

Karakterizacija bakterijske nanoceluloze dobivene fermentacijom kombuche u kemijski definiranim podlogama i podlogama s dodatkom kore lubenice

Klarić, Elena

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:159:009034>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

Elena Klarić

KARAKTERIZACIJA BAKTERIJSKE
NANOCELULOZE DOBIVENE
FERMENTACIJOM *KOMBU* U
KEMIJSKI DEFINIRANIM PODLOGAMA I
PODLOGAMA S DODATKOM KORE
LUBENICE

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

Beskrajno veliko hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Sunčici Beluhan na ukazanoj prilici za izradu ovog diplomskog rada, svom stručnom znanju i pomoći tijekom izvođenja eksperimenata i prilikom pisanja diplomskog rada te savjetima i kritikama koje je nesebično podijelila sa mnom i pomogla mi da uspješno privedem kraju jedno veliko poglavlje mog života.

Zahvaljujem prijateljima na ohrabrenju, svakom poklonjenom osmijehu i svakoj riječi utjehe kada mi je to bilo najpotrebnije. Posebno veliko hvala mojoj zauvijek cimerici Antoniji bez koje bi ove posljednje godine studiranja bile jednostavno nezamislive. Kroz one najljepše trenutke, a pogotovo one najteže, tvoje riječi su mi uvijek vratile osmijeh na lice, radost u srce i vjeru u sebe.

Za kraj, najveće hvala mojoj mami Branki i sestri Marti na apsolutno nenadmašivom, nemjerljivom i beskonačno velikom strpljenju i razumijevanju tijekom svih ovih godina studiranja. Hvala vam što mi nikada niste dopustile da posustanem i što ste me uvijek tjerale naprijed, koliko god teško to ponekad bilo.

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

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

KARAKTERIZACIJA BAKTERIJSKE NANOCELULOZE DOBIVENE FERMENTACIJOM *KOMBUCHE* U KEMIJSKI DEFINIRANIM PODLOGAMA I PODLOGAMA S DODATKOM KORE LUBENICE

Elena Klarić, univ. bacc. ing. biotechn., 0058203945

Sažetak:

Bakterijska nanoceluloza (BNC), u usporedbi s biljnom celulozom, predstavlja relativno čisti oblik celuloze koji posjeduje određena jedinstvena i superiorna strukturna, fizikalno-kemijska i mehanička svojstva. Iako posjeduju identičnu molekularnu strukturu, BNC ima bolju biokompatibilnost, poroznost, čistoću, polimerizaciju, vlačnu čvrstoću, kapacitet zadržavanja vode i mogućnost reciklacije (biorazgradivost). Komagatibacter xylinus uzgajana je na 3 standardne Hestrin- Schramm (HS) podloge u promijenjenom sastavu ugljika; glukoza, fruktoza i saharoza te na kompleksnoj podlozi od kore lubenice (KL). Debljina i prinos BNC povećavala se tijekom fermentacije, ovisno o površini i dubini hranjive podloge. Morfološke strukture BNC pelikula analizirane su pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM). Uzorci su analizirani FT-IR spektroskopijom te je utvrđeno da su svi imali visoki postotak kristaliničnosti. WHC BNC sintetizirane u KL podlozi pokazao je najveću sposobnost zadržavanja vode dok su vrijednosti WRR nakon 72 sata bile potpuno jednake za BNC iz HS-Glc i HS-Sah, a niže za BNC iz HS-Fru i KL.

Ključne riječi: *bakterijska nanoceluloza (BNC), agroindustrijski otpadci, fermentacija, kora lubenice*

Rad sadrži: 45 stranica, 25 slika, 3 tablice, 49 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Ksenija Markov (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan (mentor)
3. prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek (član)
4. prof. dr. sc. Blaženka Kos (zamjenski član)

Datum obrane: 27. rujna 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Bioprocess Engineering

CHARACTERIZATION OF BACTERIAL NANOCELLULOSE OBTAINED BY FERMENTATION OF KOMBUCHA IN CHEMICALLY DEFINED MEDIA AND MEDIA WITH THE ADDITION OF WATERMELON RIND

Elena Klarić, univ. bacc. ing. biotechn., 0058203945

Abstract:

Bacterial nanocellulose (BNC), compared to plant cellulose, represents a relatively pure form of cellulose that possesses certain unique and superior structural, psycho-chemical and mechanical properties. Although they have an identical molecular structure, BNC has better biocompatibility, porosity, purity, polymerization ability, tensile strength, water retention capacity and recyclability (biodegradability). Komagataibacter xylinus was grown on 3 standard Hestrin-Schramm (HS) mediums prepared in a changed carbon composition; glucose, fructose and sucrose as well as on a complex medium obtained from watermelon rind (WR). The thickness and yield of BNC increased during fermentation, depending on the surface and depth of the nutrient medium. The morphological structures of the produced BNC pellicles were analyzed using scanning electron microscopy (SEM). The samples were analyzed by FT-IR spectroscopy and it was determined that they all had a high percentage of crystallinity. WHC BNC synthesized in WR substrate showed the highest water retention capacity, while WRR values, after 72 hours, were exactly the same for BNC from HS-Glc and HS-Sah, and lower for BNC from HS-Fru and WR.

Keywords: *bacterial nanocellulose (BNC), agro-industrial waste, fermentation, watermelon rind*

Thesis contains: 45 pages, 25 figures, 3 tables, 49 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Sunčica Beluhan, PhD, Full professor

Reviewers:

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

Thesis defended: September 27th, 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. CELULOZA: MORFOLOGIJA, STRUKTURA I IZVORI.....	3
2.1.1. Kristalinična struktura celuloze.....	4
2.2. BAKTERIJSKA NANOCELULOZA (BNC).....	6
2.3. BIOSINTEZA BAKTERIJSKE NANOCELULOZE (BNC).....	6
2.3.1. Hranjive podloge za uzgoj.....	8
2.3.2. Metode biosinteze BNC.....	10
2.3.3. Strukturna svojstva BNC.....	11
2.4. PRIMJENA BNC.....	12
2.4.1. Biomedicinska primjena.....	12
2.4.2. Prehrambena primjena BNC.....	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. TIJEK ISTRAŽIVANJA.....	16
3.2. MATERIJALI.....	17
3.2.1. Uporabljene kemikalije i uređaji.....	17
3.2.2. Radni mikroorganizam, sirovine i testni mikroorganizmi.....	17
3.3. METODE.....	17
3.3.1. Priprema čiste kulture za fermentaciju.....	17
3.3.2. Priprema kompleksne podloge (kore lubenice).....	18
3.3.3. Kemijski definirane podloge uporabljene u istraživanju.....	18
3.4. ANALITIČKE METODE.....	20
3.4.1. Određivanje prosječnog sastava kore lubenice.....	20
3.4.2. Određivanje pH vrijednosti i ukupne kiselosti.....	20
3.4.3. Određivanje suhe tvari.....	21
3.4.4. Debljina BNC pelikule.....	21
3.4.5. Pročišćavanje BNC pelikule.....	21
3.4.6. Određivanje kapaciteta zadržavanja vode (eng. <i>Water- Holding Capacity</i> ; WHC)	22
3.4.7. Određivanje brzine otpuštanja vode (eng. <i>Water- Release Rate</i> ; WRR).....	22
3.4.8. Određivanje kristaliničnosti bakterijske celuloze (jodni broj).....	22
3.4.9. Određivanje utjecaja površine i dubine hranjive podloge na kinetiku sinteze BNC.....	23
3.5. MIKROSTRUKTURNA ODREĐIVANJA BNC.....	23
3.5.1. FT-IR spektroskopija.....	23

3.5.2. Pretražna elektronska mikroskopija (eng. <i>Scanning Electron Microscopy</i> ; SEM).....	23
3.6. UČINKOVITOST SINTEZE BNC.....	24
3.7. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA.....	24
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	25
4.1. PROSJEČAN SASTAV KOMPLEKSNE HRANJIVE PODLOGE (KORE LUBENICE).....	25
4.2. pH VRIJEDNOST I NASTAJANJE ORGANSKIH KISELINA (<i>kombucha</i>).....	26
4.3. SINTEZA BNC.....	28
4.4. UČINAK POVRŠINE I DUBINE MEDIJA KULTURE NA PROIZVODNJU BNC-a.....	31
4.5. KAPACITET ZADRŽAVANJA VODE (WHC), BRZINA OTPUŠTANJA VODE (WRR) VRIJEDNOST APSORPCIJE JODA (ISV).....	32
4.6. MORFOLOGIJA BNC (SEM).....	35
4.7. FT-IR SPEKTROSKOPSKA ANALIZA.....	36
5. ZAKLJUČCI.....	39
6. LITERATURA.....	40

