pokazala da napitak može sadržavati antibiotske tvari koje imaju antimikrobna svojstva (Deghrigue i sur., 2013; Sreeramulu i sur., 2000). Neka istraživanja su pokazala da čaj od *kombuche* ne pokazuje samo antibakterijsku nego i antifungalnu aktivnost. Antifungalna aktivnost se pripisuje prisutnosti octene kiseline u ovom napitku. U novije vrijeme, uvelike je primijećena pojava rezistentnih sojeva patogena povezanih s ljudskim bolestima, a čaj od *kombuche* se može koristiti kao antimikrobni proizvod kako bi se prevladao ovaj problem (Battikh i sur., 2013).

### 2.3.2. Probiotičko djelovanje

Poznato je da su probiotici živi mikroorganizmi. Kada se daju u dovoljnim količinama, mogu rezultirati zdravstvenim prednostima. Najčešće probiotici sadrže bakterije iz rodova *Lactobacillus* ili *Bifidobacterium* ili koktela tih dviju rodova. Podrška tim linijama u smjesi može biti i nekoliko čestih tipova kvasaca kao što su *Saccharomyces boulardii* i *S. cerevisiae* (Kozyrovska i sur., 2012). Poznato je da mikroorganizmi probiotici igraju bitnu ulogu u održavanju ljudskog zdravlja. Probiotički mikroorganizmi omogućavaju ravnotežu u crijevnoj mikrobioti, normalizirajući procese u crijevima i pojačavajući imunost. Osim toga, pomažu u poboljšanju probave, borbi protiv prekomjernog rasta štetnih bakterija te postizanja mentalne stabilnosti i raspoloženja, a protiv psiholoških stanja poput tjeskobe i depresije. Mnoga istraživanja su tvrdila da *kombucha* napitak nije samo probiotik nego djeluje i kao simbiotik, kombinacija prebiotika i probiotika (Júnior i sur., 2009; Dufresne i Farnworth, 2000). Prebiotik selektivno potpomaže rast i aktivnost združene kulture korisnih mikroba prisutnih u ljudskom crijevu (Júnior i sur., 2009). Bakterije i kvasci prisutni u ovom napitku djeluju kao probiotici, a mikroceluloza koja je prisutna može pomoći u rastu korisnih mikroorganizama prisutnih u crijevu (Kozyrovska i sur., 2012). Popularnost ovog napitka kao probiotika i simbiotika je porasla u novije vrijeme jer su znanstvenici otkrili da ovaj napitak može biti korišten da bi se poboljšala prehrana i pomoglo održati zdravlje kod ljudi koji rade u nezdravim uvjetima, poput radnika u rudnicima i polarnih istraživača (Kozyrovska i sur., 2012). Kada je ljudsko tijelo izloženo takvim uvjetima duže vremensko razdoblje, uobičajena kultura mikroorganizama u crijevu se promijeni zbog neprirodnih uvjeta, psiho-emocionalnih problema te drastične promjene u prehrani. To može dovesti do nestanka zaštitnih crijevnih mikroorganizama i pojave štetnih sekundarnih infekcija zbog oportunističkih mikroba. Ova



promjena u crijevnoj mikrobioti može dovesti do mnogih zdravstvenih problema kao što su alergije, autoimune bolesti, multipla skleroza te infekcijske bolesti kod transplantacija. Promjena u crijevnoj mikrobioti se može ispraviti do neke mjere pomoću čaja od *kombuche*. S obzirom na spomenute mogućnosti, znanstvenici su počeli razmatrati ovaj napitak za upotrebu u dopuni prehrane astronauta u svemiru (Kozyrovska i sur., 2012).

### 2.3.3. Antikancerogena svojstva

Prehrambene fitokemikalije su prepoznate kao učinkoviti agensi protiv raka. Stoga postoji nedavni trend konzumiranja hrane bogate tim bioaktivnim komponentama. Znanstvena istraživanja su potvrdila da *kombucha* također ima protukancerogene učinke (Dufresne i Farnworth, 2000). Središnja onkološka istraživačka jedinica u Rusiji i Ruska akademija znanosti u Moskvi su provele istraživanje na stanovništvu o ovom fermentiranom napitku i zaključile da dnevna konzumacija *kombuche* korelira s izrazito visokom otpornošću na rak (Dufresne i Farnworth, 2000). Istraživanja su pokazala da sposobnost ovog fermentiranog napitka služi kao protukancerogeni agens zbog prisutnosti polifenola iz čaja i sekundarnih metabolita proizvedenih tijekom procesa fermentacije (Jayabalan i sur., 2014). Mnoga istraživanja su pokazala sposobnost polifenola iz čaja u ovom fermentiranom napitku da inhibiraju mutacije gena, inhibiraju proliferaciju stanica raka i potiču apoptozu stanica raka pa su bili naglašeni kao mogući mehanizmi protukancerogenih svojstava (Bode i Dong, 2003; Ioannides i Yoxall, 2003; Conney i sur., 2002). Također je bilo primijećeno da konzumacija čaja od *kombuche* može pomoći oboljelima od raka da izbalansiraju pH krvi koji se obično poveća na više od 7,56 tijekom bolesti. Nadalje, oboljelima od raka nedostaje L-mliječna kiselina u njihovim vezivnim tkivima. Ovo se može ispraviti konzumacijom *kombuche*, gdje tijekom fermentacije nastaje mliječna kiselina kao nusprodukt (Dufresne i Farnworth, 2000). Mnogi spojevi koji su prepoznati kao prisutni u čaju od *kombuche* poput polifenola, glukonske kiseline, glukuronske kiseline, mliječne kiseline i vitamina C su poznati po sposobnosti da smanje učestalost raka želuca. Također je bilo otkriveno da *kombucha* sadrži D-saharinsku kiselinu-1,4-lakton (DSL) za kojeg se zna da inhibira aktivnost glukuronidaze, enzima za kojeg se smatra da je indirektno povezan s rakom (Deghrigue i sur., 2013). Glukuronidaza ima svojstvo hidrolize glukuronida i proizvodi aglikone koji uzrokuju rak (Kumar i sur., 2015). Izvijesteno je da polifenoli prisutni u čaju od *kombuche* posjeduju antitumorska svojstva, time djelujući kao agens koji sprječava rak (Deghrigue i sur., 2013). Drugo istraživanje izvješćuje o prisutnosti dimetil-2-(2-hidroksil-2-metoksipropilidena)

malonata i viteksina u frakciji etil acetata čaja od *kombuche* za kojeg su pokazani citotoksični učinci pri koncentraciji od 100 µg mL<sup>-1</sup> (Jayabalan i sur., 2011).

#### 2.3.4. Detoksikacija

Detoksikacija je kompleksan proces uklanjanja toksičnih tvari iz tijela živih organizama. Ovaj proces može biti fiziološki ili medicinski. U ljudskom tijelu ovaj proces pretežno vrši jetra. Detoksikacija pomaže u održavanju zdrave jetre i također je poznato da ima ulogu u sprječavanju raka. Enzimi, bakterijske kiseline te drugi sekundarni metaboliti koje proizvode mikroorganizmi tijekom procesa fermentacije prilikom pripreme čaja od *kombuche*, pokazali su svojstvo detoksifikacije organizma (Dufresne i Farnworth, 2000). Nadalje, većina enzima i bakterijskih kiselina pronađenih u čaju od *kombuche* su jako slični kemikalijama koje proizvodi tijelo u svrhu detoksikacijskog procesa. Stoga unos čaja od *kombuche* u prehranu može rezultirati smanjenjem opterećenja jetre detoksikacijom. Mnoga znanstvena istraživanja su izvijestila da je ovo svojstvo uglavnom zbog sposobnosti glukuronske kiseline da se veže na toksične molekule koje ulaze u tijelo te da povećaju izlučivanje tih molekula pomoću bubrega i crijeva (Jayabalan i sur., 2007). Proces jakog vezanja između molekula glukuronske kiseline i toksina je poznata kao glukuronidacija. Glukuronska kiselina nastaje procesom oksidacije glukoze prilikom fermentacije (Vijayaraghavan i sur., 2000). Ova kiselina je najznačajniji detoksikator u ljudskom tijelu. Stoga ima svojstvo vezati se na toksine u jetri i potaknuti ih da se izlučuju iz tijela (Nguyen i sur., 2014). Slično glukuronskoj kiselini, jabučna kiselina je također nusprodukt fermentacije koja pomaže u detoksifikaciji jetre (Srihari i Satyanarayana, 2012). Osim potpomaganja detoksifikacije jetre, konzumacija čaja od *kombuche* također pomaže pri izlučivanju teških metala i okolišnih zagađivača iz ljudskog tijela kroz bubrege (Teoh i sur., 2004). Također je korisna u biotransformaciji tjelesnih metabolita kao što su bilirubin i suvišak steroidnih hormona (Srihari i Satyanarayana, 2012). Poznato je da uklanjanje toksina čajem od *kombuche* pomaže kod olakšanja oboljelima od gihta, reumatizma, artritisa i bubrežnih kamenaca, a to su stanja povezana s akumulacijom toksičnih tvari u tijelu (Dufresne i Farnworth, 2000).

#### 2.3.5. Antioksidacijska aktivnost

Popularna definicija antioksidansa je da je to tvar koja je prisutna pri niskim koncentracijama u usporedbi s oksidirajućim supstratom, a značajno usporava ili inhibira oksidaciju supstrata

(Shebis i sur., 2013). Ova bioaktivnost bi se mogla pojasniti kao (1) mijenjanje svojstva molekula, (2) vezanje prooksidativnih metala te (3) inhibicija prooksidativnih enzima. Mnoga istraživanja su dokazala učinak tih antioksidativnih svojstava na mnoge ljudske bolesti poput raka i dijabetesa (Chu i Chen, 2006). Glavni mehanizam djelovanja antioksidansa u uvjetima takvih bolesti je uklanjanje posrednika slobodnih radikala, a ti slobodni radikali se stvaraju u reakcijama oksidacije koje se događaju diljem ljudskog tijela. Slobodni radikali mogu započeti više lančanih reakcija koje će naposljetku dovesti do oštećenja ili smrti pogođene stanice (Shebis i sur., 2013). Kada antioksidans dođe u kontakt sa slobodnim radikalima, oni se mogu oksidirati te inhibirati ostale reakcije oksidacije koje dovode do štetnih lančanih reakcija. Oksidativni stres koji uzrokuju slobodni radikali imaju važnu ulogu u mnogim bolestima ljudi kao što su Parkinsonova bolest, bolesti srca i žila, raka zbog nedostatka odgovarajuće prehrane i tjelovježbe, zagađenja zraka u okolini te pušenje (Srihari i Satyanarayana, 2012). Kao protuteža oksidativnom stresu koji uzrokuju slobodni radikali, važno je uklopiti hranu koja sadrži antioksidanse u dnevnu prehranu (Shebis i sur., 2013).

Tijekom fermentacije *kombuche*, iz listova čaja se otpuštaju mnogi spojevi sa svojstvom uklanjanja radikala (Malbaša i sur., 2011). Polifenoli i katehini su glavna skupina spojeva koji su pronađeni u čaju, a pripadaju skupini flavanola (Battikh i sur, 2013; Malbaša i sur., 2011; Koo i Cho, 2004). Smatra se da polifenoli imaju široki raspon antioksidativnih svojstava jer imaju svojstvo uklanjanja slobodnih radikala i reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) (Srihari i Satyanarayana, 2012). Polifenoli čine oko 30 % ukupne mase suhe tvari svježih listova čaja te su epigalokatehin, epigalokatehin-3-galat i epikatehin najčešći tipovi polifenola pronađeni u listovima čaja (Jayabalan i sur., 2008). Pokazalo se da čaj od *kombuche*, pripremljen korištenjem zelenog čaja, crnog čaja te otpadnog materijala čaja, ima veliku sposobnost uklanjanja radikala (Jayabalan i sur., 2008). Kada su kompleksni fenolni spojevi prisutni u kiselom okolišu ili kada su prisutni enzimi oslobođeni s bakterija i kvasaca u čajnim gljivama, događa se degradacija kompleksnih molekula do malih molekula što uzrokuje povećani broj dostupnih fenolnih spojeva u bujonu čaja od *kombuche* (Srihari i Satyanarayana, 2012). Stoga, kada se događa fermentacija, ukupna količina fenola se povećava (Srihari i Satyanarayana, 2012). Proizvodnja spojeva koji posjeduju svojstvo uklanjanja radikala ovisi o dužini fermentacije te podrijetlu starter kultura koje će proizvoditi metabolite (Chu i Chen, 2006). Međutim, produžena fermentacija nije prikladna jer nakupljanje organskih aminokiselina može imati štetan učinak kada se čaj od *kombuche* duže vrijeme konzumira (Srihari i Satyanarayana, 2012).

## 2.4. BAKTERIJSKA NANOCELULOZA (BNC)

Celuloza je najrašireniji, jeftin i lako dostupan ugljikohidratni polimer u svijetu, tradicionalno izoliran iz biljaka ili njihovog otpada. Ovaj polimer u čijoj su strukturi sastavni dijelovi hemiceluloza i lignin, mora se podvrgnuti kemijskim procesima hidrolize s jakim lužinama i kiselinama da bi se dobio čisti proizvod (Sun, 2008). Zbog povećanja potražnje za derivatima biljne celuloze povećana je i potrošnja drva kao sirovine, što je rezultiralo krčenjem šuma i postalo globalni okolišni problem (Park i sur., 2010).

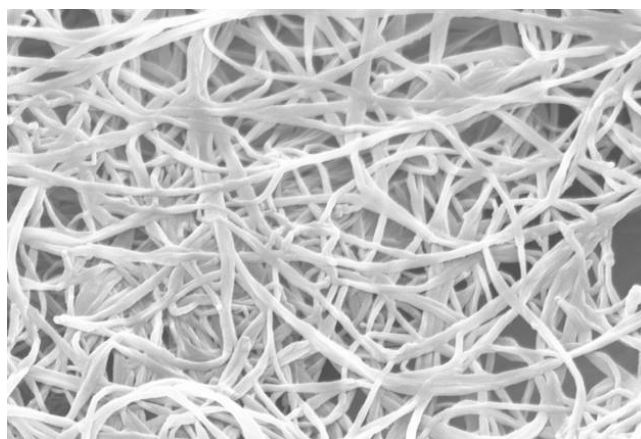
Iako su do sada biljke bile glavni izvor celuloze, razne bakterije proizvode celulozu koja može biti alternativa biljnoj celulozi. S obzirom na prirodu strukture koja se sastoji samo od monomera glukoze, bakterijska celuloza ima brojna izvrsna svojstva kao što su jedinstvena nanostruktura (Chen i sur., 2010), visoki kapacitet zadržavanja vode (Saibuatong i Phisalaphong, 2010), visoki stupanj polimerizacije (Dahman i sur., 2010), velika mehanička čvrstoća (Castro i sur., 2011) i velika kristaliničnost (Keshk, 2014). Otkrića iz prethodnih istraživanja su jasno pokazala da bakterijska celuloza i njezine preradevine imaju ogromni potencijal i obećavajuću budućnost u raznim područjima poput biomedicinskoj, elektroničkoj i prehrambenoj industriji (Shah i sur., 2013; Zhu i sur., 2010).

Bakterijsku celulozu proizvode bakterije octene kiseline i u kemijski definiranim i u kompleksnim podlogama putem oksidativnih vrenja. Taj nefotosintetski organizam može metabolizirati glukozu, šećer, glicerol ili neke druge organske supstrate i pretvoriti ih u čistu celulozu (Son i sur., 2001).

*Gluconacetobacter xylinus* (prije *Acetobacter xylinum*) je najviše proučavana bakterija octene kiseline jer je znanstveno dokazano da je najučinkovitiji producent bakterijske celuloze (El-Saied i sur., 2004), a može asimilirati različite šećere i sintetizirati velike količine celuloze u tekućoj podlozi (Moosavi-Nasab i Yousefi, 2011; Sani i Dalman, 2010). Ova aerobna gram-negativna bakterija aktivno raste pri pH 3-7 i temperaturi od 25 do 30°C, koristeći ugljikohidrate kao izvore ugljika (Castro i sur., 2011). Rivas i sur. (2004) su izvijestili da se gotovo 30 % cijene bakterijske fermentacije odnosi na troškove hranjivih podloga za uzgoj. Zbog visokih troškova fermentacije i niskih prinosa, industrijska proizvodnja bakterijske celuloze i njena komercijalna primjena još je vrlo ograničena. Stoga je važno tražiti novi ekonomični izvor ugljika s kraćim postupkom fermentacije za visok prinos bakterijske celuloze.

Za razliku od biljne celuloze, celuloza proizvedena bakterijama iz roda *Gluconacetobacter* lišena je drugih kontaminirajućih polisaharida i njezino izoliranje i pročišćavanje su relativno

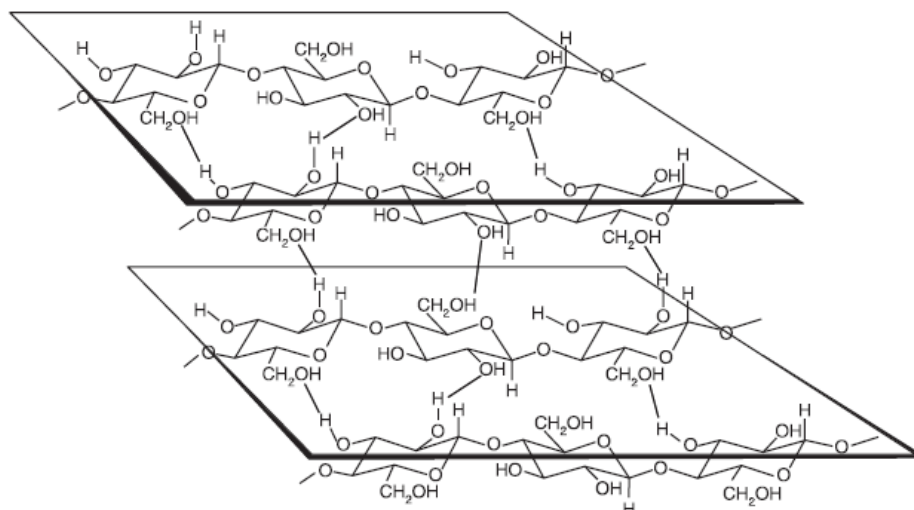
jednostavni, te ne zahtijevaju energetske ili kemijske intenzivne procese. Nadalje, ekološki problemi zbog nusproizvoda nakon dobivanja drvene celuloze daju dodatni poticaj za proučavanje neistraženih izvora celuloze (Colvin, 1980). Ne postoji niti jedan sustav koji je nastao kao idealni sustav za proučavanje biosinteze celuloze. Vrlo malo rodova bakterija može sintetizirati celulozu, ali gram-negativna bakterija *Gluconacetobacter xylinus* (prije poznata kao *Acetobacter xylinum*) izlučuje velike količine celuloze u obliku mikrovlakna iz reda sintetskih mjesta duž uzdužne osi stanice (Tanaka i sur., 2000). Sintetizirana mikrovlakna se spajaju pri čemu nastaje struktura umreženih celuloznih vlakana (slika 2).