1. UVOD

Celuloza, kao najrasprostranjeniji prirodni polimer dostupan na Zemlji, ima golem ekonomski značaj za čitav svijet. Primarni krajnji proizvod fotosintetske aktivnosti u vodenim i kopnenim ekosustavima jest celuloza, s prinosom većim od 100 milijardi tona godišnje (Neo i Yang, 2015) i smatra se najdominantnijim obnovljivim bioresursom u čitavoj biosferi. Glavni industrijski izvor celuloze ovisi o višestaničnim biljkama kao što su tvrda i meka drveća, lan, pamuk, ramija, juta i konoplja. Strukturno, celuloza je linearni polisaharid sastavljen od monomera glukoze vezanih putem reakcije kondenzacijske polimerizacije dugih lanaca anhidroglukoznih jedinica β -1,4-glikozidnom vezom. Između ostalog, stijenke biljnih stanica predstavljaju glavni izvor celuloze, iako su takvi tipovi celuloze obično vezani s ligninom, pektinom i hemicelulozom. Osim biljaka, niz različitih i specijaliziranih skupina bakterija, algi i sluzavih plijesni, posebice onih koji nastanjuju tla bogata organskim tvarima, također sintetiziraju celulozu.

Većina današnjih istraživanja o celulozi obuhvaća ekstrakciju biljne celuloze ili sintezu bakterijske nanoceluloze (BNC) (Wang i sur., 2016). Studije pokazuju da su rodovi *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Salmonella*, *Aerobacter*, *Acetobacter*, *Achromobacter* i *Escherichia* sp. uključeni u sintezu bakterijske nanoceluloze i/ili njen metabolizam (Islam i sur., 2021). U usporedbi s biljnom celulozom, bakterijska nanoceluloza (BNC) je relativno čisti oblik celuloze koji posjeduje određena jedinstvena i superiorna strukturna, fizikalno-kemijska i mehanička svojstva (Trache, 2016). Iako je celulozna biomasa koja potječe od biljaka biopolimer koji se u prirodi pojavljuje u izobilju, njezino iskorištavanje za dobivanje energije je teško, budući da su polimeri glukana otporni na biotransformacije zbog čega se znanost sve više okreće prema iskorištavanju mikrobne nanoceluloze i njezine učinkovite primjene (Mishra i sur., 2018). Vrste poput Gram-negativne bakterije *Komagataibacter xylinus* privukle su pozornost s obzirom na njihovu sposobnost izlučivanja mikrofibrila celuloze iz niza mjesta stanične sinteze (Volova i sur., 2018). Nastali mikrofibrili sa svakog mjesta sinteze spajaju se u vanjskoj hranjivoj podlozi i oblikuju veliku celuloznu vrpču. Na površini hranjive podloge za rast ubrzo dolazi do formiranja strukture koja se naziva pelikula i nastaje ispreplitanjem celuloznih vrpči i srodnih bakterijskih stanica. Nastala pelikula omogućava rast stacionarnih i striktno aerobnih bakterija u uvjetima povećane koncentracije kisika na površini hranjive površine.

Kore voća i povrća bogate su reducirajućim i nereducirajućim šećerima, proteinima, vlaknima, vitaminima i askorbinskom kiselinom te zbog toga mogu biti idealna hranjiva podloga za rast mikroorganizama. Osim toga, mogu biti jeftini ili besplatni izvori ugljika kao supstrat za rast bakterija koje proizvode BNC. Iskorištavanje proizvedenog otpada iz prehrambene industrije

koristilo bi agroindustriji budući da bi se otpad ili nusproizvodi pretvorili u proizvod s dodanom vrijednošću. Dakle, otpad iz jedne industrije može poslužiti kao sirovina za druge što rezultira potpuno ekološkom pristupu obradi hrane.

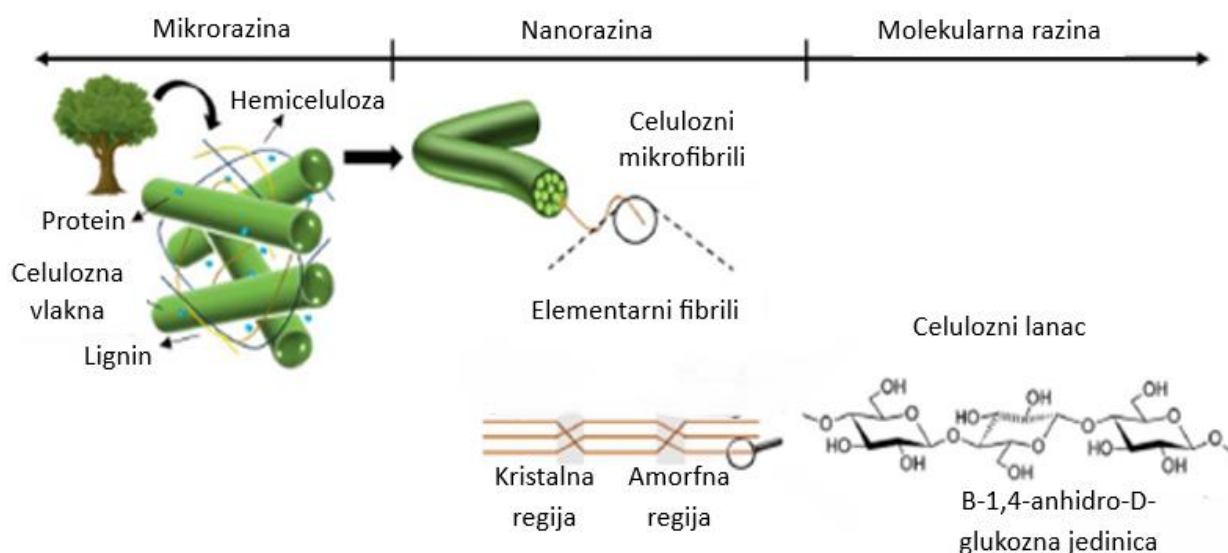
Cilj ovog rada bio je istražiti biokemijske promjene kao posljedicu biotransformacije simbiotski združene kulture bakterija octene i mliječne kiseline te kvasaca (*kombucha*) tijekom 12 dana uzgoja u kompleksnoj (kora lubenice) i više kemijski definiranih podloga s različitim izvorima ugljika. U kemijski definiranim podlogama glavni izvori ugljika bili su glukoza, fruktoza i saharoza prisutni u istim koncentracijama (30 g/L), dok su u kompleksnoj podlozi koncentracije izvora ugljika bile različite; glukoze (25 g/L), fruktoze (21 g/L) i saharoze (6 g/L). Tijekom fermentacija praćeni su i određivani sljedeći parametri:

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

2. TEORIJSKI DIO

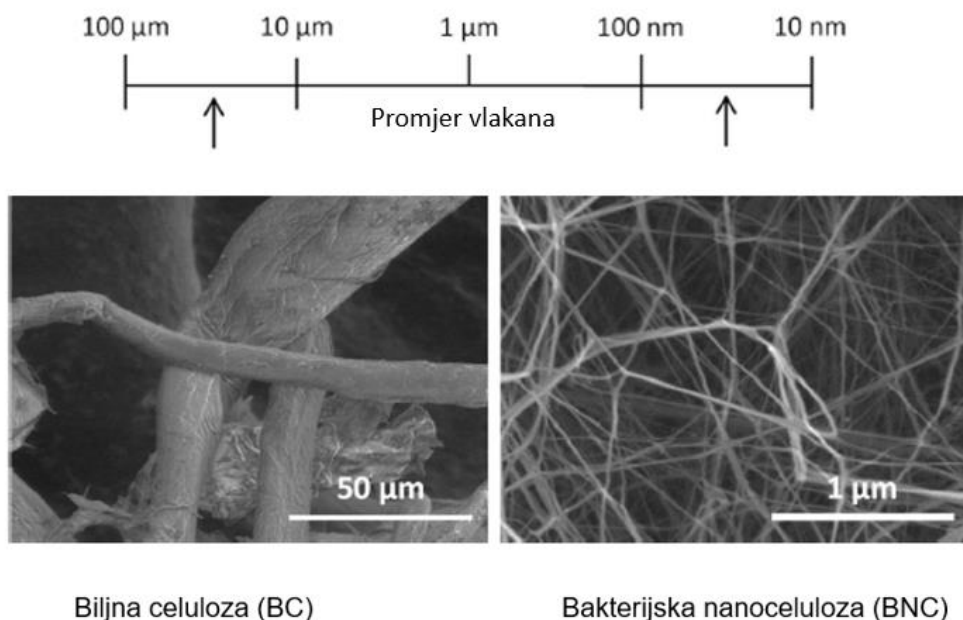
2.1. CELULOZA: MORFOLOGIJA, STRUKTURA I IZVORI