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

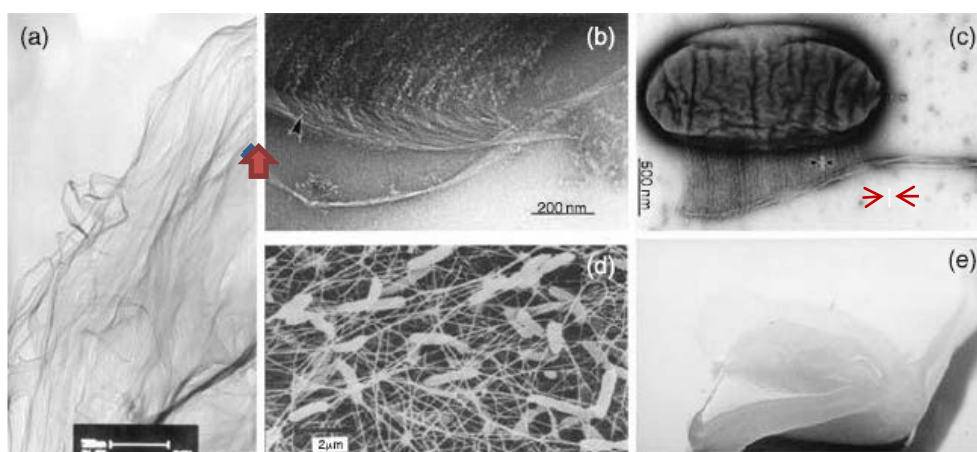
#### 2.4.1. Sinteza i struktura BNC

Struktura bakterijske celuloze sastoji od vlakana građenih od  $\beta$ -1,4-glukanskih lanaca, jedinstvene molekulske formule kao i celuloza biljnog podrijetla,  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . Glukanski lanci povezani su vanjskim i unutarnjim vodikovim vezama (slika 3). Mikrovlakna bakterijske celuloze prvi je opisao Mühlethaler (1949), koji je uočio da su oko 100 puta manja od vlakana iz biljne celuloze (Gayathry i Gopaldaswamy, 2014; Chawla i sur., 2009).



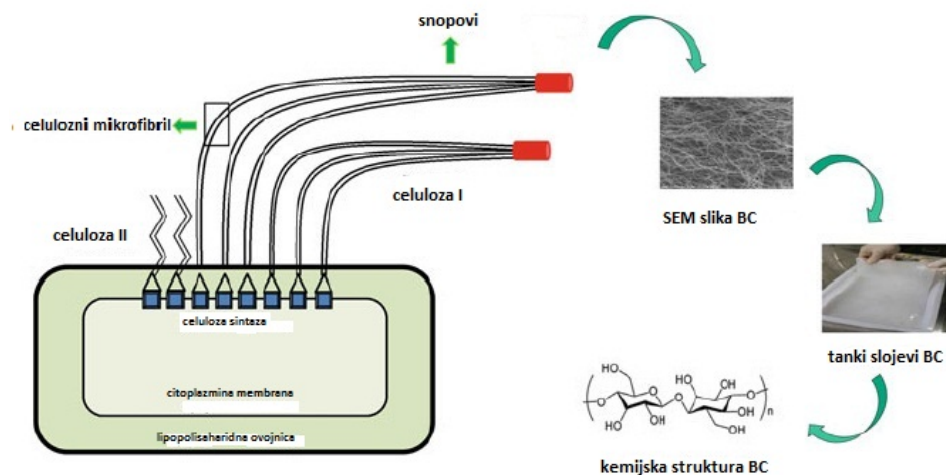
**Slika 3.** Vanjske i unutarnje vodikove veze u BNC (Pecoraro i sur., 2008)

Stanice *G. xylinus* imaju 100 ili više pora u strukturi stanične membrane za ekstruziju celuloznih nanofibrila. Kroz svaku se poru izlučuje lanac celuloznog nanofibrila koji se grupira s drugih 36 lanaca koji zajedno formiraju osnovni fibril promjera oko 3,5 nm. Oko 46 susjednih fibrila vežu se vodikovim vezama u snopove širine od 40 do 60 nm (slika 4a), koji se međusobno isprepliću i stvaraju mrežu fibrila (slika 4b i c). Ovako isprepleteni snopovi fibrila formiraju gelu sličan pokrov na površini tekuće podloge (pelikulu) koja sadrži bakterije octene kiseline (slika 4d), debljine od 1 do 2 cm (slika 4e), što ovisi o dužini fermentacije *kombucha* napitka (Pecoraro i sur., 2008).



**Slika 4.** a) TEM snimka BNC fibrila širine oko 60 nm; b) strelica pokazuje mjesto gdje se fibrili počinju zamotavati; c, d) SEM snimka stanice bakterije *G. xylinus* koja je proizvođač nanoceluloznih fibrila. Mjesto između dvije crvene strelice predstavlja širinu fibrila; e) pelikula BNC uzgojene u statičkoj kulturi (Pecoraro i sur., 2008)

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



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

#### 2.4.2. Sinteza BNC

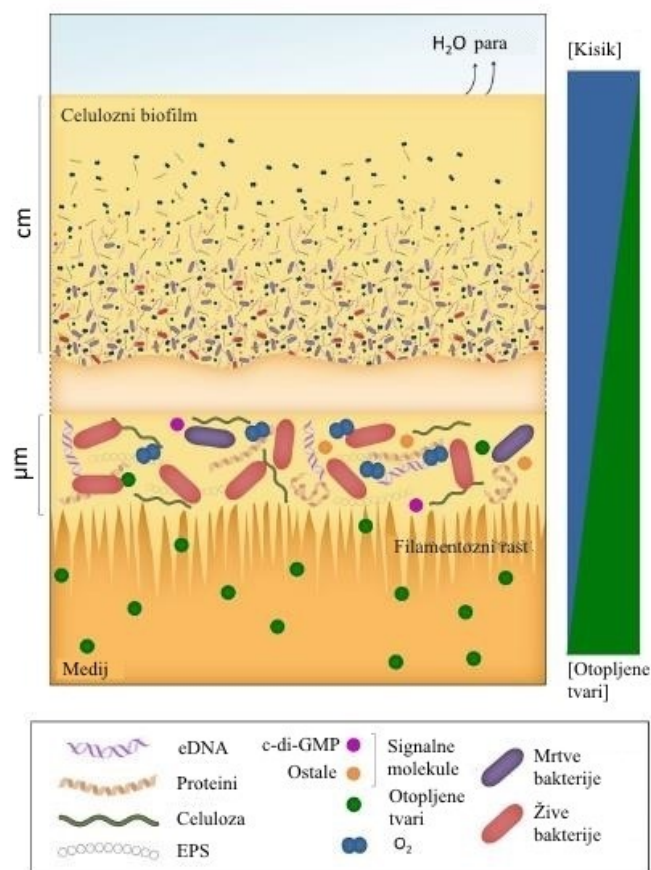
Biofilm može biti opisan kao združena kultura stanica ugrađenih u ekstracelularni matriks koji prolazi kroz razvojne stadije što rezultira predvidljivim “životnim ciklusom” (McDougald i sur., 2012). Potreba za bakterijama da se promijene iz planktonskog u oblik biofilma je odgovor na njihov kemijski i fizički okoliš. Ekstracelularni matriks biofilma pruža zaštitu bakterijskim stanicama u teškim uvjetima. On služi kao potpora kako ne bi došlo do ispiranja stanica zbog toka tekućine, a vezanjem za podlogu, on štiti stanice protiv antimikrobnih spojeva ograničavajući difuziju tih spojeva i povećavajući gustoću stanica te povećavajući faktore za antibiotsku rezistenciju, kao u slučaju izmjene eDNA (plazmida) i DNA putem konjugacije. Ekstracelularni matriks biofilma koji proizvode bakterije, sastavljen je od proteina, egzopolisaharida (EPS) te ekstracelularne DNA. Poli-*N*-acetilglukozamin (PAG) i BNC su glavne komponente frakcije EPS i posebice BNC, koji je prvi identificiran

kao sastavni dio matriksa biofilma kod gram-negativnih bakterija 2001. godine (Rabin i sur., 2015; Zogaj i sur., 2001).

Biofilm se sintetizira sloj po sloj na površini tekućine u različitim oblicima i debljinama. Tijekom fermentacije, biofilm izgleda kao jako tanak sloj koji se svakodnevno sintetizira i dobiva na volumenu i debljini, ovisno o dužini fermentacije. Prilikom uznemiravanja tekućine, biofilm biva uništen, ali se i dalje sintetizira nakon nekoliko dana. Međutim, s obzirom da se fermentacija uglavnom provodi s BNC iz prijašnje fermentacije kojoj nije u potpunosti poznat sastav simbiotske starter kulture, često se mogu primijetiti odstupanja od izgleda novo sintetizirane BNC (Giudici i sur., 2009; Gullo i Giudici, 2008). Nadalje, širok spektar okolišnih čimbenika uključujući koncentraciju kisika, nutrijenata ili toksičnih spojeva, kao i mehanički stresovi mogu rezultirati makroskopskim promjenama oblika i teksture BNC (Gullo i sur., 2016). Biofilm na površini hranjive podloge se može smatrati kompleksom hidrogela živih i mrtvih stanica bakterija octene kiseline ugrađenih u ekstracelularni matriks (slika 6).

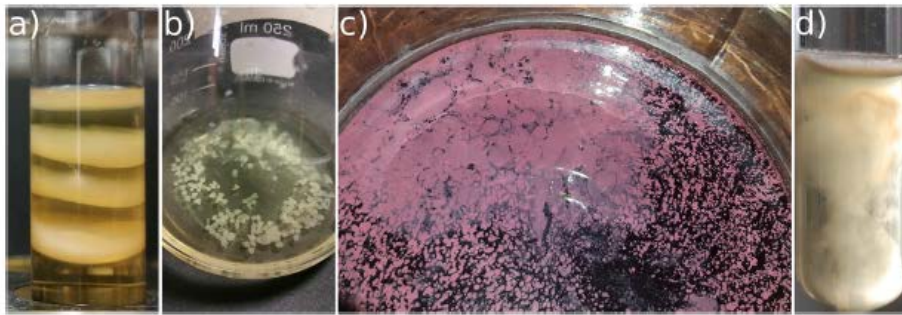
Nastajanje biofilma tijekom fermentacije ima barem tri cilja: (i) štititi žive stanice od nakupljanja octene kiseline, (ii) održati optimalne osmotske uvjete i razine izvora ugljika potrebnih za rast i preživljavanje, i (iii) odgovarati na vanjske mehaničke stresove. S jedne strane, 3D mreža snopova BNC može razdvojiti majčinsku tekućinu u mikrookolišima koji okružuju živuće stanice, djelujući kao selektivna fizička barijera koja kontrolira transfer topljive supstancije ograničen difuzijom između biofilma i glavne tekuće podloge. Obično se smatralo da se formirajući biofilm sintetizira na dodirnoj površini zraka i tekućine. Međutim, kao što pokazuje dugotrajno iskustvo u laboratorijskim uvjetima, mjesto stvaranja biofilma nije slobodna površina tekućeg medija, nego uronjeni sloj blizu slobodne površine jer međuprostorne šupljine i pore u tekućini koje odvajaju mikrokolonije su preferirana mjesta za proizvodnju BNC.





**Slika 6.** Struktura biofilma bakterija octene kiseline. Gornja strana u centimetrima (cm): stvaranje BNC biofilma se događa na donjoj površini zbog dostupnosti izolata i difuzije kisika kroz matriks. U gornjem sloju, rast stanica je ograničen zbog isparavanja i niske dostupnosti izolata; donja strana u mikronima (µm): stvaranje BNC biofilma u ranoj fazi, uz dostupnost kisika i izolata (Gullo i sur., 2016)

Gullo i sur. (2017) su istraživali optimalne uvjete za proizvodnju BNC, uz visoki prinos s bakterijom *G. xylinus* UMCC2756. U statičkim uvjetima, dobivena je dobro strukturirana i debela pelikula koja je sadržavala samo Ia celulozu. Biofilm se razvio kroz nekoliko faza uključujući tranziciju iz pojedinačnih stanica raspršenih u glavnini tekućine do zrelog biofilma (Gullo i sur., 2017). Makroskopska promatranja sloja sačinjenog od čiste kulture *G. xylinus* jasno pokazuju da je uronjeni sloj filamentozan (slika 7) dok mikroskopska promatranja takvog biofilma pokazuju da je broj živih stanica veći u usporedbi s gornjom površinom.



**Slika 7.** Različite morfologije biofilma i bakterijske celuloze kod bakterija octene kiseline: BNC proizvedena s *G. xylinus* UMCC2756 kao višeslojni biofilm u statičnim uvjetima rasta (a); BNC proizvedena s *G. xylinus* UMCC2756 kao sfere u uznemirenim uvjetima rasta (b); tanak biofilm proizveden tijekom fermentacije vinskog octa (c); filamentozni rast biofilma s visoko producirajućem BNC izolatom u statičnim uvjetima rasta (d) (Gullo i sur., 2016)

Tlak kisika u plinovitoj fazi je od 10 i 15 %, ovisno o atmosferskim uvjetima, ima ulogu u povećanju proizvodnje i prinosa BNC (Watanabe i Yamanaka, 1995). Međutim, bez obzira na efektivnu koncentraciju kisika unutar biofilma, velika prepreka rastu živih stanica na gornjem sloju je slaba dostupnost nutrijenata radi ograničenog prijenosa mase iz glavne tekućine kroz BNC matriks, posebice kod otopljenih tvari velike molarne mase poput šećera. Zbog niske propusnosti topljivih tvari i dostupnosti vode, optimalni uvjeti rasta se povećavaju od površine biofilma prema filamentoznim i uronjenim slojevima biofilma. Svi ti dokazi su također potkrijepljeni s nekoliko istraživanja u vezi učinka površinske dehidracije na izolaciju i održavanje živih stanica bakterija octene kiseline u kulturi medija. Doista, kultivacija sporo rastućih bakterija je bila unaprijeđena razvijanjem i optimiziranjem dvostrukog agaroznog medija i polukrutog medija u kojem preferencijalno rastu stanice unutar prostora pri visokoj relativnoj vlažnosti. Umjesto toga, bilo je dokazano da je rast određenih bakterija octene kiseline koje mogu sintetizirati biofilm u agaroznoj hranjivoj podlozi jako inhibiran posebice kada je uzgoj proveden bez kontrole relativne vlažnosti (Mamlouk i Gullo, 2013).

## 2.5. BAKTERIJE OCTENE KISELINE I GLAVNE POTEŠKOĆE U PROCESU PROIZVODNJE BNC

Iz literature proizlazi da treba prevladati nekoliko uskih grla kako bi se efikasno prešlo s laboratorijskog na industrijski soj. Dostupnost visoko produktivnih sojeva, ugljikovi supstrati kao starter materijali te optimizacija metoda kulture čini se da su glavni uvjeti za efikasnu

BNC sintezu (Gullo i sur., 2017). Nekoliko istraživanja je bilo usredotočeno na karakterizaciju izdržljivih sojeva bakterija octene kiseline koji pokazuju prikladna tehnološka svojstva za proizvodnju BNC, međutim, većina njih je dobro istražena u laboratorijskom mjerilu, ali nisu nikad testirana u industrijskom mjerilu.

Kako bi se smanjila cijena proizvodnje BNC, testirane su različite strategije za minimiziranje troškova i korištenje otpadnih produkata kao izvora ugljika. Visoka produktivnost BNC je dobivena korištenjem melase iz kukuruzne močevine (CSL) dodane s limunskom kiselinom u kulturu *G. xylinus* BNCR5. Voće slabije kvalitete, koje se ne može prodati na tržnici, se također smatra potencijalno obnovljivom sirovinom za proizvodnju BNC. Trenutno, iako se korištenje jeftinih sirovina kao izvora ugljika čini primamljivo, treba biti pažljivo procijenjeno ne samo za prinos proizvedene BNC nego i za upstream i downstream procese nužne za uklanjanje inhibitora mikroba, kontaminanata i boje.

Najviše istraživane metode za proizvodnju BNC uključuju uvjete statičnosti i uronjenosti u kojima mogu biti dobiveni jednoliki glatki gelovi odnosno sfere (Ul-Islam i sur., 2017). Međutim, potreba za prilagođenim bioreaktorima za proizvodnju BNC je još uvijek otvoreno pitanje kako bi se povećao prinos BNC za određenu primjenu.

**2.6. UZAJAMNO DJELOVANJE IZMEĐU SVOJSTAVA I NATIVNE STRUKTURE BNC**  
Neovisno o prirodnom izvoru, uobičajena primarna struktura bakterijske celuloze se sastoji od dugog lanca  $\beta$ -1,4- D-glukanskih lanaca koji se razvijaju od nano- do makroskopske skale u 3D mreži, dosežući stupanj polimerizacije do 20 000 (Habibi i sur., 2010). Takve veze daju produženu sekundarnu strukturu sa specifičnom mašnilikom konformacijom. Tercijarna struktura je rezultat intermolekulskih vodikovih veza i van der Waalsovih sila: svi  $\beta$ -1,4-D-glukanski lanci poprimaju  ${}^4C_1$  konformaciju stolice, stabilizirajući cijelu strukturu kroz mrežu intramolekulskih vodikovih veza sačinjenih od hidroksila i kisika u prstenu među glukoznim ostacima. Svaka ponavljajuća jedinica ima kemijsku asimetriju usmjerenu ovisno o njenoj molekularnoj osi (hemiacetalnoj jedinici i hidroksilnoj grupi). Usmjerenost molekule podupire paralelnu strukturu nativne BNC (Koyama i sur., 1997).

Sva svojstva BNC strogo ovise o specifičnim karakteristikama arhitekture od nano- do makroskale, što je povezano i s biosintezom unutar stanice i izvanstaničnim samosastavljajućim mehanizmima. Općenito je prihvaćeno da se BNC sintetizira unutar bakterijske stanice kao pojedinačne molekule, koje prolaze vrtnju po hijerarhijskom redoslijedu na bakterijskim mjestima za biosintezu. BNC molekule su poredane po strani stanične površine, zajedno prije

grupiranja, kako bi formirale ultra sitne snopove za ugradnju kristalinične celuloze, imajući samo ograničen broj nedostataka ili amorfnih domena (Brown, 2004, 1996).

Prema Brown-u (1996), svaki mikrofibril je istisnut u specifičnoj regiji vanjske membrane, nazvanim terminalnim kompleksom (TC) koji se sastoji od tri podjedinice (BNC-sintetizirajućih mjesta), a svaka podjedinica sadrži barem 16 CS katalitičkih podjedinica. Svaka katalitička podjedinica proizvodi jedan  $\beta$ -1,4-glukanski lanac, a 16 glukanskih lanaca iz jednog BNC-sintetizirajućeg mjesta se spajaju kako bi tvorili protofibril od oko 2-20 nm u promjeru. Protofibrili se spontano povezuju čime tvore mašnoliki mikrofibril od otprilike 80,4 nm u promjeru i konačno 3D hijerarhijsku mrežu snopova. Svi lanci BNC u jednom mikrofibrilu mogu biti produženi praktički beskonačno pomoću CS kompleksa, dok hijerarhijski redoslijed jako ovisi o polimerizaciji i kinetici okretanja glukanskih lanaca.

Među najviše istraživanim svojstvima BNC iz AAB su visok kapacitet zadržavanja vode (više od 90 %), netopljivost u većini otapala, visok stupanj polimerizacije (4 000 – 20 000 hidroglikoznih jedinica) (Gullo i sur., 2017) i visok stupanj kristaliničnosti (80 – 90 %).

BNC derivati su bili istraživani zbog njihovih reoloških svojstava kao što su Youngov modul i čvrstoća popuštanja mjerenih u tlačnim ili vučnim uvjetima te spremanje i gubitak modula mjereni u vremenu i frekvenciji. Takva svojstva uglavnom ovise o geometriji mikrofibriila u nanometarskoj skali i o razini kristaliničnosti BNC. Iguchi i sur. (2000) su otkrili da se AAB biofilm ponaša jako različito od čistih hidrogelova. Kompleks intra- i intermolekulskih vodikovih veza BNC određuje relativno visoko elastična svojstva biofilma, dok su njegova viskozna svojstva određena međuprostornim šupljinama i kanalima koji odvajaju mikrokolonije koje sadrže tekuću fazu uglavnom sačinjenu od vode, a služe kao strukturni plastifikator (Iguchi i sur., 2000). Autori su primijetili da pod vučnim stresom, AAB biofilm pokazuje “elastično” (trenutno reverzibilno) ponašanje samo kod vrlo malih deformacija i u vremenskom rasponu nakon kojeg slijedi “koelastično” (reverzibilno ovisno o vremenu) i “plastično” (ireverzibilno zbog stresa) ponašanje. Takva kompleksna ponašanja su pripisana činjenici da fibrili reorijentiraju svoj kiralni redoslijed uzduž vlačnog opterećenja u smjeru u kojem reorganiziraju svoju poziciju, dok trenje uslijed klizanja vlakna uz vlakno može dovesti do ireverzibilnog procesa gubitka energije. Kada je stisnut, hidrogel iz AAB otpušta svoj sadržaj vode deformirajući se s velikom krutošću, ali bez pucanja strukture i širenja. Otpuštanje vode je glavni događaj koji uzrokuje plastičnu deformaciju (Frensemeier i sur., 2010). Reološka svojstva BNC hidrogela proizvedenih s *G. xylinus* su istražena pod jednoosnim rotirajućim uvjetima (Gao i sur., 2015). Zaključili su da su stvaranje mreže i

preraspodjela kod fragmenata BNC vlakna glavni razlozi koji uzrokuju ireverzibilnu deformaciju pod uvjetima punjenja, rasterećenja i ponovnog punjenja.