Među prirodnim biopolimerima, celuloza je najzastupljenija na Zemlji i predstavlja jedan od glavnih obnovljivih izvora. Ovaj prirodni polisaharid otkriven je 1838. godine kada je Anselme Payen izolirao vlaknasti materijal iz biljnih tkiva nakon obrade kiselinom i amonijakom, iako se razjašnjenje polimerne strukture pripisuje Hermannu Staudingeru (Sedđigi i sur., 2021). Celuloza se uglavnom dobiva hidrolizom drvene biomase. U biljkama se celulozna vlakna nalaze u staničnoj stijenci fizički i kemijski vezana za druge spojeve kao što su lignin, hemiceluloza i pektin (slika 1). Ova celulozna vlakna imaju promjer od 10-50 μm i sastoje se od celuloznih fibrila s promjerom u nanometrijskom rasponu. Te fibrile formiraju glukozni lanci s kristaliničnim (uređenim) i amorfnim (neuređenim) područjima. S molekularne točke gledišta, celuloza je linearni homopolimer sastavljen od povezanih β -1,4-D-glukoznih jedinica pod kutom od 180° i s 3 hidroksilne skupine u svakoj od glukoznih jedinica (Klemm i sur., 2018). Ova struktura daje materijalu hidrofilitnost i kiralnost. Osim toga, može se enzimski razgraditi i kemijski modificirati zbog velike količine hidroksilnih (-OH) skupina povezanih vodikovim vezama. Međutim, konačna svojstva celuloze određena su supramolekularnim redom i organizacijom.



Slika 1. Shema strukture celuloze: od sastava biljne stanične stijenke prema molekularnoj razini (prema Klemm i sur., 2018)

Tijekom proteklog desetljeća intenzivno su istraživane nanoceluloze kao što su celulozni nanofibrili/celulozna nanovlakna (CNF) i celulozni nanokristali (CNC), njihova izolacija i uporaba kao glavnih materijala ili za pojačanje struktura. Za ekstrakciju nanoceluloze, nativna biljna polukristalna celuloza se hidrolizira i amorfni dio uklanja čime se dobiva elementarna kristalična struktura. Postupak se odvija u dva koraka: prvi korak uključuje tretiranje lužinama (obično natrijev ili kalijev hidroksid) ili kiselinama. Drugi korak uključuje korištenje kiselina, enzima, oksidanata, mehaničkih koraka ili kombinaciju svih njih u svrhu uklanjanja neceluloznih komponenti. Međutim, nanoceluloza se također može dobiti promjenom izvora celuloze, smanjenjem ili izbjegavanjem koraka obrade i kemijskih tretmana. To je slučaj kod nekoliko mikroorganizama koji proizvode nanocelulozu kao što su bakterije ili tunikati (Beluhan i sur., 2024).

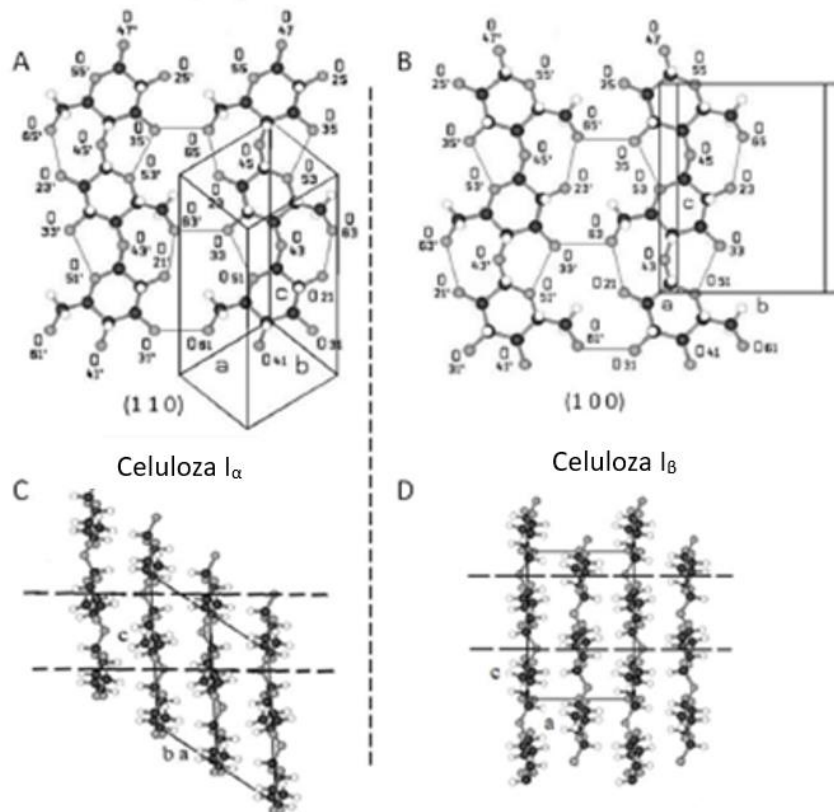


Slika 2. SEM snimka usporedbe uzoraka BC i BNC koja pokazuje povezanu 3-D mrežu celuloznih vlakana (*prema* Taokaew, 2024)

2.1.1. Kristalinična struktura celuloze

Izvor celuloze i primijenjene kemijske modifikacije tijekom hidrolize određuju kristaliničnost strukture celuloze. Ta struktura pruža opće informacije o reaktivnosti i stabilnosti celuloze kao i interakciju između hidroksilnih skupina između lanaca. Do danas su identificirane četiri kristalinične strukture: I, II, III i IV. Ove se strukture mogu uočiti kao triklnska (I_{β}) ili monoklinska (I_{α}) kristalografska prostorna skupina. Dok je prva identificirana u većini alga i bakterija, druga se nalazi u višim biljkama i termodinamički je stabilnija, iako obje strukture mogu koegzistirati

u prirodnoj celulozi. Ovi se alomorfi mogu razlikovati po udaljenosti i orijentaciji lanca koji sadrži različite vodikove veze kao što je prikazano na slici 3. Kao što se može primijetiti, glavna razlika je u pomaku strukturnih jedinica. I_α sadrži dvije β -1,4-D-glukoze s rotacijom od 180° između sebe kao strukturnu jedinicu (celobioza), dok I_β ima dvije simetrično povezane glukoze kao strukturnu jedinicu.



Slika 3. Projekcija strukture celuloze I_α na (110) ravninu (A) i I_β na (100) ravninu (B) koja prikazuje vodikove veze. C,D) Lančani raspored celuloze I_α u [1-1-0] smjeru i (C) i I_β u [0-1-0] smjeru (D) koji prikazuje pomak ploče (prema Naomi i sur., 2020)

Ostali polimorfi celuloze dobivaju se kemijskom obradom celuloze I. Celuloza II se priprema regeneracijom (otapanjem i taloženjem) odnosno mercerizacijom (alkalna obrada) celuloze I i smatra se najstabilnijom strukturom. Ovisno o koncentraciji lužine i vremenu mercerizacije, kompleks se može vratiti u izvornu konfiguraciju celuloze I ili nepovratno transformirati u celulozu II. Alomorfi celuloze III dobivaju se nakon obrade amonijakom celuloze I i celuloze II, dobivajući celulozu III odnosno celulozu IV. Oba alomorfa su reverzibilna nakon zagrijavanja u vodi i posjeduju monoklinsku strukturu iako je raspored lanaca različit (uspoređan u celulozi III i antiparalelan u celulozi IV). Celuloza IV dobiva se termičkim obradama celuloze III (Naomi i sur., 2020).

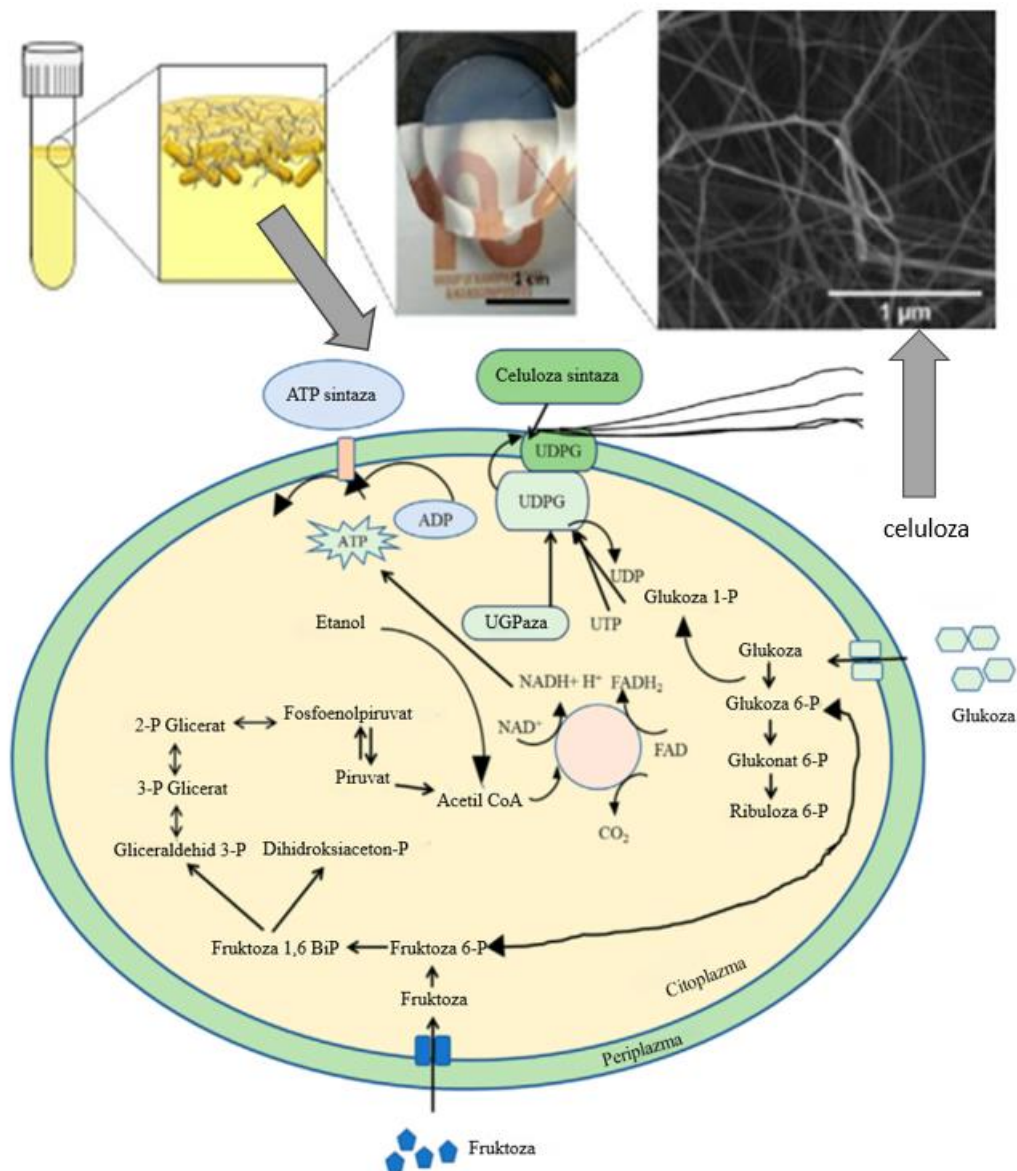
2.2. BAKTERIJSKA NANOCELULOZA (BNC)

Svjedoci smo vremena u kojem rastu regulatorni zahtjevi za smanjenjem jednokratnih plastičnih proizvoda te njihovom zamjenom biorazgradivim materijalom, što će u budućnosti rezultirati povećanom potražnjom za celulozom. Međutim, postoji potreba za namjenskim razumnijim korištenjem šumskih resursa i plantaža (glavni izvor celuloze) jer nekontrolirano krčenje šuma dovodi do promjena staništa i bioraznolikosti, povećanja temperature okoliša i klimatskih promjena. Bakterijska nanoceluloza (BNC) pokazala se kao dobar kandidat za alternativni izvor obnovljivih materijala temeljenih na celulozi. Bakterijsku nanocelulozu (BNC) prvi je opisao Brown kada ju je, kao prozirnu membranu, poput želea, pronašao u matici vinskog octa. Mikroorganizam koji proizvodi pelikulu nazvao je *Acetobacter xylinus*. Među bakterijama, nekoliko drugih rodova može izlučivati celulozu, poput *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Sarcina*, *Azobacter*, *Pseudomonas* ili *Salmonella*. Bakterije octene kiseline roda *Komagataeibacter* (ranije *Gluconacetobacter* ili *Acetobacter*) su Gram-negativne aerobne bakterije štapićastog oblika (0,6-0,8 μm promjera i 1-3 μm duljine) koje se mogu pronaći tijekom fermentacije šećera (oštećeno ili trulo voće, sok, pivo, vino ili ocat). *Komagataeibacter xylinus* je posebna vrsta, ujedno korištena u ovom radu, komercijalno dostupna i uvelike proučavana zbog svoje sposobnosti proizvodnje nanoceluloze iz širokog spektra ugljika i izvora dušika te kao jedna od vrsta s najvećom sposobnošću sintetiziranja nanoceluloze. Jedna bakterijska stanica može polimerizirati do 200 000 molekula glukoze u sekundi (Beluhan i sur., 2022).

Bakterijska nanoceluloza nalazi se na sučelju između zraka i tekuće hranjive podloge koja opskrbljuju bakterijsku stanicu hranjivim tvarima. Tijekom rasta stanice luče celulozna nanovlakna stvarajući prozirnu pelikulu od isprepletenih vlakana. Ta pelikula djeluje kao samoobrambeni mehanizam prema UV zračenju i dehidraciji dok u isto vrijeme sprječava potencijalnim konkurentima pristup hranjivim tvarima i poboljšava kolonizaciju pravilnim pristupom dovoda kisika.

2.3. BIOSINTEZA BAKTERIJSKE NANOCELULOZE (BNC)

Biosinteza bakterijske celuloze prikazana je na slici 4 i sastoji se od dva složena koraka koji uključuju enzime, katalitičke komplekse i regulacijske proteine čije se potpuno razumijevanje još proučava. Prvo, polimerizacija β -1,4- glukanskih lanaca do celuloze odvija se u citoplazmi bakterijske stanice i zatim na periplazmatskoj membrani dolazi do sklapanja lanca i kristalizacije (Mishra i sur., 2022).



Slika 4. Gornji dio slike: shema statične laboratorijske proizvodnje BNC i dobivanje prozirne pelikule sa strukturom isprepletenih nanoceluloznih fibrila (TEM slika). Donji dio slike: shema prikazuje detaljan put biosinteze različitih biomolekula uključenih u sintezu BNC u *K. xylinus* (prema Mishra i sur., 2022)

Biosinteza BNC se odvija u dva koraka:

1) Kada se glukoza koristi kao glavni izvor ugljika, prvo se glukoza fosforilira putem glukokinaze. Zatim se glukoza-6-fosfat (Glc-6-P) izomerizira do glukoza-1-fosfata (Glc-1-P) pomoću fosfoglukomutaze. Nakon toga, uridin difosfoglukoza (UDPGlc) sintetizira UDPGlc-pirofosforilazu (UGPaza) i konačno, odvija se reakcija sintaze celuloze i polimerizacija jedinica glukoze stvarajući β -1,4-glukanske lance. Ova reakcija je pojačana prisutnošću cikličke

digvanilne kiseline (c-di-GMP). U njihovoj odsutnosti, enzim (UGPaza) ostaje neaktivan ili ima nisku aktivnost.

2) Celulozne molekule sintetizirane unutar bakterija spajaju se stvarajući protofibrile (ili elementarne fibrile) promjera 2-4 nm. Ovi protofibrili (β -1,4-glukanski lanci) izlučuju se iz stanične stijenke bakterija i formiraju isprepletene vrpčaste strukture koje čine fibrile promjera 10-100 nm i 1- 9 μ m duljine. Ti fibrili ostaju povezani s bakterijskim stanicama čak i tijekom dioba stanica, stvarajući isprepletenu mrežu s poznatom strukturom grananja kao bakterijska celulozna ovojnica. Ako se ekstruzija celuloznih fibrila nastavi izvan stanice majke, svaka će stanica kćer istisnuti fibrile manjeg promjera, stvarajući točku grananja, no ti fibrili postižu izvorni promjer kao i kod stanice majke (Mishra i sur., 2022).