Iguchi i sur. (2000) su istraživali BNC slojeve dobivene iz AAB biofilмова nakon tretiranja toplinom i pritiskom. Zabilježili su jako visoke Youngove module od oko 16 – 18 GPa. Autori su primjetili da se mikrofibrili usko međusobno vežu zbog interfibrilnih vodikovih veza i poredaju se u hrpu tankih slojeva s jako velikom gustoćom. I vlačna čvrstoća i produženje su se smanjili s promjenom pritiska tijekom pripremanja filma. Zaključeno je da je nastanak mikropora najvjerojatniji uzrok smanjenja mehaničke čvrstoće BNC filma. Kroz korake purifikacije, isti autori su unaprijedili mehaničku čvrstoću BNC listova dosegnuvši 30 GPa za Youngov modul i izvrsne akustične karakteristike, predložili su njihovo korištenje u proizvodnji akustičnih dijafragma visoke kvalitete. Kod BNC filmova su također istraživana njihova osnovna reološka svojstva u eksperimentima s dinamičkom oscilacijom u ovisnosti o temperaturi ili relativnoj vlažnosti. Dinamički modul se smanjio sa 15 na 9 GPa s porastom temperature, dok je  $\tan\delta$ , tj. omjer između modula gubitka i modula skladištenja pokazao dva maksimuma na oko 50 i 230 °C koji su pripisani desorpciji vode odnosno degradaciji BNC (Iguchi i sur., 2000). Termomehaničko ponašanje BNC filmova proizvedenih pomoću *K. xylinus* (UMCC2756) soja je također bilo istraženo (Gullo i sur., 2017). Autori su otkrili da ovaj soj može proizvesti jedinstveni biofilm koji sadrži alomorf  $I\alpha$  kao jedini kristalni oblik celuloze i velike količine vode koja se može smrznuti (otprilike 12,9 % po težini). Plastizirajući učinak absorbirane vode je rezultirao križanjem modula spremanja na 0 °C.

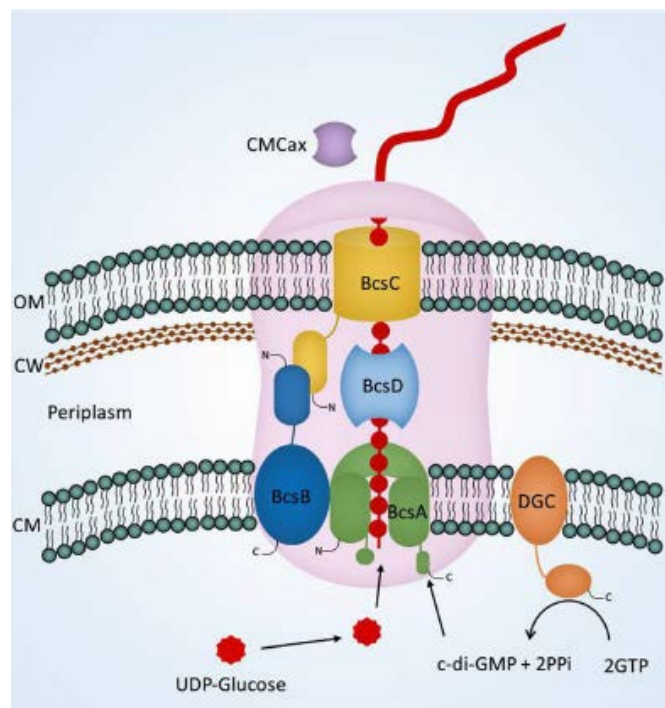
Shaw i sur. (2004) su pokušali istražiti reološko ponašanje podupirući BNC funkcionalnost za okoliš i njeno svojstvo da održava bakterijski biofilm u stabilnim uvjetima homeostatskog rasta. Svi bakterijski biofilmovi se ponašaju kao elastični/viskoelastični/plastični polimerni materijal, tj. pokazuju elastični čvrstoliki odgovor na kratkotrajne mehaničke stimulanse (stres ili deformacija), sposobnost obnavljanja strukture u uvjetima stimulansa osrednjeg vremenskog trajanja, kao i plastični odgovor u slučaju stimulansa dugog vijeka trajanja. Ovo kompleksno ponašanje strukture bi moglo pružiti važnu informaciju u objašnjavanju otpornosti biofilma naspram različitim okolišnim mehaničkim stresovima. Elastični strukturni elementi absorbiraju energiju stresa brzim mehaničkim poticajima. Viskoelastični strukturni elementi absorbiraju energiju stresa putem vremenski ovisnih i reverzibilnih deformacija. Plastična svojstva opuštaju unutrašnji strukturni stres putem nereverzibilnih deformacija stabilnih stanja brzinom koja treba vrlo dugo vrijeme da dosegne novu strukturnu ravnotežu. Vrijeme relaksacije bakterijskog biofilma, tj. vrijeme potrebno da deformacija u potpunosti

otkloni početnu reverzibilnu deformaciju je procijenjeno na otprilike 18 minuta za niz bakterija. Moguće značenje ovog karakterističnog vremenskog perioda u pogledu preživljavanja je da je to najkraći period u kojem bakterijski biofilm može izvesti fenotipski odgovor na okolišne prolazne mehaničke stimulanse (Shaw i sur., 2004).

## 2.7. MEHANIZAM AKTIVNOSTI CELULOZA SINTAZE

Biosinteza BNC je jako kompleksan i dobro strukturiran mehanizam, odražavajući niz reakcija koje dovode do njegove sinteze. Na slici 8 je prikazan CS kompleks kao što je opisan u sojevima roda *Komagataeibacter*. On uključuje niz podjedinica koji rade na usklađeni način koji sintetizira i izvozi  $\beta$ -glukanske lance u ekstracelularni prostor. CS koristi glukozne monomere aktivirane s uridin-difosfatom (UDP-glukozom) kao prekursorom i regulirana je s bis-3',5'-cikličkim-dimernim-gvanozin monofosfatom (c-di-GMP), ključnim posrednikom ciklusa regulacije sinteze BNC (Ross i sur., 1991).

Katalitička podjedinica CS je  $\beta$ -galaktoziltransferaza nazvana BNC sintaza A (BNCsA) i pripada obitelji glikozil-transferaza 2 (GT-2) (Saxena i Brown, 1995). To je protein ugrađen u membranu s osam transmembranskih  $\alpha$ -heliksa (TM 1-8). BNCsA C-terminal sadrži citosolnu domenu nazvanu PilZ, odgovornu za vezanje c-di-GMP (Ross i sur., 1991). TM heliksi 3-8 tvore membranski kanal kroz citoplazminu membranu koja se koristi za translokaciju glukanskih lanaca u periplazmatski prostor tijekom elongacije stanice (Morgan i sur., 2013). Katalitička podjedinica je GT-A domena umetnuta između TM-4 i TM-5 (Lairson i sur., 2008). Predloženi mehanizam reakcije adicije monomera UDP-glukoze je klasična  $SN_2$ -lika reakcija supstitucije, u kojoj C-4 hidroksilna grupa rastućeg lanca glukana (acceptora) veže anomerni C-1 ugljik UDP-glukoze (donor). Ova reakcija je olakšana bivalentnim metalnim ionima ( $Mn_2^+$  i  $Mg_2^+$ ) (Brown i sur., 2012).



**Slika 8.** Celuloza sintaza kompleks u *Komagataeibacter*. Izvana prema unutra: OM, vanjska membrana; CW, stanična stijenka; CM, citoplazmina membrana (Brown, 2004)

## 2.8. INDUSTRIJSKA PROIZVODNJA BNC

BNC posjeduje veću površinu od biljne celuloze i jako je savitljiv materijal. Također, određeni tipovi umjetno obloženih nanočestica, uključujući metale, od velikog su zanimanja kako bi se dizajnirale AAB celuloze sa skrojenu nanostrukturom i funkcionalnim svojstvima.

Nativna BNC ne treba nikakve korake pročišćavanja koji bi mogli uzrokovati promjenu njezinih strukturnih i fizikalno-kemijskih svojstava. Iz ovog preduvjeta je jasno da to može biti prikladno za niz biomedicinskih primjena. Većina od njih su one koje tek nastaju, također zahvaljujući napretku u tkivnom inženjerstvu i regenerativnoj medicini. BNC se koristi za umjetnu kožu, umjetne krvne žile te hemostatske materijale. Jedna od najvažnijih upotreba BNC u biomedicinskom polju je za liječenje rana nosačima (Picheth i sur., 2017). Mnogi nosači na bazi BNC je odobrila Food and Drug Administration (FDA) zbog njihove visoke čistoće u smislu malog udjela proteina i endotoksičnih jedinica (Petersen i Gatenholm, 2011). Tijekom posljednjih godina, mnogi proizvođači (poput Biofill<sup>®</sup>, Gengifill<sup>®</sup>, Bionext<sup>®</sup> i Xcell<sup>®</sup>) su razvili biouređaje od BNC koja može biti korištena u širokom rasponu primjena u regenerativnoj medicini. Ti uređaji su karakterizirani različitim učincima kao što su

ublažavanje boli, brza regeneracija kože i smanjenje upalnog odgovora (Rajwadee i sur., 2015). Nadalje, BNC se također primjenjuje u pristupima dostave lijekova u kojima se mogu koristiti modificirane varijante BNC-a. Takve modifikacije mogu poboljšati svojstva nosača na bazi BNC. Kod BNC hidrogelova kombiniranih s karboksimetil celulozom (CMC) i natrijevim ibuprofenom kao modelom za lijek, pokazano je da CMC utječe na oteklinu i otpuštanje lijekova, sugerirajući da BNC-CMC hidrogelovi mogu biti iskorišteni u kontroliranim dostavama lijekova (Pavaloiu i sur., 2014).

Zahvaljujući stabilizirajućim učincima emulzije ulje-voda niske toksičnosti te sposobnosti da se navlaži koža bez potrebe za sufraktantima, BNC se opsežno koristi u kozmetici za kreme za lice i kao prah u čišćenju lica zajedno s ostalim prirodnim materijalima (poput maslinovog ulja, vitamina C, ekstrakta *Aloe vera* i želatinozne riže u prahu).

Primjena BNC je u nastajanju u kozmetici, proizvodnji kontaktnih leća zbog njezine prozirnosti, propusnosti svjetlosti i permeabilnosti za tekućine i plinove. Kontaktne leće proizvedene iz BNC mogu biti korištene u lijekovima za liječenje rožnice (Ullah i sur., 2016). BNC također igra ključnu ulogu u prehrambenoj industriji. Kao dijetalno vlakno, BNC je, prema FDA prepoznata kao sigurna (GRAS) (Shi i sur., 2014). Sposobnost da se dobiju okusi i boje čine BNC prikladnim pomoćnim sredstvom za hranu i pića. Nadalje, kao aditiv hrani, koristi se diljem svijeta zbog svojih gelirajućih i ugušćavajućih svojstava. Najčešći BNC derivati korišteni u hrani su CMC i hidroksipropil metilceluloza zbog svojih svojstava koje stabiliziraju strukturu. Tradicionalno, BNC se javlja u proizvodnji “nata de coco” i čaja od *kombuche*. “Nata de coco” je filipinski desert proizveden iz fermentirane kokosove vode. Dobivena BNC je nasjeckana na male komadiće i uronjena u sirup od šećera (Iguchi i sur., 2000), dok je čaj od *kombuche* piće dobiveno iz zašećerenog čaja u kojem zajedno kvasac i AAB provode fermentaciju (Mamlouk i Gullo, 2013). *Monascus*-BNC kompleks, koji kombinira ograničene kalorije i visok udio vlakana s glijvama *Monascus* (zdravi nutrijenti), je bio predložen kao zamjena za meso ili morsku hranu u vegetarijanskoj prehrani (Ng i Shyu, 2004). Također, BNC se koristi u niskokaloričnoj prehrani, zahvaljujući lipidima seruma i učinku smanjivanja kolesterola (Chau i sur., 2008). U usporedbi s ostalim dijetalnim vlaknima, BNC ima nekoliko važnih prednosti: (i) izdvojivost iz biofilma bez kemijske obrade; (ii) uvjeti biosinteze i rasta mogu biti prilagođeni skrojenoj strukturi i funkcionalnosti direktno *in situ* i u procesu; i (iii) potpuna nerazgradivost u ljudskom intestinalnom traktu (Pokalwar i sur., 2010). Nadalje, BNC sa svojom strukturom nalik na hidrogel bi mogla biti novi materijal za salate i niskokalorične deserte. Gel je sam po sebi pretvrd za gristi, ali

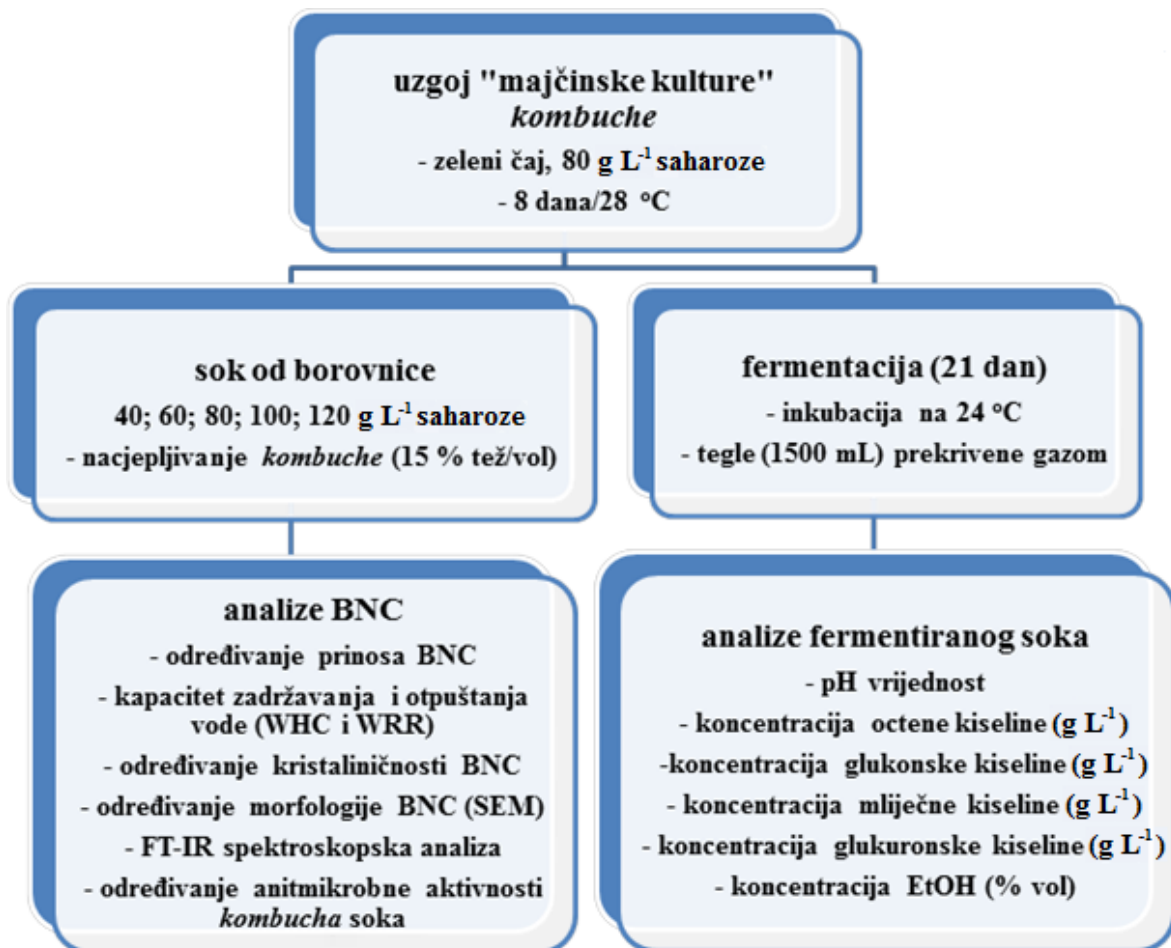


postane jestiv nakon obrade sa šećernim alkoholom ili s alginatom i kalcijevim kloridom, s ciljem imobilizacije vode u želatinoznoj BNC (Keshk, 2014). U proizvodnji visoko kvalitetne hrane je potrebna nova tehnologija bazirana na upotrebi enzima. U prošlim desetljećima BNC je također bila procijenjena kao sposobna za imobilizaciju enzima poput lakaza. Lakaze su enzimi koji se koriste za poboljšanje organoleptičkih svojstava kao što su boja i okus pića i ulja. Oni također mogu poboljšati kvalitetu umaka, koncentrata i juha procesom deoksigenacije (Osma i sur., 2010). Modificirana BNC se također opsežno koristi u pakiranju hrane kako bi se povećala sigurnost i produžio rok trajanja. Antimikrobni učinak je uočen dodavanjem sorbinske kiseline u jedno- i višeslojnoj BNC protiv *E. coli* (K12-MG1655) (Jipa i sur., 2012). Konačno, dokazana je primjena BNC u uklanjanju teških metala poput žive i arsena. Adsorpcija žive je brzo završila bez učinka na brzinu adsorpcije kroz duže vrijeme, dok je za arsen primijećena brza adsorpcija pri alkalnom rasponu pH (Gupta i Diwan, 2017).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. TIJEK ISTRAŽIVANJA

Cjelokupni tijek istraživanja prikazan je na slici 9.



Slika 9. Shematski dijagram tijeka cjelokupnog istraživanja

## 3.2. MATERIJALI I METODE RADA

### 3.2.1. Priprava kulture *kombuche*

Komercijalna starter kultura *kombuche* je pripravljena s „majčinskom tekućinom“ u zelenom čaju uz dodatak 80 g L<sup>-1</sup> saharoze. Uzgoj je trajao 8 dana u aseptičnim uvjetima pri 28 °C u termostatu.

### 3.2.2. Vrsta hranjive podloge

Uzgojena *kombucha* nacija je na sok od borovnice proizvođača RAUCH Fruchtsäfte GmbH & Co OG, Langgasse 1 A-6830 Rankweil, Austria.

Sastav: sok više vrsta voća od koncentriranog soka, minimum 50 % (jabuka, 5 % borovnica, bazga bobice), voda, šećer, limunska kiselina, vitamin C.

Nutritivna vrijednost (100 mL):

energijska vrijednost	189 kJ/45 kcal
masti	<0,5 g
ugljikohidrati	10,7 g
proteini	<0,5 g
sol	<0,01 g
vitamin C	12 mg (15 % RDA)

Nacijepljeni uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi tijekom 21 dana, a supernatant je svakih 24 sata izuziman za daljnja određivanja. Kontrolni uzorak je bio sok koji nije bio nacijepljen s kulturom *kombuche*.

### 3.2.3. Fermentacija i biosinteza BNC

Sok od borovnice (1000 mL) je prelišen u sterilne staklene posude za kućnu uporabu (1500 mL), nakon čega su uzorci inokulirani sa svježom uzgojenom *kombucha* kulturom (15 % tež/vol). Nacijepljeni uzorci su inkubirani pri 24 °C (sobna temperatura) tijekom 21 dana, nakon čega je prevrela tekućina centrifugirana pri 2500 okr/min tijekom 10 minuta, a supernatant je uporabljen za daljnja određivanja. Kontrolni uzorak je bio neprevreli sok od borovnice.

### 3.2.4. Određivanje pH vrijednosti

Uzorcima je pH vrijednost mjerena svaki dan tijekom 21 dana fermentacije. Mjerenja pH vrijednosti su provedena nakon pažljivog izuzimanja 5 mL uzorka pipetiranjem uz rub

posuda, kako ne bi došlo do oštećenja nanocelulozne biomase koja pluta na površini uzorka. Mjerenja su provedena pomoću pH metra Hanna Industrial model HI 98103.

### 3.2.5. Određivanje koncentracije octene kiseline

U Erlenmeyer tikvicu od 200 mL stavljeno je 1 mL uzorka fermentiranog soka, 20 mL vode i dodano nekoliko kapi fenolftaleina. Ovako pripremljeni uzorak je titriran otopinom 0,1 M NaOH do prve pojave ljubičaste boje. Koncentracija octene kiseline ( $\text{g L}^{-1}$ ) izračunata je prema izrazu:

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

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 (mL)

### 3.2.6. Određivanje koncentracije glukonske kiseline

U Erlenmeyer tikvicu od 200 mL stavljeno je 5 mL uzorka fermentiranog soka i dodano nekoliko kapi fenolftaleina. Ovako pripremljeni uzorak je titriran otopinom 0,1 M NaOH do prve pojave ljubičaste boje. Masena koncentracija glukonske kiseline ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) izračunata je prema jednadžbi:

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

gdje je:

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

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

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

### 3.2.7. Određivanje koncentracije mliječne kiseline

U Erlenmeyer tikvicu od 200 mL stavljeno je 5 mL uzorka fermentiranog soka i dodano nekoliko kapi fenolftaleina. Ovako pripremljeni uzorak je titriran otopinom 0,1 M NaOH do prve pojave ljubičaste boje. Masena koncentracija mliječne kiseline ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) 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)

### 3.2.8. Određivanje koncentracije glukuronske kiseline

Određivanje koncentracije glukuronske kiseline u uzorcima provedeno je prema metodi Li i sur. (2007). U kivetu je stavljeno 1 mL uzorka fermentiranog soka uz dodatak 0,4 mL vode. Nakon toga je dodano 40  $\mu\text{L}$  4 M sulfaminske kiseline – K sulfamata i 2,4 mL koncentrirane  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Kada je reakcijska smjesa postigla sobnu temperaturu, dodano je 100  $\mu\text{L}$  otopine karbazola (0,1 % tež/vol karbazola u EtOH). Kiveta je stavljena vodenu kupelj (100 °C) na 20 minuta, nakon čega je reakcijska smjesa ohlađena u ledenoj kupelji na sobnu temperaturu. ApSORBANCija uzorka je mjerena na 525 nm, a rezultati, izraženi u  $\text{g L}^{-1}$  su očitani iz baždarnog dijagrama pripravljenog sa standardnom glukuronskom kiselinom (koncentracija od 50 do 400 nM).

### 3.2.9. Određivanje etanola kemijskom metodom

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

#### Postupak:

U odmjernu tikvicu od 50 mL je stavljeno 5 mL uzorka čaja koji je razrijeđen s demineraliziranom vodom do 50 mL (odnos čaja i vode je 1:10). Uzorak je prebačen u tikvicu kruškastog oblika od 50 mL i neutraliziran s 0,1 M NaOH.

U Erlenmeyer tikvicu od 100 ml, u koju će se hvatati destilat, stavljeno je 10 mL otopine kalijevog bikromata i 5 ml koncentrirane  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Destilat se preko hladila i lule uvodi u otopinu kalijevog bikromata u Erlenmeyer tikvicu od 100 mL, koja mora biti u rashlađenoj vodi. Destilacija mora biti polagana i postupna i trajala je dok se sadržaj u tikvici za destilaciju nije smanjio na približno 3 mL (za to vrijeme je alkohol predestilirao). Po završetku destilacije lula je isprana s nekoliko mlazova destilirane vode u istu Erlenmeyer tikvicu u koju je uzorak predestilirao. Sadržaj tikvice je promućkan, začepljen gumenim čepom i ostavljen stajati 5 minuta radi potpune oksidacije alkohola. Tijekom oksidacije alkohola utrošen je jedan dio bikromata, dok je drugi dio ostao u suvišku. Zatim je sadržaj kvantitativno prebačen u Erlenmeyer tikvicu od 500 mL uz ispiranje, dodano mu je oko 200 mL destilirane vode radi razrjeđenja i 10 mL 20 %-tne otopine KI (radi određivanja preostale količine kalijevog bikromata) i ostavljeno začepljeno 5 minuta.

Tada dolazi do oksido-redukcijskog procesa između preostalog kalijevog bikromata i KI: krom se iz šesterovalentnog reducira u trovalentni, a jod iz KI se oksidira u elementarni jod,

zbog čega otopina dobije tamnu boju. Pritom se elementarni jod oslobađa u količini ekvivalentnoj kalijevom bikromatu.

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

Koncentracija (vol %) alkohola je izračunata prema jednadžbi:

$$\text{etanol (vol \%)} = \left(10 - \frac{a}{6,9}\right) \cdot 2 \quad (4)$$

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

### 3.2.10. Izračunavanje debljine, mase i prinosa nanocelulozne biomase *kombuche*

Tijekom 21 dana fermentacije mjerena je debljina sintetizirane BNC (ravnalom) u fermentiranom soku od borovnica. Nakon 21 dana fermentacije, plutajući gelovi BNC, koji su formirani na površini hranjivih podloga su pažljivo izvađeni iz staklenih posuda, oprani demineraliziranom vodom i ostavljeni preko noći u 1 M NaOH na sobnoj temperaturi kako bi se uklonile stanice mikroorganizama i sastojci podloga. Nakon toga su gelovi bakterijske celuloze ispirani demineraliziranom vodom sve dok pH vode za ispiranje nije dostigao početnu vrijednost vode (Toda i sur., 1997). Oprani gelovi su uronjeni u 96 %-tni EtOH tijekom 2 sata, izvagani da bi se izmjerila masa vlažne nanocelulozne biomase i nakon toga stavljeni na sušenje u suhi sterilizator pri 50 °C / 4 sata. Izmjerena je masa nanocelulozne biomase (g) prema sljedećoj formuli:

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

gdje je:

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

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

$m_i$  = masa inokuluma (g)

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

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

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

Kapacitet zadržavanja vode bakterijske nanoceluloze određivan je nakon 21 dan fermentacije. Biomasa *kombuche* je iz prevrelih podloga izvađena pomoću plastične pincete, protresena da se ukloni višak tekućine i nakon toga izvagana. Nakon vaganja, nanocelulozna biomasa je

ostavljena da se pokrivena filter papirom suši na sobnoj temperaturi 48 h (uklanjanje slobodne vode), nakon čega je sušena 12 h pri 60 °C u suhom sterilizatoru, kako bi se u potpunosti uklonila vezana voda. Kapacitet zadržavanja vode (WHC) je izračunat prema formuli (Shezad i sur., 2010):

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

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

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

### 3.2.13. FT-IR spektroskopija

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

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

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

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

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

#### Postupak:

Uzorak nanocelulozne biomase (0,3 g) stavljen je u Erlenmeyer tikvicu od 300 mL sa šlifom i prelije s 2 mL otopine joda (5 g I<sub>2</sub> + 40 g KI + 50 mL H<sub>2</sub>O). Reakcija je trajala 3 minute i nakon toga je u reakcijsku smjesu dodano 100 mL zasićene Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sve promiješano i ostavljeno na tamnom mjestu 1-4 h, uz miješanje (magnetna mješalica). Nakon toga je preostali jod određen titracijom s 0,01 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> uz škrob kao indikator (na 50 mL otopine za pipetiranje dodano je 50 mL demineralizirane vode i 1 mL škroba (0,5 %-tna otopina)).

Slijepa proba (sve isto osim nanoceluloze).

Količina apsorbiranog joda je izračunata prema jednadžbi:

$$I \text{ broj} = \frac{(a-b) \cdot 2,04 \cdot 2,54}{m \cdot \left(1 - \frac{w}{100}\right)} \text{ (mg I}_2\text{/ g celuloze)} \quad (8)$$

gdje je:

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

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

m – masa uzorka (g)

w – udjel vlage (%)

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

$$Cr I = 100 - (I \text{ broj} / 412 \cdot 100) (\%) \quad (9)$$

### 3.2.16. Određivanje antimikrobne aktivnosti *kombucha* soka od borovnice

Antimikrobna aktivnost inhibicije rasta odabranih test mikroorganizama, bakterija vrsta *Escherichia coli* 3014, *Salmonella Typhimurium* 3064, *Pseudomonas aeruginosa* 3024, *Staphylococcus aureus* 3048 i *Vibrio cholerae*, kao i kvasca *Candida albicans* 11, određivana je disk-difuzijskom metodom. Kao test mikroorganizmi korišteni su sojevi bakterijskih kultura iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu.

Na površinu čvrste hranjive podloge u Petrijevoj zdjelici, na koju je prethodno nacijepljen test-mikroorganizam, postavljeni su diskovi s određenim antimikrobnim agansom. Tijekom inkubacije spoj je difundirao radijalno iz diska u agar tvoreći gradijent koncentracije i ovisno o njegovom antimikrobnom djelovanju inhibirao rast mikroorganizma u okolini diska. Prozirna zona u kojoj nema vidljivog rasta naziva se zona inhibicije (ZI) i indikacija je osjetljivosti mikroorganizma prema mikroorganizmu s antimikrobnim djelovanjem.



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

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

*Kombucha* je jedno od najpopularnijih fermentiranih tradicionalnih napitaka koji se konzumira zbog unaprjeđenja zdravlja. Potvrđeno je da se konzumacijom *kombuche* liječe ili umanjuju simptomi bolesti poput artritisa, loše probave, različitih tipova karcinoma, hepatotoksičnost i dr. (Hiremath i sur., 2002; Pauline i sur., 2001; Sreeramulu i sur., 2000). Fermentaciju *kombuche* provode simbiotski povezane vrste kvasaca i bakterija octene kiseline (Teoh i sur., 2004), koje je, kao starter kulture, proglasio sigurnima US Food and Drug Administration (CDC, 1996). Tijekom procesa fermentacije zaslađene hranjive podloge, disaharidi podliježu hidrolizi do monosaharida pod utjecajem enzima i kiselina. Uloga kvasaca tijekom fermentacije je da previru šećere do alkohola i CO<sub>2</sub>. Za razliku od kvasaca, bakterije octene kiseline nastanjuju celulozni dio *kombucha* starter kulture. One imaju vitalnu ulogu u procesu fermentacije zbog toga što su odgovorne za stvaranje novog sloja celulozne pelikule i metaboliziraju alkohol koji je kvasac proizveo, do organskih kiselina.

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

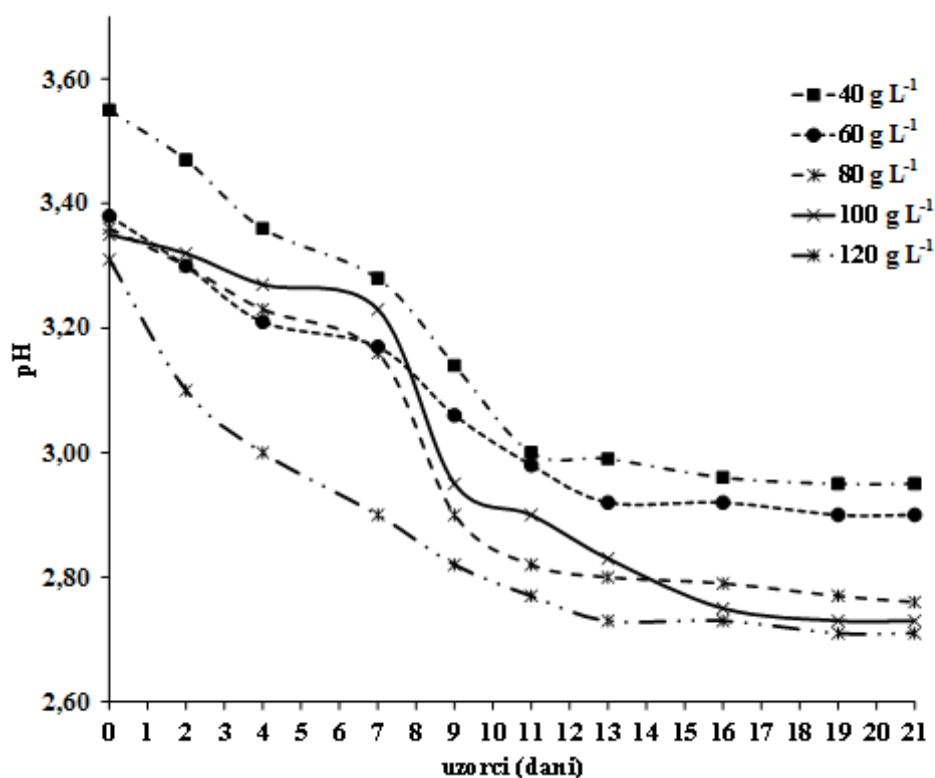
U ovom radu su istraživane biokemijske promjene koje su posljedica biotransformacije simbiotski združene kulture bakterija octene kiseline i kvasaca u fermentirani napitak (*kombucha*) i sintezu BNC. Uzgoj je proveden u statičnim uvjetima na sobnoj temperaturi tijekom 21 dana u kompleksnoj podlozi (sok od borovnice), a glavni izvor ugljika bila je saharoza (bijeli konzumni šećer) pri različitim koncentracijama (40, 60, 80, 100 i 120 g L<sup>-1</sup>). Prema literaturnim podacima, maksimalni prinos BNC postiže se za 7-8 dana (Goh i sur., 2012), no u ovom su radu istraživanja su nastavljena do 21. dana fermentacije da bi se zabilježilo moguće povećanje prinosa BNC tijekom produženog perioda fermentacije. Nadalje, istraživani su ključni čimbenici koji utječu na sintezu BNC, a poglavito se to odnosi na udjel izvora ugljika (saharozu), promjene pH vrijednost tijekom fermentacije, nastajanje organskih kiselina (octena, glukonska, mliječna i glukuronska) i etanola, kao i na antimikrobnu aktivnost fermentiranog *kombucha* napitka. Nakon završene sinteze BNC, proučavana su kristaliničnost i morfološka svojstva sintetizirane pelikule, kao i kapacitet zadržavanja i kinetika otpuštanja vode.

#### 4.1. pH VRIJEDNOST, ORGANSKE KISELINE I ETANOL

##### 4.1.1. pH vrijednost

Mjerenje pH vrijednosti je parametar kojim se kontrolira tijek fermentacije i koristi se za određivanje završetka procesa fermentacije (Malbaša i sur., 2011). Nadalje, koncentracija vodikovih iona je faktor koji može aktivirati ili inhibirati rast i razmnožavanje pojedinih vrsta mikroorganizama u hrani. Bakterije octene kiseline podnose aktivnu kiselost okoliša u pH području od 3,6 do 6,3, a vrijednosti koje nisu niže od 5,4 pospješuju njihovo razmnožavanje. Optimalna pH vrijednost za kvasce ovisi o vrsti i soju, no prosječno se kreće u području od 4,5 do 6,5 (Antolak i Kręgiel, 2015). Početni pH nakon inokulacije je bio prosječno oko 3,45. Tijekom analiziranog procesa fermentacije, pH u *kombucha* napitku smanjio se prosječno za 0,5 jedinica. što nije utjecalo na smanjenje opće senzoričke kakvoće napitka (slika 10). Izmjerene pH vrijednosti bile su niže nego što su zabilježili Kallel i sur. (2012). U njihovom istraživanju na zaslađenom čaju, uočeno je smanjenje pH vrijednosti čaja s 5,5 na 3,8 odmah nakon inokulacije *kombuche* u čaj. U istraživanju koje su proveli Cretović i sur. (2008), pH vrijednost zaslađenog čaja odmah nakon inokulacije bila je 4,7, no nakon trećeg dana fermentacije, koncentracije octene i limunske kiseline su počele rasti. Unatoč stalnom povećanju koncentracije organskih kiselina tijekom fermentacije, autori nisu uočili značajnije promjene pH vrijednosti. To se može objasniti puferskim kapacitetom fermentiranog napitka

(Cretović i sur., 2008). Tijekom fermentacije, pH vrijednost soka od borovnica inokuliranog *kombuchom* se smanjivala (slika 10). Kao posljedica povećanja koncentracije organskih kiselina, pH vrijednost se u uzorcima od početnih 3,31 ( $120 \text{ g L}^{-1}$ ) do 3,55 ( $40 \text{ g L}^{-1}$ ) jedinica linearno smanjivala sve do 2,71 ( $120 \text{ g L}^{-1}$ ), odnosno 2,95, koliko je iznosila najviša pH vrijednost fermentiranog napitka ( $40 \text{ g L}^{-1}$ ). Također je uočeno vrlo blago sniženje pH vrijednosti nakon 12. dana fermentacije, te zadnjih 5 dana fermentacije potpunu ujednačenost u svim uzorcima, osim u uzorku s  $100 \text{ g L}^{-1}$  dodane saharoze, gdje je pad pH vrijednosti nastavljen sve do 17. dana fermentacije, nakon čega se vrijednost nije mijenjala ( $\text{pH} = 2,74$ ). Dobiveni rezultati tijekom promjene pH vrijednosti su u suglasju s rezultatima istraživanja Chen i Liu (2000) i Sreeramulu i sur. (2000), osim što je u ovom radu fermentacija trajala 21 dan, a ne 14 kao u navedenim istraživanjima.



**Slika 10.** Promjena pH vrijednosti soka od borovnica tijekom 21 dana fermentacije s *kombuchom*

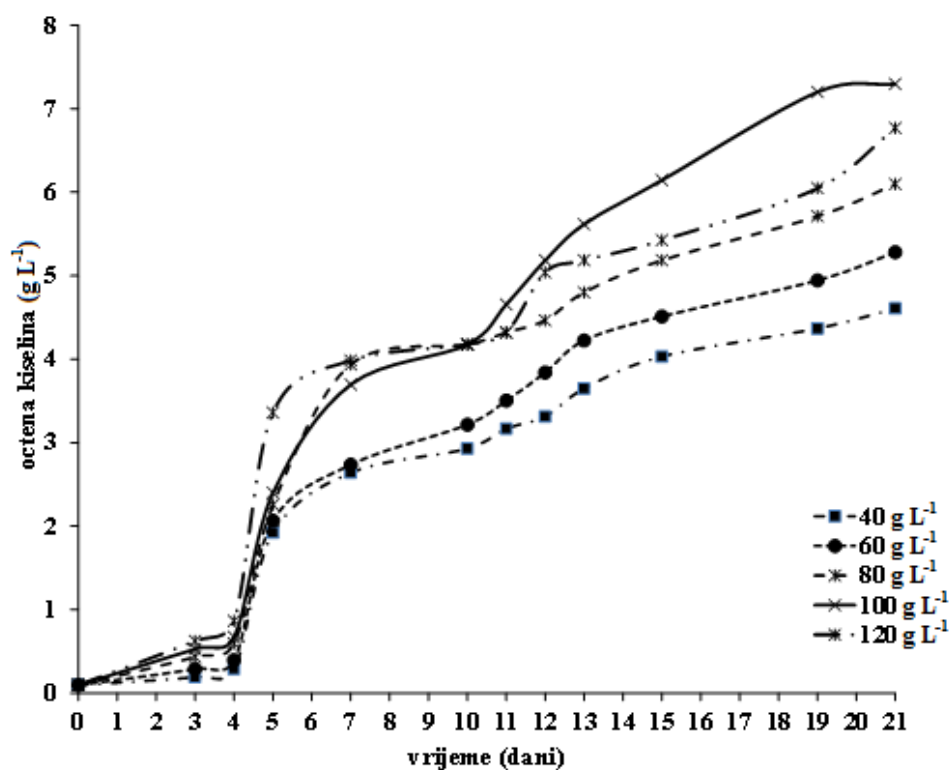
#### 4.1.2. Organske kiseline

Osim organskih kiselina, glavni metaboliti tijekom fermentacije *kombuche* su jednostavni šećeri, CO<sub>2</sub> i etanol (Chakravorty i sur., 2016). Prema Chen i Liu (2000), Lončar i sur. (2000), Malbaša i sur. (2002) i Jayabalan i sur. (2007), octena, glukonska, mliječna i glukuronska kiseline su glavni proizvodi *kombucha* napitka koji se proizvodi iz zaslađenog čaja ili soka u kontroliranim i optimiranim uvjetima fermentacije. Nguyen i sur. (2015) smatraju da pravi izbor *kombucha* starter kulture omogućava proizvodnju napitka s najvećim udjelom zdravih organskih kiselina. Koncentracija sintetiziranih organskih kiselina, octene, glukonske, mliječne i glukuronske, mijenjala se tijekom vremena trajanja fermentacije što je prikazano na slikama 11-14.