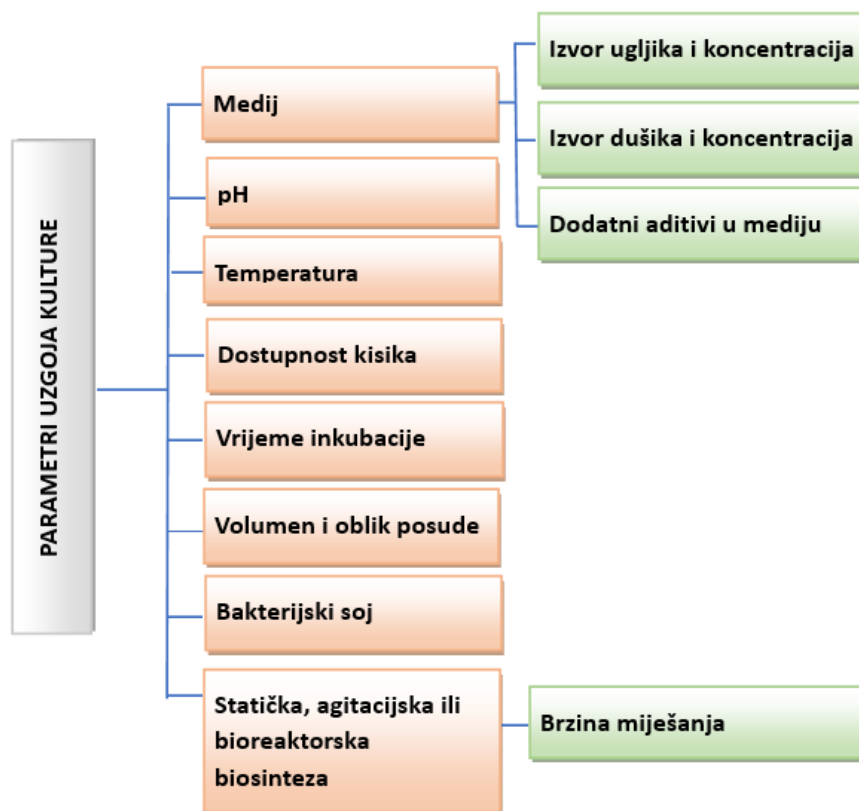
Vrste *Gluconobacter xylinus* i *Agrobacterium tumefaciens* pokazale su se kao prikladni kandidati za sintezu BNC zahvaljujući enzimima i metaboličkim putevima koje posjeduju (slika 4). Uočeno je da rodovi bakterija *Gluconacetobacter*, *Agrobacterium* i *Sarcina* uspješno proizvode BNC u prirodnim i kompleksnim podlogama putem metabolizma oksidativne fermentacije (Huang i sur., 2014). Od svih navedenih rodova, gram-negativna bakterija *Komagataibacter* najveći je proizvođač BNC. Nakon inicijacije sinteze, lanci glukoze formirani unutar bakterijske stanice izlaze kroz mikroskopske stanične pore i isprepliću se tvoreći fibrile što u konačnici dovodi do formiranja celulozne vrpce (Costa i sur., 2014). Navedene vrpce povezivanjem kreiraju visokoporoznu mrežastu strukturu, a celulozni lanci povezani su intra- i intermolekularnim vodikovim vezama. Kada se koriste kao biokompoziti, fibrili bakterijske nanoceluloze su i do 100 puta manji od biljnih celuloznih vlakana (slika 2). Od nekolicine bakterijskih vrsta, *Komagaeitobacter* sp. zasad je jedina koja proizvodi BNC u komercijalno isplativoj količini. Neki od proizvoda dobivenih od BNC uključuju obloge za rane, visokokvalitetne dodatke papiru, vlakna filtarskih ploča, žvakaće gume, stabilizatore hrane, itd. Raspored vlakana osigurava poroznost i visoku mehaničku snagu BNC stvarajući zbijenu, bijelu i želatinoznu strukturu na granici medij-zrak. Molekularna struktura BNC identična je biljnoj celulozi, no između njih postoji velika razlika u fizikalno-kemijskim svojstvima kao što su biokompatibilnost, poroznost, čistoća, polimerizacija, vlačna čvrstoća, kapacitet zadržavanja vode i mogućnost reciklacije (biorazgradivost) (Wu i sur., 2014).

2.3.1. Hranjive podloge za uzgoj

Sastav hranjive podloge ključni je čimbenik za pravilan rast i razvoj bakterija te proizvodnju BNC. Među sastojcima hranjivih podloga nužni su izvor i koncentracija ugljika i dušika. Dok je ugljik važan za rast i razmnožavanje bakterija te čini okosnicu celuloznog lanca, dušik je nužan za metabolizam stanica i čini između 8-14 % suhe tvari biomase bakterija. U nastojanju da se dobije najbolji omjer proizvedene BNC uz niže troškove, kao izvor ugljika proučavani su

monosaharidi, oligosaharidi, alkoholi, organske kiseline te u novije vrijeme poljoprivredni otpad. Kvašćev ekstrakt, polipepton ili kukuruzna močevina (CSL), među ostalima, primjeri su izvora dušika. Najveći prinos BNC uočen je pri visokoj koncentraciji ugljika i minimalnoj koncentraciji dušika. U nekim istraživanjima dodane su aminokiseline, anorganske soli, vitamini ili ulja za povećanje prinosa BNC (Sanwal i sur., 2023).

Na proizvodnju BNC svakako još utječu i pH hranjive podloge, temperatura, otopljeni kisik, brzina miješanja, vrijeme uzgoja te volumen i oblik posude za uzgoj (slika 5). Bakterije mogu rasti u hranjivim podlogama s rasponom pH između 4 i 7, iako su najveći prinosi BNC uočeni pri pH vrijednostima između 4 i 5. Osim toga, kako broj bakterija raste, tijekom procesa fermentacije dolazi do nakupljanja glukonske, octene i mliječne kiseline, te je dodavanje pufera u medij potrebno za održavanje pH u optimalnom rasponu. Temperatura može utjecati na kristaliničnost BNC i rast bakterija. Općenito, optimalni prinosi dobiveni su na temperaturama između 25 i 30 °C. Koncentracija otopljenog kisika u hranjivoj podlozi ovisi o obliku spremnika i također je važna jer visoke koncentracije smanjuju proizvodnju BNC dok niske koncentracije ometaju rast bakterija octene kiseline i time smanjuju prinos. Osim toga, duže razdoblje inkubacije i laka dostupnost hranjivim tvarima dovode do debljih filmova i većeg prinosa BNC (slika 5).

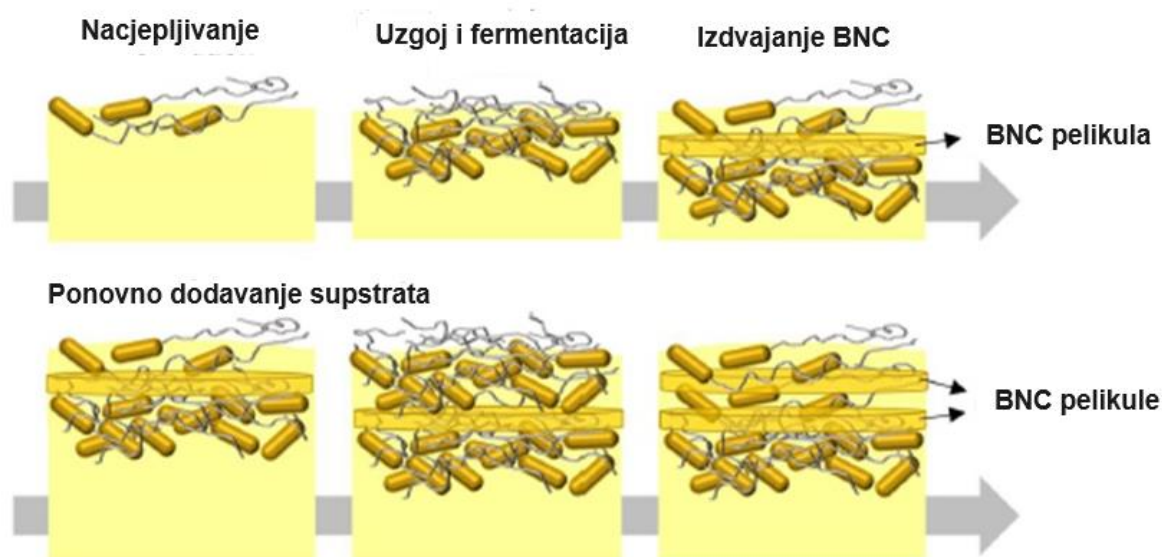


Slika 5. Parametri uzgoja nužni za optimalan prinos BNC (prema Sanwal i sur., 2023)

Osim toga, relevantan je i soj koji se koristi te način uzgoja. Zabilježeno je da bakterije spontano mutiraju kada se opetovano kultiviraju ili miješaju. Te mutacije mogu proizvesti stanice koje ne proizvode BNC u dovoljnoj koncentraciji, smanjujući prinos procesa.