##### 4.1.2.1. Octena kiselina

Glavna organska kiselina u fermentiranom soku od borovnica bila je octena kiselina, čija se koncentracija u svim uzorcima, osim na početku fermentacije (do 4. dana) povećavala tijekom fermentacije (slika 11). U prva 4 dana fermentacije nije zabilježen značajniji porast koncentracije octene kiseline s početne vrijednosti uzoraka (0,096 g L<sup>-1</sup>) nakon inokulacije matičnim *kombucha* fermentiranim zelenim čajem koji je sadržavao određenu koncentraciju octene kiseline, tako da su se u 4. danu fermentacije izmjerene vrijednosti octene kiseline kretale od 0,29 g L<sup>-1</sup> do 0,86 g L<sup>-1</sup>. Nakon toga su vrijednosti počele, prvo eksponencijalno (do 7. dana), pa linearno rasti sve do kraja fermentacije. Najveća koncentracija octene kiseline je izmjerena u uzorku sa 100 g L<sup>-1</sup> dodane saharoze (7,96 g L<sup>-1</sup>), nešto niža sa 120 i 80 g L<sup>-1</sup> saharoze (6,77 g L<sup>-1</sup> i 6,10 g L<sup>-1</sup>), dok su u uzorcima s niskom koncentracijom dodane saharoze (40 i 60 g L<sup>-1</sup>) izmjerene relativno niske vrijednosti octene kiseline (4,61 g L<sup>-1</sup> i 5,28 g L<sup>-1</sup>). Ove niže vrijednosti bi se se mogle objasniti nedovoljnom količinom glukoze potrebne za sintezu octene kiseline jer je dio glukoze vjerojatno potrošen za sintezu BNC tijekom fermentacije. Dobiveni rezultati su u suglasju s rezultatima koje su objavili Kallel i sur. (2012), a koji su izmjerili od 5,4 do 8,0 g L<sup>-1</sup> octene kiseline nakon 14 dana fermentacije infuzije zelenog čaja.

Uz sposobnost sinteze relativno visokih koncentracija octene kiseline, bakterije octene kiseline su pokazale i toleranciju na kiselost, koja je rijetka među aerobnim homotrofima i heterotrofima. Ovo im svojstvo omogućava rast na hranjivoj podlozi koja već na početku uzgoja ima pH vrijednost nižu od 4,5 (Malbaša i sur., 2008), a u ovom radu se početna pH vrijednost uzoraka kretala od 3,55 do 3,1 (slika 11).

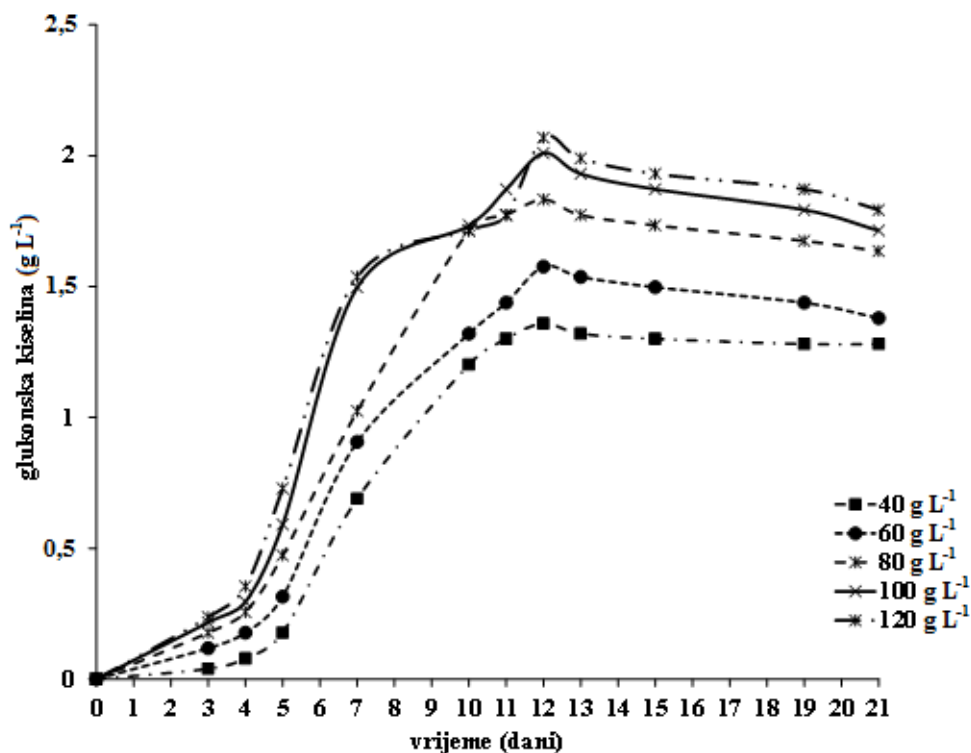


**Slika 11.** Kinetika nastajanja octene kiseline tijekom 21 dana fermentacije *kombucha* soka od borovnica

#### 4.1.2.2. Glukonska kiselina

Glukonska i glukuronska kiseline su uz octenu kiselinu, u *kombucha* napitcima, najzastupljenije kiseline, koje nastaju kao rezultat fermentacije na tradicionalnim hranjivim podlogama (zeleni i crni čaj). Bakterije octene kiseline glukozu oksidiraju do glukonske kiseline. Glukonska kiselina je druga glavna organska kiselina koja nastaje u većim koncentracijama kao posljedica metabolizma združene kulture mikroorganizama. Kao što je vidljivo na slici 12, koncentracija glukonske kiseline tijekom fermentacije soka od borovnice linearno se povećavala do 12. dana fermentacije u svim uzorcima, nakon čega je slijedilo blago sniženje vrijednosti koje su većinom ostale nepromijenjene do kraja fermentacije. Kao i kod octene kiseline, najveće vrijednosti su izmjerene pri koncentracijama saharoze od 100 i 120 g L<sup>-1</sup> (2,01 i 2,07 g L<sup>-1</sup>). Malo niža vrijednost je izmjerena pri 80 g L<sup>-1</sup> (1,82 g L<sup>-1</sup>), dok su pri koncentracijama od 40 i 60 g L<sup>-1</sup> dodane saharoze te vrijednosti bile vidljivo niže (1,36 i 1,58 g L<sup>-1</sup>). Chen i Liu (2000) su u svojem istraživanju uočili da nije bilo glukonske kiseline u uzorcima sve do 6. dana fermentacije na zelenom čaju. U ovom radu, prvo su izmjerene najniže koncentracije glukonske kiseline u svim uzorcima, zabilježene od 2. do 4. dana

fermentacije (od 0,02 do 0,35 g L<sup>-1</sup>), nakon čega je slijedio linearni rast vrijednosti koji je nastavljen sve do 12. dana fermentacije (slika 12). Koncentracija glukonske kiseline je izravno povezana sa sintezom BNC jer se njenim nastajanjem snižava pH vrijednost hranjive podloge, a to utječe na produktivnost sinteze BNC. Kako su masa ukupno sintetizirane BNC i nastajanje glukonske kiseline jednake količini utrošene glukoze, povećanje koncentracije glukonske kiseline odgovorno je za smanjenu produktivnost sinteze BNC (Masaoka i sur., 1993).

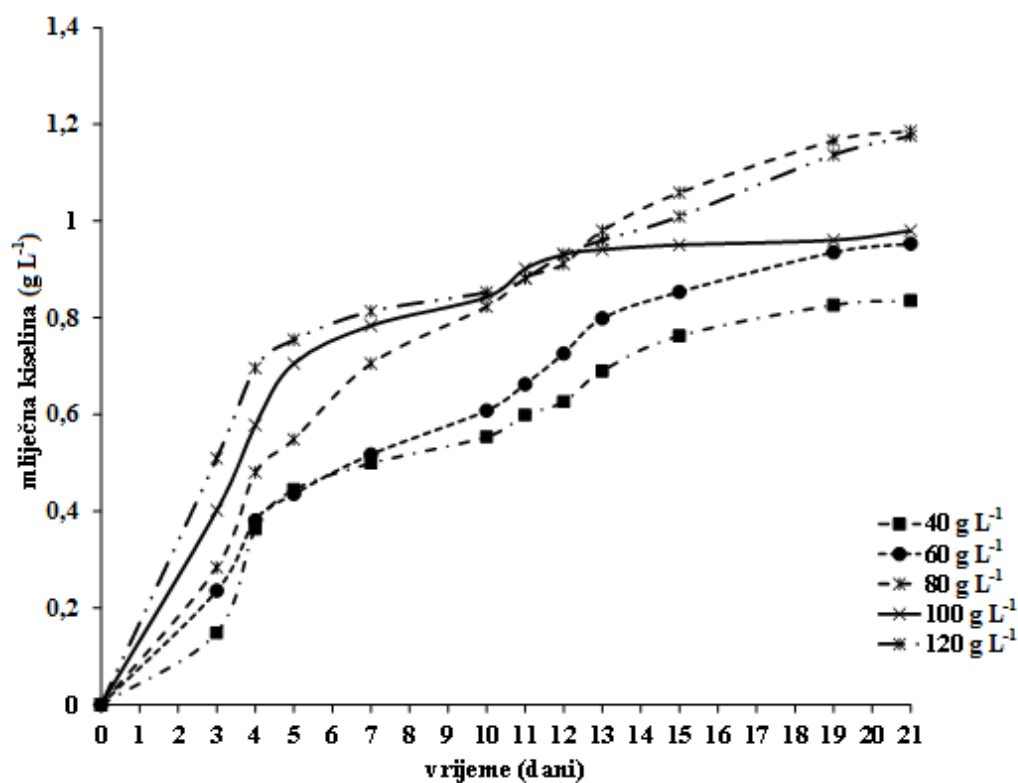


**Slika 12.** Kinetika nastajanja glukonske kiseline tijekom 21 dana fermentacije *kombucha* soka od borovnica

#### 4.1.2.3. Mliječna kiselina

Uzorci naciepljeni *kombuchom* uzgojeni su u statičnoj kulturi, pri čemu nije bio određivan mikrobiološki sastav starter kulture. Upravo zbog ovog razloga postoji određeno odstupanje između dobivenih rezultata u ovom istraživanju i objavljenih u literaturi, kao posljedica različitosti mikroflore koja je dio ekološkog izvorišta naciepljenih kultura. Nastajanje mliječne kiseline posljedica je metabolizma bakterija mliječne kiseline, koje su u malom broju sastavni dio *kombuche*, i vrlo je značajna zbog svog inhibicijskog djelovanja na patogene mikroorganizme i vrste koje izazivaju kvarenje namirnica (Magalhaes i sur., 2010).

L-mliječna kiselina nije karakterističan sastojak *kombucha* napitaka, ali je istraživanjima potvrđena u malim koncentracijama (Jayabalan i sur., 2007). Navedeni autori su određivali koncentraciju mliječne kiseline u infuzijama zelenog i crnog čaja i odredili maksimalnu vrijednost od  $0,54 \text{ g L}^{-1}$  u 3. danu fermentacije. Malbaša i sur. (2008) su istraživanja proveli na melasi kao kompleksnoj hranjivoj podlozi i izmjerili veće udjele mliječne kiseline u fermentiranom proizvodu. Ovakav rezultat su objasnili s malom koncentracijom mliječne kiseline već prisutne u melasi, kao i amino dušikom i biotinom iz melase, koji kao izvor dušika i faktor rasta utječu na intenzitet fermentacije *kombucha* proizvoda (Malbaša i sur., 2008). U ovom je radu određena relativno visoka koncentracija mliječne kiseline u svim uzorcima nakon 21 dan fermentacije (od  $0,84 \text{ g L}^{-1}$  do  $1,19 \text{ g L}^{-1}$ ). Niske koncentracije određene su u početnim danima fermentacije i ta se koncentracija povećavala nakon 5. dana istraživanja i rasla sve do 19. dana, nakon čega se nije mijenjala (slika 13).



**Slika 13.** Kinetika nastajanja mliječne kiseline tijekom 21 dana fermentacije *kombucha* soka od borovnica

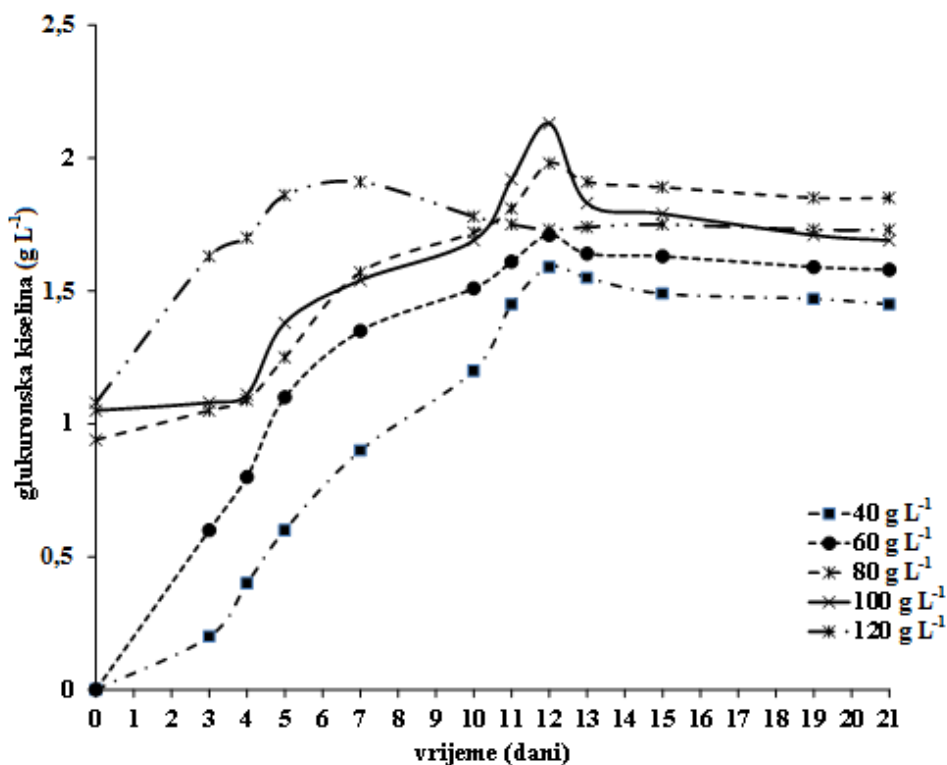
#### 4.1.2.4. Glukuronska kiselina

Glukuronska kiselina ima važnu ulogu u detoksifikaciji jetre jer može reagirati s toksičnim molekulama i pospješiti njihovo uklanjanje iz organizma (Martinez Leal i sur., 2018).

Također je povezana s uklanjanjem endobiotika putem glukonoridacije. Jedan od tih endobiotika je bilirubin, a glukuronska kiselina usporava njegove toksične učinke na različite enzime uključene u metabolizam proteina i ugljikohidrata. Većina se bilirubina izlučuje putem žuči, a samo se mali udjel konjugiranih bilirubina izlučuje urinom. Zbog toga je visoka koncentracija bilirubina u urinu indikator za smanjenu sposobnost glukonoridacije (Vīna i sur., 2013). Istraživanja su pokazala da glukuronska kiselina, kao i druge organske kiseline iz *kombucha* napitaka imaju istu ulogu u organizmu, kao i prirodno prisutne u ljudskom tijelu (Martinez Leal i sur., 2018). Koncentracija glukuronske kiseline u *kombucha* napitcima prvenstveno ovisi o vrstama bakterija i kvasaca koji djeluju simbiotički, što znači da se razlikuje u pojedinim starter kulturama, posebice kad se radi o združenim kulturama koje se koriste u domaćinstvima (Greenwalt i sur., 2000).

Na slici 14 prikazana je kinetika nastajanja glukuronske kiseline tijekom 21 dan fermentacije soka od borovnica s *kombucha* starter kulturom. Vidljivo je da su pri niskim koncentracijama dodane saharoze (40 i 60 g L<sup>-1</sup>), linearno, no dosta sporo rasle koncentracije glukuronske kiseline, sve do najveće vrijednosti u 12. danu (1,59 g L<sup>-1</sup> i 1,71 g L<sup>-1</sup>), nakon čega je uslijedio blagi pad izmjerenih vrijednosti koji je nastavljen do završetka fermentacije (1,45 g L<sup>-1</sup> i 1,58 g L<sup>-1</sup>). Kod većih koncentracija dodane saharoze, posebice kod 80 i 100 g L<sup>-1</sup>, izmjerena koncentracija glukuronske kiseline je u 12. danu bila 1,98 g L<sup>-1</sup> i 2,13 g L<sup>-1</sup>, nakon čega je zabilježeno naglo smanjenje vrijednosti. Pri koncentraciji od 120 g L<sup>-1</sup>, najveća je vrijednost izmjerena već u 7. danu, 1,91 g L<sup>-1</sup>, nakon čega je vrijednost naglo padala sve do 12. dana i zadržala se na 1,73 g L<sup>-1</sup> do kraja fermentacije. Dobiveni rezultati se mogu usporediti s rezultatima Jayabalan i sur. (2007), koji su izmjerili u 12. danu fermentacije crnog čaja vrijednost glukuronske kiseline od 2,33 g L<sup>-1</sup>. U drugim istraživanjima koja su provedena tijekom 10 do 14 dana fermentacije, izmjerene su puno manje vrijednosti glukuronske kiseline (od 0,025 do 0,063 g L<sup>-1</sup>) (Neffe-Skocinska i sur., 2017). Nguyen i sur. (2015) su nakon fermentacije pri 28 °C / 7 dana izmjerili vrijednost od 0,1 g L<sup>-1</sup>. Najdužu fermentaciju su proveli Chen i Liu (2000), 60 dana na 24 °C i izmjerili koncentraciju glukuronske kiseline od čak 39 g L<sup>-1</sup>. Sva su ova istraživanja provedena fermentacijom zelenog i crnog čaja i ne postoje literaturni podaci o koncentraciji glukuronske kiseline nakon fermentacije voćnih sokova s *kombuchom*. Isto tako, ovakve razlike u rezultatima mogle bi biti povezane sa sastavom simbiotičke *kombucha* starter kulture, posebice kad se istraživanja provode s kulturom nepoznatog sastava i udjela mikroorganizama.



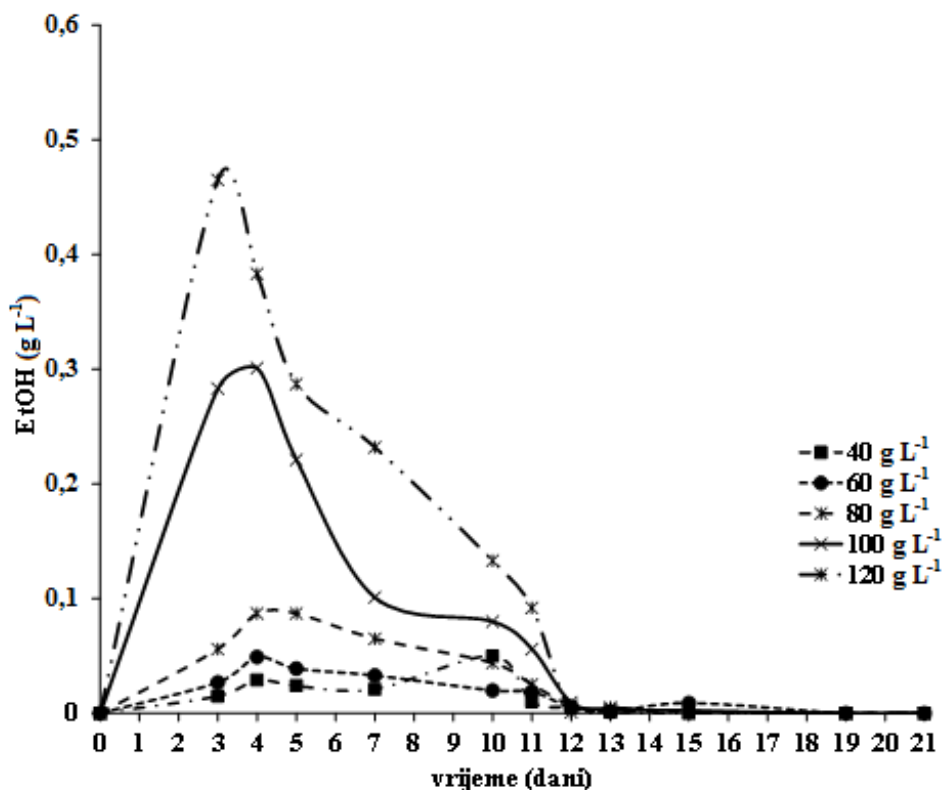


**Slika 14.** Kinetika nastajanja glukuronske kiseline tijekom 12 dana fermentacije *kombucha* soka od borovnica

#### 4.1.3. Koncentracija etanola

Prema većini autora, koncentracija etanola u *kombucha* napitcima nije veća od 1 % (vol/vol) (Teoh i sur., 2004). Sievers i sur. (1995) su nakon 10 dana fermentacije izmjerili 0,36 g L<sup>-1</sup> EtOH, uz početnih 70 g L<sup>-1</sup> saharoze u hranjivoj podlozi. U ovom radu je u sok od borovnica dodano 40, 60, 80, 100 i 120 g L<sup>-1</sup> saharoze (konzumni bijeli šećer) i već u 3. danu fermentacije, izmjerena je maksimalna koncentracija etanola, 0,465 g L<sup>-1</sup> (120 g L<sup>-1</sup> saharoze), koja se u 11. danu smanjila na 0,09 g L<sup>-1</sup>, a nakon toga pala na 0,001 g L<sup>-1</sup> i nije se mijenjala do kraja fermentacije (slika 15). Pri drugim koncentracijama saharoze maksimalna vrijednost je izmjerena u 4. danu fermentacije, no uočen je ujednačen usporedni pad vrijednosti etanola nakon postizanja maksimalnih vrijednosti (slika 15). Tako je pri koncentraciji saharoze od 100 g L<sup>-1</sup>, u 4. danu izmjereno 0,301 g L<sup>-1</sup>, a kod 40, 60, i 80 g L<sup>-1</sup> izmjerene vrijednosti su bile 0,029 g L<sup>-1</sup>, 0,049 g L<sup>-1</sup> i 0,087 g L<sup>-1</sup>. Pri višim koncentracijama saharoze uočen je nagli pad koncentracije etanola nakon postizanja maksimalne vrijednosti, dok je kod nižih koncentracija saharoze smanjenje koncentracije etanola imalo blažu krivulju, no u svim

uzorcima je minimalna vrijednost koncentracije etanola izmjerena u 12. danu i nije se mijenjala do kraja (21. dan) fermentacije (slika 15).

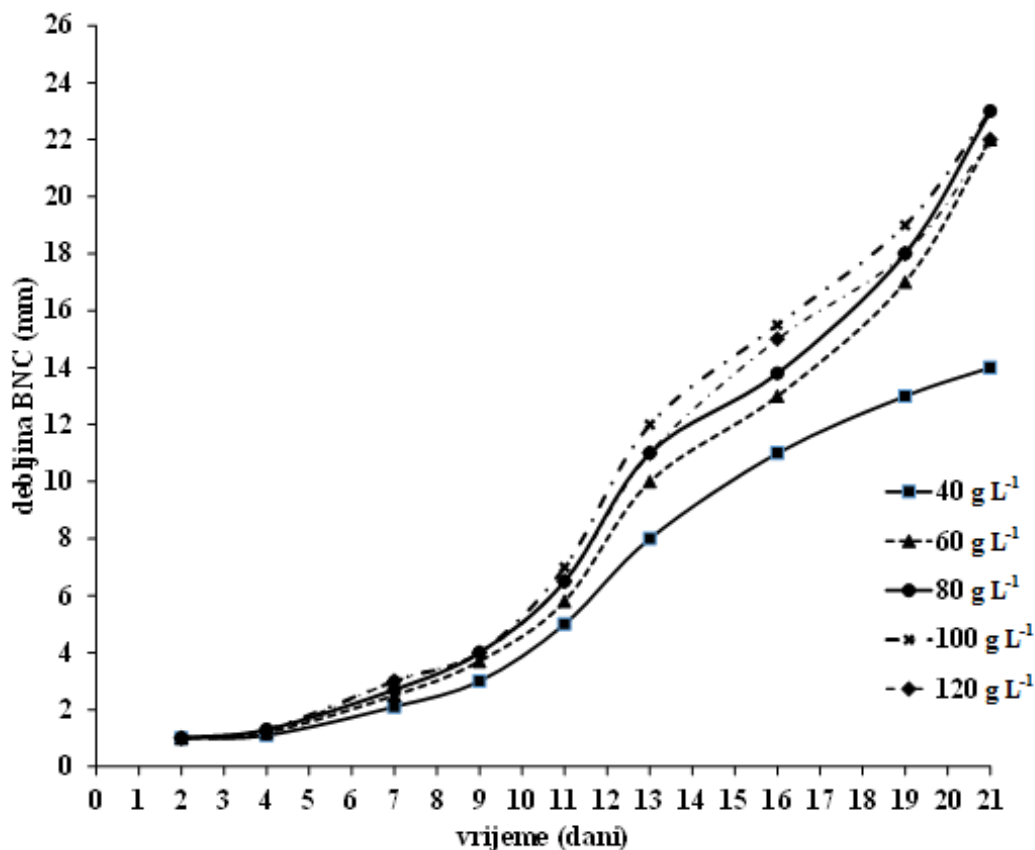


**Slika 15.** Promjena koncentracije etanola tijekom 21 dana fermentacije *kombucha* soka od borovnica

#### 4.2. BIOSINTEZA I PRINOS BAKTERIJSKE NANOCELULOZE (BNC)

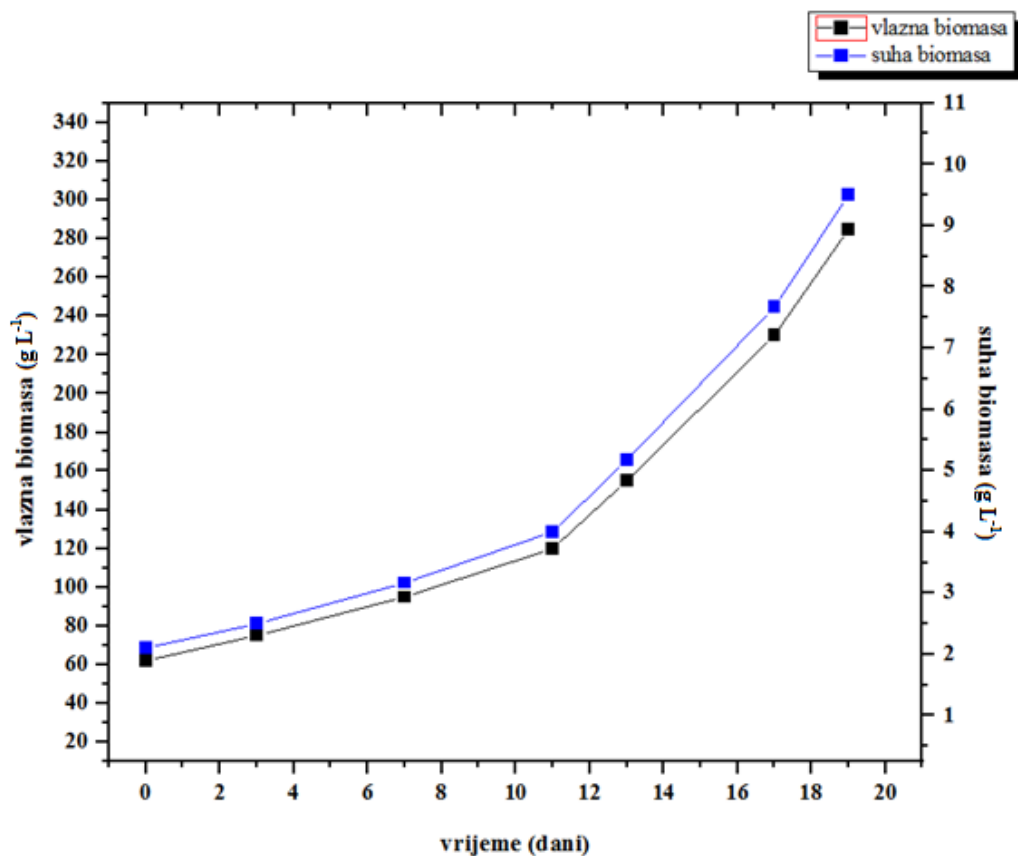
Biosinteza BNC je precizan proces reguliran mnogobrojnim enzimima i regulatornim proteinima (Tal i sur., 1998). Vezana je uz kataboličke reakcije i ne ometa anaboličke reakcije u stanici, uključujući sintezu proteina. Bakterija *G. xylinus* koristi pentoza fosfatni put i ciklus limunske kiseline za sintezu BNC i energije (Tonouchi i sur., 1996). BNC se može sintetizirati u statičnim uvjetima uzgoja, na tresilici ili uz miješanje, no svaki od ovih postupaka rezultira različitim oblicima celuloznih, međusobno isprepletenih fibrila, dok se pri uzgoju na tresilici ili u reaktoru s miješalom sintetiziraju kuglice ili pelati nepravilnog oblika (Tanskul i sur., 2013). Proces sinteze BNC u statičnim uvjetima, kao što je provedeno u ovom radu, ovisi o opskrbi atmosferskim kisikom na površini, a prinos o koncentraciji izvora ugljika. Produženim vremenom uzgoja, povećava se prinos BNC, a sinteza doseže svoju krajnju granicu kada pelikula pada na dno hranjive podloge, pri čemu bakterije octene kiseline postaju inaktivne zbog nedovoljne opskrbe kisikom (Sheykhnazari i sur., 2011).

Biotransformacijom zaslađenog soka od borovnica tijekom fermentacije s *kombuchom* nastala je celulozna pelikula (opna) koja se u tankom sloju oblikovala na površini tekućine (slika 16). Celuloznu pelikulu na površini održava CO<sub>2</sub> koji nastaje kao posljedica fermentativne aktivnosti kvasaca (Sievers i sur., 1995). Na površini celulozne pelikule nalazi se veliki broj bakterija octene kiseline, striktnih aeroba, kojima je za rast i razmnožavanje nužan atmosferski kisik, dok su s donje strane nakupine kvasaca, koji pripadaju fakultativno anaerobnim mikroorganizmima (Malbaša i sur., 2008; Sievers i sur., 1995).



**Slika 16.** Kinetika sinteze BNC u soku od borovnice tijekom fermentacije s *kombuchom*

Na slici 17. prikazana je kinetika sinteze BNC iz koje je vidljivo linearno povećanje debljine BNC sintetizirane tijekom 21 dana uzgoja. Prema dobivenim rezultatima, kod 80 g L<sup>-1</sup> dodane saharoze je nakon 21. dana fermentacije izmjereno 284 g L<sup>-1</sup> vlažne BNC, odnosno 9,8 g L<sup>-1</sup> suhe BNC.



**Slika 17.** Utjecaj trajanja fermentacije na sintezu BNC u soku od borovnice (80 g L<sup>-1</sup> saharoze)

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

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

Tijekom statične fermentacije *kombuche*, bakterijska celulozna pelikula se sintetizira na međufazi zraka i tekuće faze, te postaje vidljiva već nakon 24 h fermentacije kao prozirna opna (Iguchi i sur., 2000). Svakim se danom fermentacije stvara novi sloj bakterijske

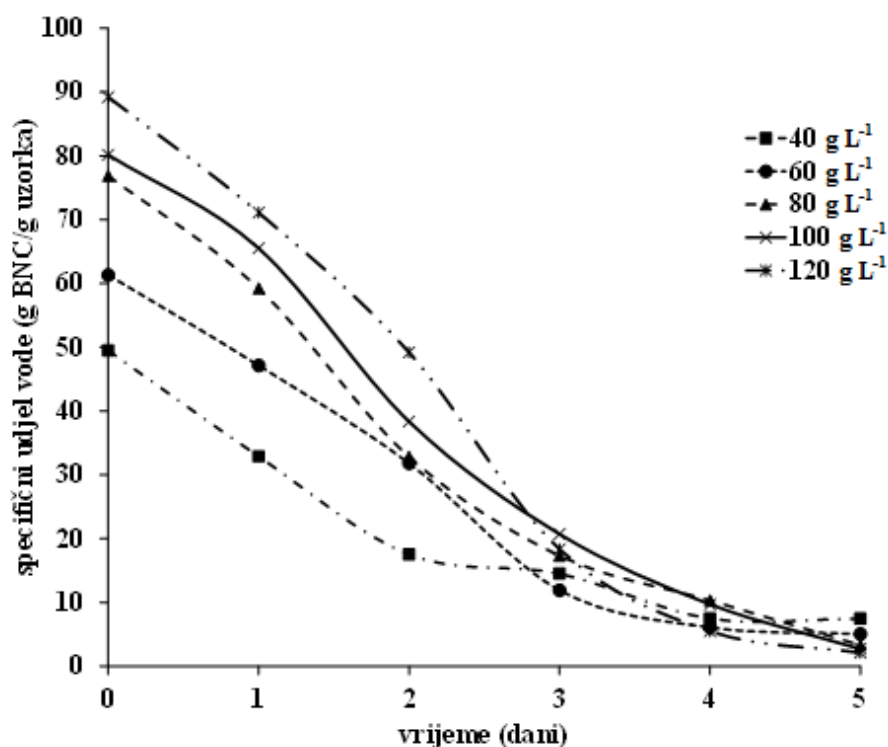
celuloze, no brzina stvaranja ovisi o površini i dubini posude u kojem je provedena fermentacija čaja s *kombuchom*. U ovom su radu provedena istraživanja u kojoj mjeri površina posude za uzgoj i dubina hranjive podloge utječu na kinetiku nastajanja bakterijske celuloze, upravo zbog toga što sintetizirana bakterijska celuloza poprima oblik posude u kojoj se uzgaja. Fermentacija *kombuche* u soku od borovnica je provedena u 3 staklene posude (P1-P3) koje su se razlikovale po svom volumenu, visini i promjeru (tablica 1). Prema dobivenim rezultatima, iz tablice 1 je vidljivo da, ovisno o specifičnoj površini sintetizirane bakterijske celuloze, rezultati kapaciteta zadržavanja vode variraju, ali ne u značajnoj mjeri. Matriks BNC se sastoji od isprepletenih vlakana u kojima su molekule vode „zarobljene“ fizički i na površini i u unutrašnjosti (Watanabe i sur., 1998). Prema autorima, što je više slobodnog prostora između vlakana, to će više molekula vode moći ući i adsorbirati se u matriksu. Dakle, što je veća specifična površina, više vode će se moći zadržati u matriksu bakterijske celuloze (Guo i Catchmark, 2012). Rezultati dobiveni u ovom radu pokazali su da je i na manjoj specifičnoj površini BNC ( $1,35 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ ) postignut vrlo visok kapacitet zadržavanja vode (WHC) (tablica 1).

**Tablica 1.** Kapacitet zadržavanja vode u bakterijskoj nanocelulozi (BNC) ovisno o specifičnoj površini posuda u kojima je proveden uzgoj ( $80 \text{ g L}^{-1}$  saharoze)

Uzorak	Masa vlažne BNC (g)	Specifična površina BNC ( $\text{cm}^2 \text{ g}^{-1}$ )	WHC (g vode $\text{g}^{-1}$ uzorka)
P1 (720 mL)	150	1,79	109,63
P2 (370 mL)	120	1,35	91,84
P3 (1000 mL)	200	1,68	100,36

Sposobnost otpuštanja vode drugo je izrazito važno svojstvo BNC za primjenu u biomedicini kao pokrovnog materijala na ranama. Na slici 18 je prikazana kinetika otpuštanja vode iz uzoraka sintetiziranih tijekom 120 sati pokusa. Vidljivo je da je izmjereni specifični udjel vode od početka uzgoja bio najveći u uzorku s  $120 \text{ g L}^{-1}$  saharoze, a najmanja vrijednost je izmjerena u uzorku s  $40 \text{ g L}^{-1}$  saharoze. Otpuštanje vode je do 3. dana istraživanja bilo naglo što je i vidljivo iz slike 18, i u svim su uzorcima, bez obzira na početnu vrijednost apsorbirane vode, zabilježeni vrlo niski specifični udjeli vode (od 11,91 do 20,71 g BNC / g uzorka), što znači da je preostalo od 9 do 19 % vezane vode u matriksu pelikula. Vrijednosti su nastavile

blago padati i ustalile su se u 5. danu istraživanja, gdje je u svim uzorcima izmjereno prosječno 4 % zadržane vode u uzorcima.



**Slika 18.** Kinetika otpuštanja vode (WRR) tijekom 120 sati iz uzoraka BNC nakon 21 dana fermentacije u soku od borovnica

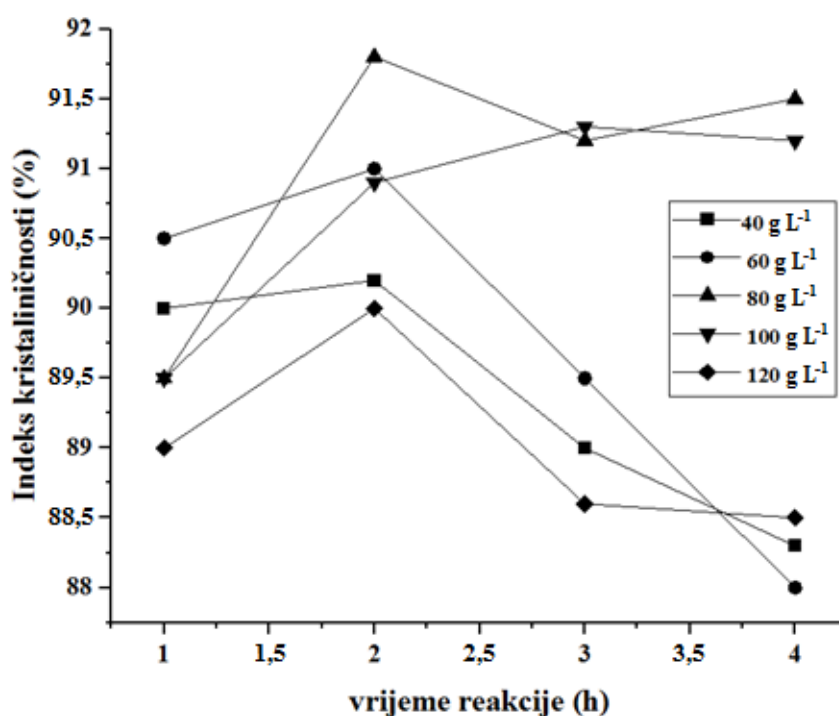
#### 4.4. KRISTALINIČNOST I MORFOLOGIJA POVRŠINE BAKTERIJSKE NANOCELULOZE (BNC)

Celuloza je linearni polimer sastavljen od jedinica D-glukoze vezanih  $\beta$ -1,4-glikozidnim vezama. Hidroksilne grupe u celuloznim makromolekulama povezane su brojnim intra- i intermolekulskim vodikovim vezama, što rezultira različitim stupnjevima kristalinične uređenosti. Kristalinična struktura celuloze proučavana je od 19. stoljeća (Park i sur., 2010) i do sadašnjeg vremena pobuđuje pojačanu pažnju zbog potencijalne primjene u proizvodnji bioenergije. Najčešće metode kojima se istražuje kristaliničnost su difrakcija X-zrakama, FT-IR spektroskopija, <sup>13</sup>C NMR i test s jodnim brojem za koji nije potrebna posebna oprema i uvijek predstavlja preliminarnu analizu prije uporabe skupih uređaja. U ovom radu su korištene dvije metode određivanja kristaliničnosti: test s jodnim brojem i FT-IR spektroskopija.