2.3.2. Metode biosinteze BNC

Današnje metode za proizvodnju BNC mogu se provoditi u statičkim ili miješanim uvjetima, a u većim mjerilima provode se u bioreaktorima s kontinuiranom ili polukontinuiranom fermentacijom. Odabir metode uzgoja ovisit će o željenim konačnim morfološkim, fizičkim i mehaničkim svojstvima sintetizirane BNC. Nakon inokulacije bakterijskih stanica, na površini hranjive podloge sintetiziraju se izbočena celulozna nanovlakna dok se ne postigne kritična točka gustoće te se pojavljuju dvije neovisne populacije. Proces se ponavlja dok dostupnost kisika ili hranjivih tvari ne dosegne svoje kritične točke (slika 6).



Slika 6. Shematski prikaz tijeka sinteze BNC pelikule sloj po sloj u statičkim uvjetima (prema Kamal i sur., 2022)

Statični uzgoj tradicionalni je pristup koji se više koristi za sintezu BNC na laboratorijskoj razini. Posuda za uzgoj puni se svježom hranjivom podlogom inokuliranom bakterijama i inkubira između 1-14 dana na odgovarajućoj temperaturi (25-30 °C) i pH (između 4-7). Nakon toga, na granici zračno-tekuće površine stvara se pelikula. Gromovykh i suradnici (2020) predložili su višestupanjski slojeviti postupak kako bi objasnili razmnožavanje bakterija i sintezu BNC u statičkim uvjetima. Kao što slika 6 prikazuje, tijekom prve faze stanice rastu i razmnožavaju se izlučujući celulozna nanovlakna tijekom procesa i proizvode tanki film koji prekriva površinu. Kako broj bakterijskih stanica raste, izlučuju više vlakana i time površinski film (pelikula)

postaje gušći i čvršći. U nekom trenutku, gustoća je dovoljno visoka da ometa stanice da dođu do površine i pojavljuju se dva različita područja s dvije populacije bakterija koja se razvijaju samostalno. Bakterije smještene u gornjem dijelu ne mogu ići na dno podloge i nastaviti rasti i izlučivati celulozna nanovlakna stvarajući novi sloj. Nakon nekog vremena gustoća se povećava i situacija se ponavlja. Bakterije na vrhu hranjive podloge nastavljaju zadebljavati pelikulu dok zarobljene bakterije povezuju različite slojeve pelikule i podebljavaju ih. Kod bakterija koje se nalaze u dubljim dijelovima posude, kako se koncentracija otopljenog kisika smanjuje, sinteza se usporava dok se ne dosegne kritična točka dostupnosti kisika te sinteza BNC prestaje i stanice prelaze u stanje mirovanja. Slično tome, rast pelikule BNC uvelike ovisi o površini područja sučelja tekućina-zrak, poprimajući oblik te površine. U pokušaju povećanja prinosa proizvodnje BNC za komercijalne svrhe istraživano je smanjenje broja dana uzgoja kulture drugim metodama biosinteze kao što su miješanje ili uporaba bioreaktora. Uzgoj se odvija pod istim uvjetima kao i kod statičnog, no uz neprekidno miješanje koje opskrbljuje bakterije rezervnim kisikom. Uz miješanje, u hranjivoj podlozi se sintetizira BNC u obliku vlaknastih nakupina, sfere (peleta) ili nepravilne mase. Za takav uzgoj važni su dodatni parametri kao što su brzina rotacije, ne-Newtonovsko miješanje, a potrebno je uzeti u obzir i ispravnu opskrbu kisikom. Međutim, nije značajno uočeno povećanje proizvodnje BNC, najvjerojatnije zbog pojave neceluloznih mutanata. Osim toga, BNC proizvedena uz miješanje ima niži stupanj polimerizacije, nešto nižu kristaliničnost, niži Youngov modul, te višu viskoznost i stabilnost emulzije. Bioreaktorska kultura se, s druge strane, stalno opskrbljuje hranjivim tvarima i kisikom za povećanje produktivnosti te za prevladavanje nekih ograničenja primijećenih pri statičnom uzgoju. Međutim, velika potrošnja energije za rast bakterijskih stanica naglašava potrebu ekonomičnijih pristupa (Zhong, 2020).

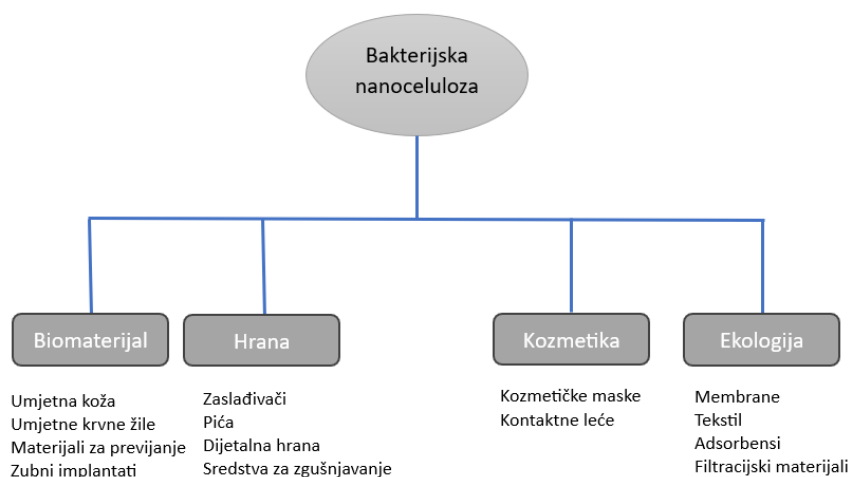
2.3.3. Strukturna svojstva BNC

BNC ima 3-D poroznu hidrogelnu strukturu izgrađenu od mreže vlakana tanjih od biljnih celuloznih vlakana. Ta vlakna su kemijski čista, bez lignina, hemiceluloze i pektina. Međutim, za pravilnu usporedbu, BNC treba usporediti s ostalim nanocelulozama kao što su CNF i CNC. BNC ima visoku kristaliničnost, do 90 % u usporedbi s 40-70 % za CNF, viši stupanj polimerizacije (do 8000) od CNC-a te veliku aktivnu površinu. Također, sadrži visok postotak vode (više od 90 % svoje težine) što se pripisuje prirodnoj hidrofilnosti celuloze, porozne strukture i visokog omjera širine i visine. Osim toga, slojevi pelikule BNC posjeduju veća mehanička svojstva (Youngov modul od 15-35 GPa i vlačna čvrstoća od 150-300 MPa) u usporedbi s CNF-om. Uglavnom se sastoji od I_α (70-80 %) s malim omjerom I_β , iako sastav varira u ovisnosti o uvjetima kulture, u usporedbi s CNF i CNC, koji se uglavnom sastoje od I_β . U usporedbi s drvnom pulpom ili mikrokristaliničnom celulozom, BNC ima 150 °C nižu

energiju aktivacije za početak prve faze toplinske razgradnje. Nadalje, neka od tih svojstava kao što su kristaliničnost, poroznost i mehanička svojstva pelikule mogu se mijenjati i podešavati dodavanjem različitih aditiva u hranjivu podlogu. Zbog visoke koncentracije dostupnih hidroksilnih skupina, može se, na primjer, oksidirati amonijevim persulfatom ili TEMPO-m (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil) za povećanje njegove reaktivnosti ili se njihovom esterifikacijom s organskim kiselinama dobivaju visokohidrofobni BNC filmovi. BNC može također biti modificirana ugradnjom, polimera, metalnih nanočestica ili keramike, stvarajući kompozitne materijale koji kombiniraju svojstva obje komponente (Blanco i sur., 2018).