#### 4.4.1. Kristaliničnost BNC

Kristaliničnost je jedno od najvažnijih svojstava strukture BNC zbog koje 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, sastavu 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 koje ekstracelularno izlučuju nanofibrile celuloze i o kojima ovisi  $I_{\alpha}/I_{\beta}$  odnos (Son i sur., 2001). BNC je bogata  $I_{\alpha}$  tipom celuloze, s udjelom od oko 70-80 %, dok je  $I_{\beta}$  tip celuloze u istom omjeru zastupljen u višim biljkama (Czaja i sur., 2007).

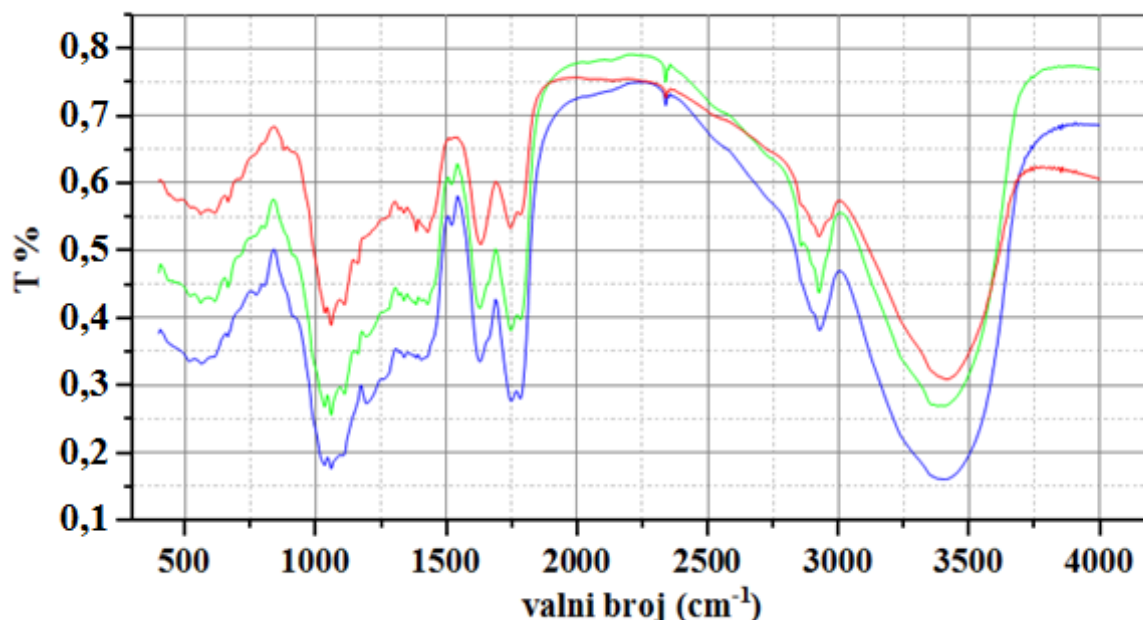
Test s jodnim brojem je osnovna empirijska metoda za mjerenje pristupačnosti amorfnih dijelova celuloze prema vodenim otopinama. S obzirom da se jod ugrađuje u amorfne dijelove molekule BNC, inverzna vrijednost jodnog broja je razmjerna kristaliničnim dijelovima celuloze i izražava se kao indeks kristaliničnosti (Kreze i sur., 2005). Indeks kristaliničnosti BNC uzgojene u soku od borovnica prikazan je na slici 19. Dobiveni rezultati pokazuju da kristaliničnost bakterijske celuloze varira ovisno o koncentraciji dodane saharoze u podlogu. Prema dobivenim rezultatima je vidljivo da je struktura BNC vrlo kristalinična (uređena; od 91,7 do 88 % područja) i da ima mali udjel amorfnih, odnosno ne uređenih područja (slika 19).



**Slika 19.** Kristaliničnost uzgojenih BNC pelikula u soku od borovnica

#### 4.4.2. FT-IR spektroskopska analiza

Jedna od najvažnijih analitičkih tehnika za karakterizaciju polimera je infracrvena spektroskopija (IR). Slično otisku prsta koji je karakterističan za pojedinu osobu, FT-IR je visoko specifična analiza karakteristična za supstanciju koja je analizirana. Glavna prednost ove tehnike je mogućnost testiranja uzoraka u bilo kojem obliku (tekućine, paste, otopine, filmovi, prahovi, vlakna). IR spektroskopija je tehnika koja se temelji na vibracijama atoma u molekuli. Infracrveni spektar se dobiva prolaskom infracrvenih zraka kroz uzorak i određivanjem frakcije koja je apsorbirana pri određenoj energiji. Energija pri kojoj se očitava pojedini pik u apsorpcijskom spektru, odgovara frekvenciji vibracija dijela molekule uzorka. FT-IR analiza omogućava istraživačima dodatne informacije o super-molekularnoj strukturi i može se, također, koristiti za određivanje kemijskog sastava prirodnih i modificiranih vlakana. C-O-C vibracije pojavljuju se na valnim duljinama blizu  $1600$  i  $900\text{ cm}^{-1}$ , O-H na  $3500$  do  $3300\text{ cm}^{-1}$ , a C-H vibracije se pojavljuju između  $1430$  i  $1290\text{ cm}^{-1}$ . Na slici 20 prikazani su spektri karakteristični za celulozu sintetiziranu pri različitim koncentracijama dodanog šećera ( $80$ ,  $100$  i  $120\text{ g L}^{-1}$ ), s izraženim pikovima kod  $3400$ ,  $2880$  i  $1110\text{ cm}^{-1}$ . Ovi su pikovi rezultat vibracija O-H, C-H i C-O-C grupa u celuloznoj strukturi (slika 20), što ukazuje na pretežito kristaličnu strukturu BNC i u skladu je s istraživanjima koje su proveli Chen i sur. (2010).

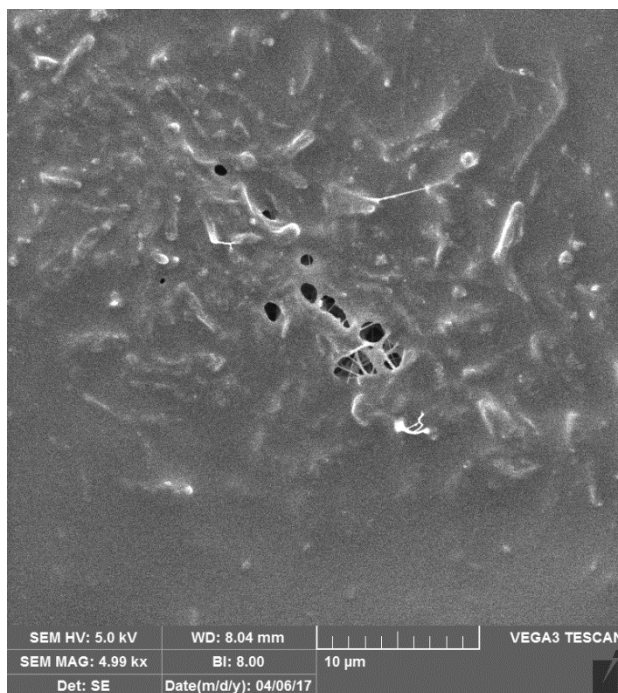


**Slika 20.** FT-IR spektri BNC sintetizirane u soku od borovnica s različitim koncentracijama dodane saharoze:  $80\text{ g L}^{-1}$  (crveno),  $100\text{ g L}^{-1}$  (zeleno),  $120\text{ g L}^{-1}$  (plavo)

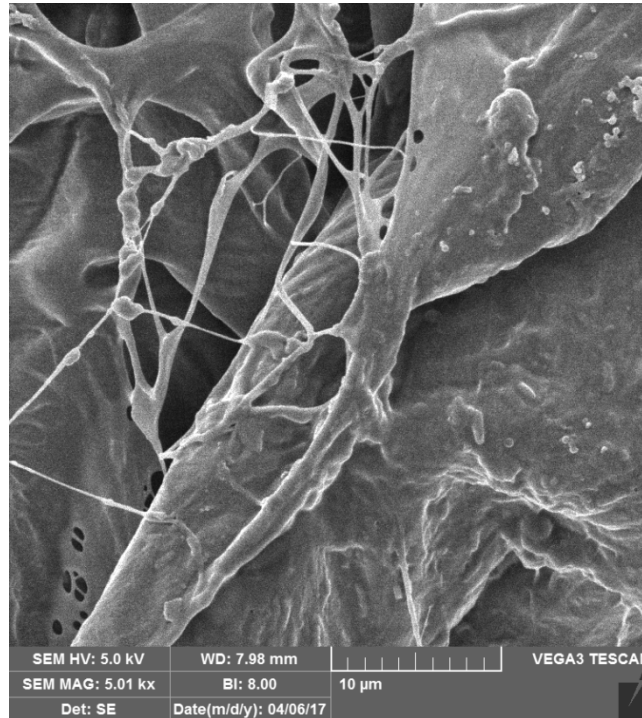


#### 4.4.3. Pretražna elektronska mikroskopija (*eng.* SEM)

Morfologija površine pekule s prisutnim bakterijama octene kiseline i kvascima i struktura mikrovlakana BNC snimane su pretražnim elektronskim mikroskopom (slike 21 i 22). Na slici 21 su vidljive stanice bakterija i kvasaca na površini pelikule BNC, a na slici 22 isprepletenost mikrovlakana u mreži sintetizirane BNC na kraju fermentacije. Bakterije i kvasci (u manjem broju) su nakupljeni u strukturi pelikule u tankom sloju biofilma. Na slici 21 je vidljivo da su bakterije octene kiseline dominantne, odnosno prisutne u većem broju, što je u suglasju s istraživanjima koje su proveli El-Gremi (2007) i El-Taher (2011). Općenito, brzina sinteze BNC je razmjerna s koncentracijom stanica bakterija octene kiseline. Na slici 22 se može uočiti trodimenzijska porozna mrežna struktura koja se sastoji od nasumično isprepletenih snopova ultratankih fibrila. Ovakva mreža ima svoju hijerarhijsku strukturu s porama različitih veličina, od makro do mikro vrijednosti (Schutz i sur., 2012). Saxena i sur. (1994) su uočili da je biosinteza celuloze karakterizirana jednosmjernom ekstruzijom nanofibrila i naknadnom kristalizacijom. Pojedini fibrili u strukturi istraživane BNC u ovom radu su imali prosječnu debljinu od  $18 \pm 2$  nm (slika 22).



**Slika 21.** SEM snimka površine bakterijske nanoceluloze (BNC) nakon 21 dan uzgoja u soku od borovnica ( $80 \text{ g L}^{-1}$  saharoze)

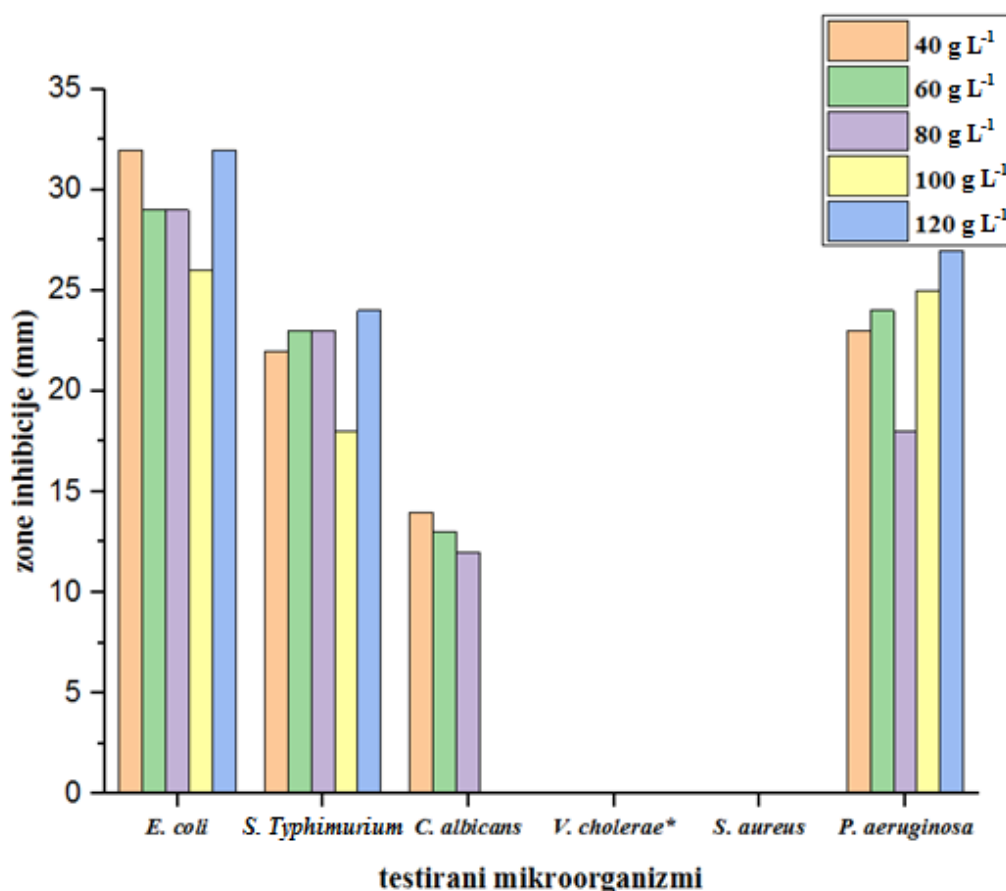


**Slika 22.** SEM snimka mreže mikrovlakana bakterijske nanoceluloze (BNC) nakon 21 dan uzgoja u soku od borovnica ( $80 \text{ g L}^{-1}$  saharoze)

#### 4.5. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST FERMENTIRANOG *KOMBUCHA* SOKA OD BOROVNICA

Enterobakterije predstavljaju veliku heterogenu skupinu gram-negativnih štapića koji ne stvaraju spore, fakultativni su anaerobi i dobro preživljavaju u nepovoljnim uvjetima. Komenzali su probavnog sustava čovjeka i mnogih životinjskih vrsta. Uz stafilokoke i streptokoke spadaju u bakterije koje najčešće uzrokuju bolest u ljudi. U probavnom sustavu čovjeka čine samo 1-2 % ukupne normalne crijevne flore, a ostalo su uglavnom endogeni anaerobi (Kalenić i sur., 2013). Patogene vrste predstavljaju enterotoksikogene *Escherichia coli*, *Vibrio* sp., *Campylobacter jejuni*, *Shigella* sp. i *Salmonella Typhimurium* koje izazivaju akutni gastroenteritis (Battikh i sur., 2013). Prema Battikh i sur. (2013), antimikrobna aktivnost fermentiranog zelenog i crnog čaja s *kombuchom* nije bila samo rezultat udjela octene kiseline ili drugih organskih kiselina određenih u napitcima, nego i drugih biološki aktivnih sastojaka, kao što su bakteriocini, proteini i enzimi, kao i fenolni spojevi. U ovom radu je istraživana antimikrobna aktivnost fermentiranog soka od borivnica, u kojem su određene zadovoljavajuće koncentracije octene, glukonske, mliječne i glukuronske kiseline, no nisu određivane koncentracije polifenolnih spojeva, ali je poznato da je bobičasto voće izrazito bogato polifenolnim sastojcima (Pawar, 2018). Antimikrobna aktivnost fermentiranog

soka od borovnica s *kombuchom* ispitivana je na šest testnih mikroorganizama: bakterije vrsta *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*., *Staphylococcus aureus* i *Vibrio cholerae*, te kvascem *C. albicans*. Rezultati prikazani na slici 23 pokazali su izvrsno antimikrobno djelovanje prema bakteriji *E. coli* (> 30 mm) i vrlo dobro djelovanje na *S. Typhimurium* (> 20 mm) i *Pseudomonas aeruginosa*. (> 25 mm), dok prema *S. aureus* nisu zabilježene zone inhibicije. Antimikrobnim djelovanjem prema *V. cholerae* uočene su zamućene zone inhibicije bez jasnih granica, a jedini istraživani kvasac, *C. albicans* je inhibiran dobro (> 13 mm). Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je dvostruko veća antimikrobna aktivnost postignuta prema istraživanim bakterijama, nego prema kvascu *C. albicans*. Također je uočeno da je fermentirani sok od borovnica, pripremljen uz dodatak 100 g L<sup>-1</sup> saharoze imao najmanje antimikrobno djelovanje, osim na *Pseudomonas aeruginosa* (slika 23).



**Slika 23.** Antimikrobna aktivnost fermentiranog *kombucha* soka od borovnica s različitim koncentracijama dodane saharoze. *V. cholerae*\* - blago zamućenje, bez jasno vidljivih granica zona inhibicije

## 5. ZAKLJUČCI

1. *Kombucha* je nutritivno vrijedni napitak vrlo složenog kemijskog sastava, a glavni proizvodi koji nastaju kao posljedica biotransformacije su organske kiseline i mali udjel etanola, te bakterijska nanoceluloza (BNC), koja se u obliku tanke pelikule svakodnevno sintetizira na površini napitka.
2. Fermentacija *kombuche* provedena je u statičnim uvjetima tijekom 21 dana pri 24 °C u kompleksnoj podlozi (sok od borovnica) s dodatkom 40, 60, 80, 100 i 120 g L<sup>-1</sup> saharoze kao jedinim izvorom ugljika.
3. Tijekom 21 dana fermentacije, istraživane su koncentracije nastalih organskih kiselina i etanola s komercijalnom kulturom *kombuche*. U svim istraživanim uzorcima je najveća koncentracija organskih kiselina, osim octene kiseline, izmjerena u 12. danu fermentacije. Snižavanje pH vrijednosti i koncentracije etanola tijekom fermentacije bilo je u korelaciji s povećanjem koncentracije octene kiseline.
4. Najveći prinos vlažne BNC nakon 21 dana fermentacije bio je 284 g L<sup>-1</sup> u uzorcima s 80 g L<sup>-1</sup> saharoze.
5. FT-IR analizom potvrđena je vrlo kristalinična struktura BNC (od 91,7 do 88 % područja), uz mali udjel amorfnih područja. SEM mikroskopijom je uočeno da su pojedini fibrili u strukturi istraživane BNC u ovom radu imali prosječnu debljinu od 18 ± 2 nm.
6. Sposobnost bakterijske celuloze da apsorbira ili otpusti velike količine vode izričito je ovisna o strukturnim značajkama BNC, posebice o poroznosti strukture. Rezultati dobiveni u ovom radu pokazali su da je na relativno maloj specifičnoj površini BNC (1,35 cm<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) postignut vrlo visok kapacitet zadržavanja vode. U svim su uzorcima, bez obzira na početnu vrijednost apsorbirane vode, zabilježeni vrlo niski specifični udjeli vode (od 11,91 do 20,71 g BNC / g uzorka).
7. Antimikrobna aktivnost ispitivana je mjerenjem zona inhibicije rasta bakterija *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa.*, *Staphylococcus aureus* i *Vibrio cholerae*, te kvascem *C. albicans*. Fermentirani napitak pokazao je izvrsnu antimikrobnu aktivnost prema četiri bakterijske vrste i kvascu, no rast vrsta *V. cholerae* i *S. aureus* nije bio inhibiran.