2.4. PRIMJENA BNC

BNC je svestrane prirode, a posjeduje i nekoliko jedinstvenih svojstava kao što su visoka sposobnost zadržavanja vode, poroznost, visok stupanj čistoće i rastezljivosti pa je kao takva korisna u raznim primjenama (Ullah i sur., 2016). Kako je BNC slična kemijskoj strukturi biljne celuloze, a superiornija u svojstvima, puno se više koristi u medicini, farmaciji, kozmetici i hrani (slika 7). Posljednjih desetljeća upotreba nanoceluloze u biomedicini sve više raste; nanoceluloza pokazuje svojstva odličnog temelja i osnove za poticanje rasta stanica i tkiva zahvaljujući svojoj biokompatibilnosti, biorazgradivosti i isplativosti.



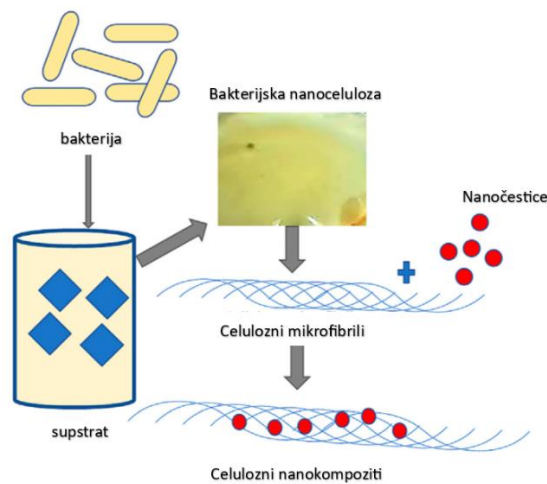
Slika 7. Primjena BNC u različitim područjima (prema Mishra i sur., 2022)

2.4.1. Biomedicinska primjena

U biomedicini BNC se najviše primjenjuje u područjima kao što su presađivanje kože, odnosno kao umjetna koža, krvne žile, materijali za previjanje rana i kao agenti za ciljano doziranje lijekova u koštanom tkivu. Zahvaljujući jakom veznom sklopu između hidroksilnih grupa, mrežasta vlakna BNC pokazuju tendenciju samopovezivanja. Mreža inter- i intramolekularnih

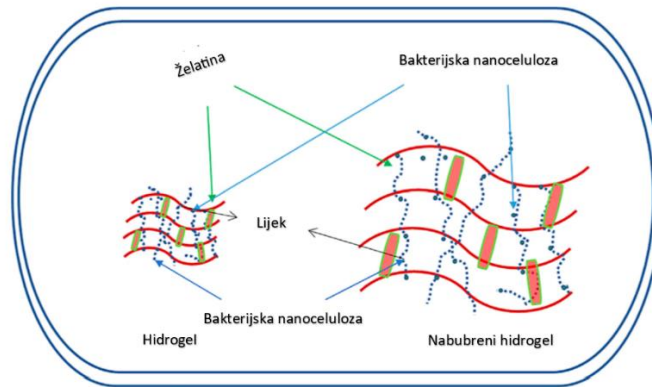
vodikovih veza kreira sloj visoke dodirne površine i poroznosti što osigurava brojna mjesta vezanja lijekova unutar vlakana. U ranim devedesetima po prvi puta uočeno je kako je BNC od velike pomoći prilikom hitne zamjene opečene kože (Moraes i sur., 2016). Zbog svojih svojstava kao što su vodopropusnost, elastičnost, pravilno prijanjanje na rane i otpornost na štetne mikroorganizme, BNC osigurava izvrstan privremeni materijal za traumatske ozljede, pritisne rane, poderotine kože, dijabetičke rane te mjesta transplatacije kože. Također ubrzava zacjeljivanje što pomaže u smanjenju boli na mjestu ozljede (Islam i sur., 2021).

Osim prethodno razmatranih izravnih primjena BNC, kontinuirano isprobavanje i testiranje njezinih svojstava nužno je za poboljšanje i proširenje njezine upotrebe. U tom kontekstu, razvijeno je nekoliko nanokompozita s improviziranim svojstvima, a prikazani su na slici 8. Nanokompozit možemo opisati kao višefazni čvrsti materijal u kojem barem jedna od faza ima jednu, dvije ili tri dimenzije manje od 100 nanometara ili strukture koje imaju nano razmake između ponavljajućih faza koje tvore materijal (Mishra i sur., 2022).



Slika 8. Grafički prikaz sinteze BNC i njezinih nanokompozita.(prema Mishra i sur., 2022)

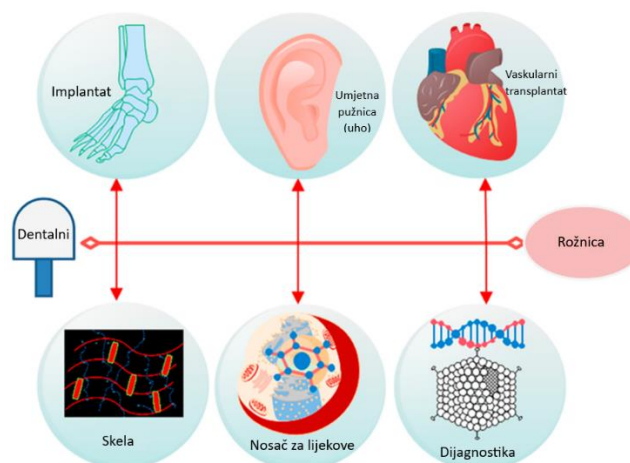
Opisani nanokompoziti su termostabilniji i imaju bolju elastičnost i rastezljivost od native BNC (slika 9) što poboljšava mehanička svojstva i potiče njenu primjenu kao želatinskih nanokompozita i BNC-kolagena (Moraes i sur., 2016). Istraživanja su pokazala kako aloe vera gel na bazi BNC, nastao dodavanjem 30 % (v/v) aloe vera gela u podlogu za uzgoj, rezultira većom sposobnošću zadržavanja vode i poboljšanju kristalinične strukture, za razliku od svog nativnog analoga. BNC kitozan, nanokompozit sa svojstvom sporog otpuštanja vode koristan je u liječenju dekubitusa, čireva i rana koje inače teško zacjeljuju. Zahvaljujući svojoj biokompatibilnoj prirodi, pelikule BNC korisne su u zacjeljivanju kosti budući da osteoblasti, ljudske stanice odgovorne za zacjeljivanje prijeloma kosti, pokazuju izvrsno prijanjanje uz njih (Islam i sur., 2021).



Slika 9. Grafički prikaz svojstva hidrogeliranja BNC korisnog za ciljano doziranje lijekova pomoću nanočestica (prema Mishra i sur., 2022)

Kao nosač lijekova, BNC je pokazala pozitivan učinak kod antimikrobnih agensa kao i kod srebrnih nanočestica na bazi celuloznih (Ag-BNC) metalnih biokompozita. Ag-BNC učinkovita je u antimikrobnom djelovanju i na gram-pozitivne kao i na gram-negativne mikroorganizme. Također je pokazala pozitivne rezultate kao nosač filmom obloženog paracetamola uz pomoć mehanizma oblaganja filmom u *in vitro* istraživanjima (Islam i sur., 2021).

Nekoliko drugih primjera BNC uključuju zubne implantate, umjetnu rožnicu, bubnjiće, te srčane zaliske (slika 10) (Islam i sur., 2021). Međutim, usprkos dobrim svojstvima i učinkovitosti, postoje određeni izazovi u vezi s kontroliranom isporukom lijekova, kontrolom veličine pora tijekom sinteze i strukturnoj uniformnosti (sličnost sastava na površni kao i u jezgri). Kako bi BNC postala biomaterijal s većom dodanom vrijednošću, potrebno je još mnogo ulaganja i istraživanja u relevantnom području.