## 6. LITERATURA

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

Battikh, H., Chaieb, K., Bakhrouf, A., Ammar, E. (2013) Antimicrobial and antifungal activities of black and green kombucha teas. *J. Food Biochem.* **37**, 231-236.

Bode, A. M., Dong, Z. (2003) Signal transduction pathways: targets for green and black tea polyphenols, *J Biochem Mol Biol.* **36**, 66–77.

Brown, R. M. (1996) The biosynthesis of cellulose. *J. Macromol. Sci. A.* **33**, 1345-1373.

Brown, R. M. (2004) Cellulose structure and biosynthesis: what is in store for the 21st century? *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **42**, 487–495.

Brown, C., Leijon, F., Bulone, V. (2012) Radiometric and spectrophotometric in vitro assays of glycosyl transferases involved in plant cell wall carbohydrate biosynthesis. *Nat. Protoc.* **7**, 1634–1650.

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

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

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

Chau, C. F., Yang, P, Yu, C. M., Yen, G. C. (2008) Investigation on the lipid and cholesterol lowering abilities of biocellulose. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 2291–2295.

- Chawla, P. R., Bajaj, I. B., Survase, S. A., Singhal., R. S. (2009) Microbial Cellulose. Fermentative Production and Applications. *Food Technol. Biotechnol.* **47**, 107-112.
- Chen, C., Liu, B. Y. (2000) Changes in major components of tea fungus metanolites during prolonged fermentation. *J. Appl. Microbiol.* **89**, 834-839.
- Chen, P., Cho, S. Y., Jin, H. J. (2010) Modification and applications of bacterial celluloses in polymer science. *Macromol. Res.* **18**, 309–320.
- Chu, S., Chen, C. (2006) Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of *Kombucha*. *Food Chem.* **98**, 502–507.
- Colvin, J. R. (1980) The biosynthesis of cellulose: Plant biochemistry, Academic Press Inc., New York, 543-570.
- Conney, A. H., Lu, Y. P., Lou, Y. R., Huang, M. T. (2002) Inhibitory effects of tea and caffeine on UV-induced carcinogenesis: relationship to enhanced apoptosis and decreased tissue fat. *Eur. J. Cancer Prev.* **2**, 28–36.
- Cretović, D., Markov, S., Djurić, M., Savić, D., Velićanski., A. (2008) Specific interfacial area as a key variable in scaling-up *Kombucha* fermentation. *J. Food Eng.* **85**, 387–392.
- Czaja, W. K., Young, D. J., Kawecki, M., Brown, R. M. (2007) The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules* **8**, 1–12.
- Dahman, Y. (2009) Nanostructured biomaterials and biocomposites from bacterial cellulose nanofibers. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **9**, 5105–5122.
- Dahman, Y., Jayasuriya, K. E., Kalis, M. (2010) Potential of biocellulose nanofibers production from agricultural renewable resources: Preliminary study. *Appl. Biochem. Biotech.* **162**, 1647–1659.

Deghrigue, M., Chriaa, J., Battikh, H., Abid, K., Bakhrouf, A. (2013) Antiproliferative and antimicrobial activities of Kombucha tea. *Afr. J. Microbiol. Res.* **7**, 3466–3470.

Dourado, O. Q. F., Gama, F. M., Rodrigues, A. C. (2017) A review on the toxicity and dietetic role of bacterial cellulose. *Toxicol. reports* **4**, 543-553.

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

El-Gremi, S. M. A. (2007) Kombucha in Egypt: Imported and local induced cultures. 12th Conference of Microbiology. Cairo, Egypt, 18-20 March, pp. 239-247.

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

El-Taher, E. M. (2011) kombucha: A new microbial phenomenon and industrial benefits. *African J. Biol. Sci.* **7(2)**, 41-60.

Frensemeier, M., Koplin, C., Jaeger, R., Kramer, F., Klemm, D. (2010) Mechanical properties of bacterially synthesized nanocellulose hydrogels. *Macromol. Symp.* **294**, 38–44.

Gao, X., Shi, Z., Liu, C., Yang, G., Sevostianov, I., Silberschmidt, V. V. (2015) Inelastic behaviour of bacterial cellulose hydrogel: in aqua cyclic tests. *J. Polym. Test.* **44**, 82–92.

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

Giudici, P., Gullo, M., Solieri, L. (2009) Traditional balsamic vinegar. U: Vinegars of the world. (Giudici, P., Solieri, L., ured.), Springer, Milan, str. 157–177.

Goh, W. N., Rosmaa, A., Kaur., B., Fazilah., A., Karim, A. A., Bhat, R. (2012) Fermentation of black tea broth (Kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose. *Int. Food. Res. J.* **19**, 109-117.

Gorgieva, S., Trček, J. (2019) Bacterial Cellulose: Production, Modification and Perspectives in Biomedical Applications. *Nanomaterials*, **9**(10), 1-20.

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.

Greenwalt, C. J., Ledford, R. A., Steinkraus, K. H., (1998) Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea *Kombucha*. *LWT—Food Sci. Technol.* **31**, 291–296.

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.

Gullo, M., Mamlouk, D., De Vero, L., Giudici, P. (2012) *Acetobacter pasteurianus* strain AB0220: cultivability and phenotypic stability over 9 years of preservation. *Curr. Microbiol.* **64**, 576–580.

Gullo, M., Zanichelli, G., Verzelloni, E., Lemmetti, F., Giudici, P. (2016) Feasible acetic acid fermentations of alcoholic and sugary substrates in combined operation mode. *Process Biochem.* **51**, 1129–1139.

Gullo, M., Sola, A., Zanichelli, G., Montorsi, M., Messori, M., Giudici, P. (2017) Increased production of bacterial cellulose as starting point for scaled-up applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**, 8115–8127.

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.



Gupta, P., Diwan, B. (2017) Bacterial exopolysaccharide mediated heavy metal removal: a review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnol. Rep.* **13**, 58–71.

Habibi, Y., Lucia, L. A., Rojas, O. J. (2010) Cellulose nanocrystals: chemistry, self-assembling, and applications. *Chem. Rev.* **110**, 3479–3500.

Hasler, C. M., Bloch, A. S., Thomson, C. A. (2004) Position of the American Dietetic Association: functional foods. *J. Am. Diet Assoc.* **104**, 814–826.

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

Iguchi, M., Yamanaka, S., Budhiono, A. (2000) Bacterial cellulose – a masterpiece of nature arts. *J. Material Sci.* **35**, 261-270.

Ioannides, C., Yoxall, V. (2003) Antimutagenic activity of tea: role of polyphenols. *Curr. Opin. Clin. Nutr.* **6**, 649–656.

Jahn, C. E., Selimi, D. A., Barak, J. D., Charkowski, A. O. (2011) The *Dickeya dadantii* biofilm matrix consists of cellulose nanofibres, and is an emergent property dependent upon the type III secretion system and the cellulose synthesis operon. *Microbiology* **157**, 2733–2744.

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

Jayabalan, R., Subathradevi, P., Marimuthu, S., Sathishkumar, M., Swaminathan, K. (2008) Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food Chem.* **109**, 227–234.

Jayabalan, R., Chen, P.-N., Hsieh, Y.-S. i sur. (2011) Effect of solvent fractions of kombucha tea on viability and invasiveness of cancer cells-characterization of dimethyl 2-(2-hydroxy-2-methoxypropylidene) malonate and vitexin. *Indian J. Biotechnol.* **10**, 75–82.

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. *Comprehensive Rev. Food Sci. Food Saf.* **13**, 538-550.

Jipa, I. M., Stoica-Guzun, A., Stroescu, M. (2012) Controlled release of sorbic acid from bacterial cellulose based mono and multilayer antimicrobial films. *LWT-Food Sci. Technol.* **47**, 400–406.

Júnior, R. J. S., Batista, R. A., Rodrigues S. A., Filho L. X., Silva Lima, A. (2009) Antimicrobial activity of broth fermented with *Kombucha* colonies. *J. Microb. Biochem. Technol.* **1**, 72–78.

Kabiri, N., Setorki, M., Darabi, M. A., (2013) Protective effects of *Kombucha* tea and silimarin against thioacetamide induced hepatic injuries in wistar rats. *World Appl. Sci. J.* **27**, 524–532.

Kalenić, S., Bedenić, B., Bošnjak, Z. (2013) Enterobakterije. U: Medicinska mikrobiologija (Kalenić, S. ur.), Medicinska naklada, Zagreb, str. 182-200.

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

Keshk, S. M. (2014) Bacterial cellulose production and its industrial applications. *J. Bioprocess Biotech.* **4**(2), 1-10.

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

Koo, M. W. L., Cho, C. H. (2004) Pharmacological effects of green tea on the gastrointestinal system. *Eur. J. Pharmacol.* **500**, 177–185.

Koyama, M., Helbert, W., Imai, T., Sugiyama, J., Henrissat, B. (1997) Parallel-up structure evidences the molecular directionality during biosynthesis of bacterial cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9091–9095.

Kozyrovska, N. O., Reva, O. M., Goginyan, V. B., DeVera, J.-P. (2012) Kombucha microbiome as a probiotic: a view from the perspective of post-genomics and synthetic ecology. *Biopolym. Cell* **28**, 103–113.

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

Kumar, K. S., Sastry, N., Polaki, H., Mishra, V. (2015) Colon cancer prevention through probiotics: an over view. *J. Cancer Sci. Therapy* **7**, 81–92.

Lairson, L. L., Henrissat, B., Davies, G. J., Withers, S. G. (2008) Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 521–555.

Li, J., Kisara, K., Danielsson, S., Lindström, M. E., Gellerstedt, G. (2007) An improved methodology for the quantification of uronic acid units in xylans and other polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **342**, 1442-1449.

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

Magalhaes, K. T., Pereira, G. V. d. M., Dias, D. R., Schwan, R. F. (2010) Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 1241–1250.

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

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

- Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., Čanadanović-Brunet, J. M. (2011) Influence of starter cultures on the antioxidant activity of *kombucha* beverage. *Food. Chem.* **127**, 1727-1731.
- Mamlouk, D., Gullo, M. (2013) Acetic acid bacteria: physiology and carbon sources oxidation. *Indian J. Microbiol.* **53**, 377–384.
- Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P., Cotter, P. D. (2014) Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple *kombucha* (tea fungus) samples. *Food Microbiol.* **38**, 171-178.
- Martínez Leal, J., Valenzuela Suárez, L., Jayabalan, R., Huerta Oros, J., Escalante-Aburto, A. (2018) A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CYTA: J. Food* **16**(1), 390-399.
- Masaoka, S., Ohe, T., Naokazu, S. (1993) Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. *J. Ferment. Bioeng.* **75**, 18-22.
- McDougald, D., Rice, S. A., Barraud, N., Steinberg, P. D., Kjelleberg, S. (2012) Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 39–50.
- Moosavi-Nasab, M., Yousefi, M. (2011) Biotechnological production of cellulose by *Gluconacetobacter xylinus* from agricultural waste. *Iranian J. Biotech.* **9**, 94–101.
- Morgan, J. L., Strumillo, J., Zimmer, J. (2013) Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature* **493**, 181–186.
- Müthlethaler, K. (1949) The structure of bacterial cellulose. *Biochim. Biophys. Acta* **3**, 527-535.

- Neffe-Skocinska, K., Slonek, B., Scibilsz, I., Kolozyn-Krajewska, D. (2017) Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. *CYTA – J. Food* **15**(4), 601-607.
- Nelson, M. L., Rousselle, M.-A., Cangemi, S. J., Trouard, P. (1970) The Ionidine Sorption Test. Factors Affecting Reproducibility and a Semimicro Adaptation. *Textile Res. J.* **40**(10), 872-880.
- Ng, C.-C., Shyu, Y.-T. (2004) Development and production of cholesterol-lowering Monascus-nata complex. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 875-879.
- Nguyen, N. K., Dong, N. T. N., Le, P. H., Nguyen, H. T. (2014) Evaluation of the glucuronic acid production and other biological activities of fermented sweeten- black tea by Kombucha layer and the co-culture with different *Lactobacillus* sp. strains. *Int. J. Modern Eng. Res.* **4**, 12–17.
- Nguyen, K. N., Nguyen, P. B., Nguyen, H. T., Le, P. H. (2015) Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic bacteria strain from traditional *Kombucha* for high-level production of glucuronic acid. *LWT – Food Sci. Technol.* **64**, 1149–1155.
- Okiyama, A., Motoki, M., Yamanka, S. M. (1993) Bacterial cellulose III. Development of a new form of cellulose. *Food Hydrocoll.* **6**, 493-501.
- Osma, J. F., Toca-Herrera, J. L., Rodríguez-Couto, S. (2010) Uses of laccases in the food industry. *Enzyme Res.* **918761**, 1–8.
- Panesar, P. S., Chavan, Y., Chopra, H. K., Kennedy, J. F. (2012) Production of microbial cellulose. Response surface methodology approach. *Carbohydr. Polym.* **87**(1), 930-935.
- Park, S., Baker, J. O., Himmell, M. E., Parilla, P. A., Johnson, D. K. (2010) Cellulose crystallinity indeks: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnol. Biofuels* **3**, 1-10.

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.

Pavaloiu, R. D., Stroescu, M., Parvulescu, O. (2014) Composite hydrogels of bacterial cellulose-carboxymethyl cellulose for drug release. *Rev. Chim.* **65**, 852–855.

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

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

Petersen, N., Gatenholm, P. (2011) Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**, 1277–1286.

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

Picheth, G. F., Pirich, C. L., Sierakowski, M. R., Woehl, M. A., Sakakibara, C. N., de Souza, C. F., Martin, A. A., da Silva, R., de Freitas, R. A. (2017) Bacterial cellulose in biomedical applications: a review. *Int. J. Biol. Macromol.* **104**, 97–106

Pokalwar, S. U., Mishra, M. K., Manwar, A. V. (2010) Production of cellulose by *Glucanacetobacter* sp. *Recent Res. Sci. Technol.* **2**, 14–19.

Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., Sintim, H. O. (2015) Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med. Chem.* **7**(4), 493-512.

Rajwadee, J. M., Paknikar, K. M., Kumbhar, J. V. (2015) Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 2491–2511.

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

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

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

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

Saxena, I. M., Kudlicka, K., Okuda, K., Brown, R. M. (1994) Characterization of genes in the cellulose-synthesizing operon (acs operon) of *Acetobacter xylinum*: implications for cellulose crystallization. *J. Bacteriol.* **176**, 5735-5752.

Saxena, I. M., Brown, R. M. (1995) Identification of a second cellulose synthase gene (acsAII) in *Acetobacter xylinum*. *J. Bacteriol.* **177**, 5276-5283.

Schütz, C., Sort, J., Bacsik, Z., Oliynyk, V., Pellicer, E., Fall, A., Wagberg, L., Berglund, L., Bergstrom, L., Salazar-Alvarez, G. (2012) Hard and transparent films formed by nanocellulose-TiO<sub>2</sub> nanoparticle hybrids. *PLoS One* **7**(10), 1-8.

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

Shaw, T., Winston, M., Rupp, C. J., Klapper, I., Stoodley, P. (2004) Commonality of elastic relaxation times in biofilms. *Phys. Rev. Lett.* **93**, 098102.

Shebis, Y., Iluz, D., Kinel-Tahan, Y., Dubinsky, Z., Yehoshua, Y. (2013) Natural antioxidants: function and sources. *Food Nutr. Sci.* **4**, 643–649.

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

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

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

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.

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

Sreeramulu, G., Zhu, Y., Knol, W. (2001) Characterization of antimicrobial activity in *Kombucha* fermentation. *Acta Biotechnol.* **21**, 49–56.

Srihari, T., Satyanarayana, U. (2012) Changes in free radical scavenging activity of *Kombucha* during fermentation. *J. Pharm. Sci. Res.* **4**, 1978–1981.

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



- Tal, R., Wong, H. C., Calhoon, R. (1998) Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J. Bacteriol.* **180**, 4416–4425.
- Tanaka, M., Murakami, S., Shinke, R., Aoki, K. (2000) Genetic characteristics of cellulose-forming acetic acid bacteria identified phenotypically as *Gluconacetobacter xylinus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 757-60.
- Tanskul, S., Amorntharee, K., Jaturonlak, N. (2013) A new cellulose-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. MI 2: screening and optimization of culture conditions. *Carbohydr. Polym.* **92**, 421-428.
- Teoh, A. L., Heard, G., Cox, J. (2004) Yeast ecology of *Kombucha* fermentation. *Int. J. Food Microb.* **95**, 119-126.
- Toda, K., Asakura, T., Fukaya, M., Entani, E., Kawamura, Y. (1997) Cellulose production by acetic acid resistant *Acetobacter xylinum*. *J. Biosci. Bioeng.* **84**, 228–231.
- Tonouchi, N., Tsuchida, T., Yoshinaga, F., Beppu, T., Horinouchi, S. (1996) Characterization of the biosynthetic pathway of cellulose from glucose and fructose in *Acetobacter xylinum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**,1377–1379.
- Torres, F. G., Commeaux, S., Tronsoco, O. P. (2012) Viocompatibility of bacterial cellulose based biomaterials. *J. Funct. Biomater.* **3**, 864-878.
- Ul-Islam, M., Khan, T., Park, J. K. (2012) Water Holding and Release Properties of Bacterial Cellulose Obtained by *in situ* and *ex situ* Modification. *Carbohydr. Polym.* **88**, 596–603.
- Ul-Islam, M., Ullah, M. J., Khan, S., Shah, N., and Park, J. K. (2017) Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose. *Int. J. Biol. Macromol.* **102**, 1166–1173.

- Ullah, M. W., Ul-Islam, M., Khan, S., Kim, Y., Park, J. K. (2016) Structural and physico-mechanical characterization of bio-cellulose produced by a cell-free system. *Carbohydr. Polym.* **136**, 908–916.
- Valera, M. J., Torija, M. J., Mas, A., Mateo, E. (2014) Cellulose production and cellulose synthase gene detection in acetic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 1349–1361.
- Velićanski, A. S., Cvetković, D. D., Markov, S. L., Tumbas, V. T., Savatović, S. M. (2007) Antimicrobial and antioxidant activity of lemon balm Kombucha. *Acta Periodica Technologica* **38**, 165–172.
- Velićanski, A., Cvetković, D., Markov, S. (2013) Characteristics of kombucha fermentation on medicinal herbs from lamiaceae family. *Rom. Biotech. Lett.* **18**, 8034–8042.
- Vijayaraghavan, R., Singh, M., Rao, P. V. L. (2000) Sub-acute (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. Recent Res. Appl. Stud.* **14**, 17–25.
- Watanabe, K., Yamanaka, S. (1995) NII-electronic library service effects of oxygen tension in the gaseous phase on production and physical properties of bacterial cellulose formed under static culture conditions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 65–68.
- Watanabe, K., Tabuchi, M., Morinaga, Y., Yoshinaga, F. (1998) Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. *Cellulose* **5**, 187–200.
- Wu, Z. Y., Li, C., Liang, H. W., Chen, J. F., Yu, S. H. (2013) Ultralight, flexible, and fire-resistant carbon nanofiber aerogels from bacterial cellulose. *Angew. Chem. Int. Edit.* **52**, 2925–2931.

Yoshinada, F., Tonouchi, N., Watanabe, K. (1997) Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its application as a new industrial material. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 219-224.

Yavari, N., Assadi, M. M., Moghadam M. B., Larijani, K. (2011) Optimizing Glucuronic acid production using tea fungus on grape juice by response surface methodology. *Aust. J. Bas. Appl. Sci.* **5**, 1788–1794.

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

Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., Romling, K. (2001) The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Esherichia coli* produces cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* **39**(6), 1452-1463.

Izjava o izvornosti

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

*Vili Nemeč*

---

ime i prezime studenta