Slika 10. Mogućnosti široke primjene bakterijske nanoceluloze u biomedicinskom području (prema Mishra i sur., 2022)

2.4.2. Prehrambena primjena BNC

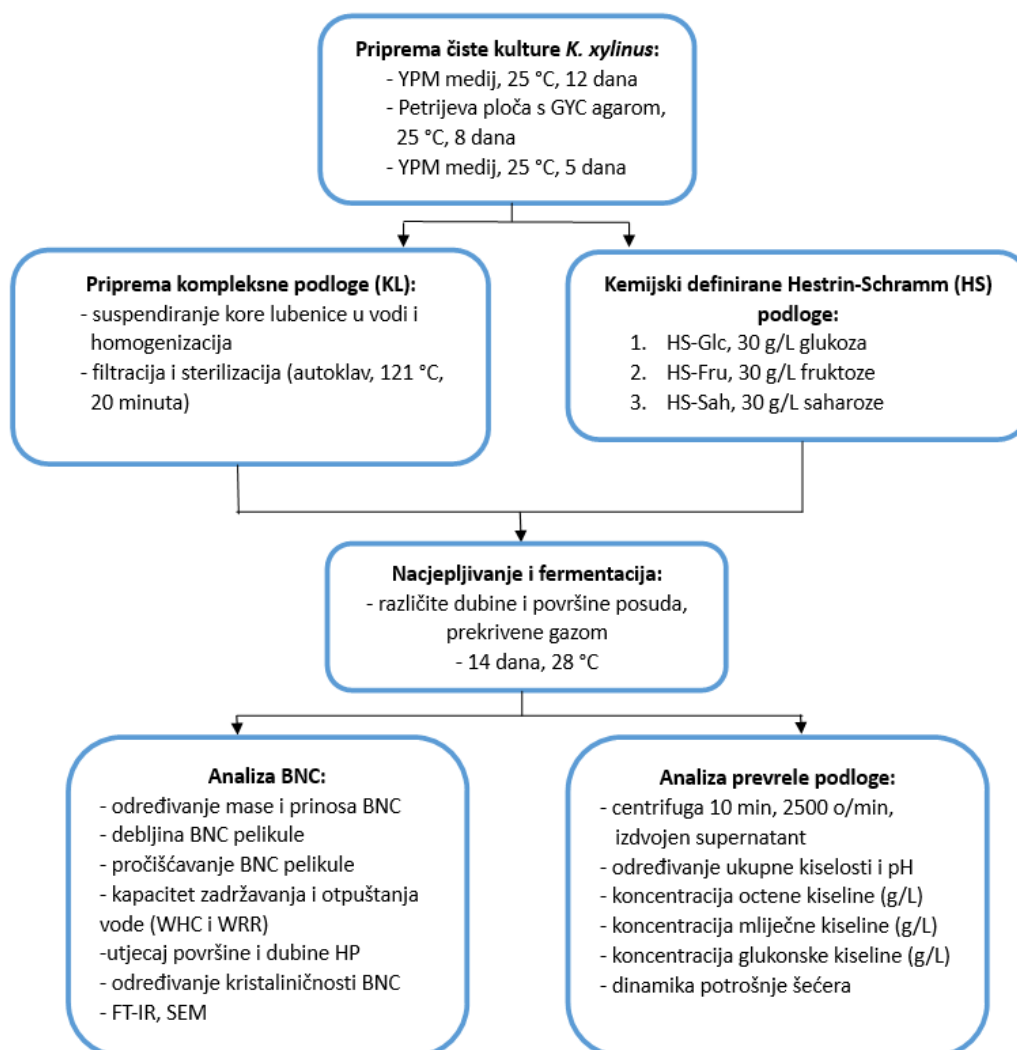
Kao što i samo ime nalaže, BNC proizvode bakterije u vrlo čistom obliku. BNC proizvedena u različitim hranjivim podlogama može sadržavati boju i okus te podloge, na primjer, sintetizirana na podlozi koja sadrži voćni sirup kao supstrat sadržavat će okus i pigment korištenog voća. Isto tako, proizvedena BNC može biti različitih oblika kao što su to filamenti, sfere ili filmovi. Navedena svojstva BNC kao što su visoka čistoća i mogućnosti promjene okusa, boje, teksture i oblika čini ju potencijalnim kandidatom za prehrambene potrebe. Njezina uporaba kao sastojka hrane poboljšava stabilnost hrane u širokom rasponu pH i temperature te u uvjetima smrzavanja i odmrzavanja. Zahvaljujući svom ugodnom okusu i jednostavnoj proizvodnji, BNC po imenu Nata, porijeklom s Filipina, koristi se kao tradicionalni prehrambeni desert na jugoistoku Azije. Prirodni crveni pigment *Monascus* ispitan je kao bojilo za BNC, a nastali morfološki stabilan kompleks *Monascus*-BNC daje okus sličan mesu i ponaša se kao alternativa mesu za vegeterijansku prehranu (Shi i sur., 2014). Druge korisne primjene BNC u prehrambenoj industriji uključuju zgušnjavanje, geliranje i vezanje vode. Kada se koristi kao sredstvo za zgušnjavanje, BNC se dodaje u pastu sastojaka što dovodi do pojačanja ljepljivosti čitave smjese. Isto tako, njezina primjena kao sredstvo za stabilizaciju rezultira zadržavanjem sadržaja vlage u proizvodu, na primjer, upotreba BNC u sladoledu omogućuje zadržavanje njegovog oblika najmanje 60 minuta dok se isti sladoled bez nje u istom vremenskom intervalu potpuno otopi. Kao sredstvo za želiranje, BNC poboljšava teksturu i čvrstoću tofua. Kada se dodaje u čokoladu kao sredstvo za suspenziju, prihvaća čestice kakaovca što sprječava njegovo nepoželjno taloženje (Han i sur., 2018).

BNC se može koristiti za pripremu prehrambenih sastojaka s niskim udjelom masti, na primjer, dodavanje umjesto masti surimiju povećava njegov kapacitet zadržavanja vode zahvaljujući njezinoj mrežastoj strukturi. Isto tako, dodavanjem 10 % BNC u mesne okruglice poboljšava njihovu sočnost i sposobnost žvakanja što ju čini odličnom zamjenom za masnoću u emulgiranim mesnim proizvodima (Khirrudin, 2012). Određeni materijali proizvedeni iz BNC mogu se koristiti kao materijal za pakiranje, na primjer, materijal sastavljen od PLA (polimljične kiseline) i BNC korišten je za pakiranje hrane. Navedeni materijal pokazao je bolja mehanička svojstva u usporedbi s čistom PLA, zadržavajući svoju biokompatibilnost i transparentnost (Xiao i sur., 2012). Antimikrobni agenti mogu biti inkorporirani u materijale za pakiranje kako bi se bolje održala kakvoća tijekom skladištenja.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Tijek istraživanja

Komercijalna čista kultura *Komagataibacter xylinus* uzgajana je 12 dana na 3 standardne Hestrin- Schramm (HS) podloge pripravljene u promijenjenom sastavu ugljika; glukoza, fruktoza i saharoza te na kompleksnoj podlozi dobivenoj od kore lubenice (KL). Shematski prikaz istraživanja prikazan je na slici 11. Tijekom istraživanja praćene su promjene pH vrijednosti, nastajanje organskih kiselina (octene, glukonske i mliječne), prinos BNC te kapacitet zadržavanja vode (WHC) i brzina otpuštanja vode (WRR). Morfološke strukture proizvedenih BNC pelikula analizirane su pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) i pomoću FT-IR spektroskopske analize.



Slika 11. Shematski prikaz cjelokupnog istraživanja

3.2. Materijali

3.2.1. Uporabljene kemikalije i uređaji

U radu su uporabljene sljedeće kemikalije (proizvođači): glukoza (GRAM MOL, Zagreb, Hrvatska), kvaščeve ekstrakt (Biolife, Milano, Italija), pepton (Biolife, Milano, Italija), CaCO_3 (Kemika, Zagreb, Hrvatska), agar (Merck, Darmstadt, Njemačka), EtOH (GRAM MOL, Zagreb, Hrvatska), Na_2HPO_4 (Merck, Darmstadt, Njemačka), limunska kiselina (Merck, Darmstadt, Njemačka), tripton (Merck, Darmstadt, Njemačka), sojin pepton (Merck, Darmstadt, Njemačka), NaCl (kemika, Zagreb, Hrvatska). U radu su korišteni sljedeći uređaji (proizvođači): analitička vaga Sartorius ENTRIS 153-1S (Sartorius, SAD), blender model MMBM401W (Bosch, Gerlingen, Njemačka), pH-metar "Methrom", model 744 (Švicarska), termostati Memmert IF40 na 28 °C i 37 °C (Memmert, Long Island City, SAD), laboratorijska tresilica inkubator IKA@KS 4000i control (SMITA Chemical Lab, New Delhi, Indija), elektronski mikroskop Tescan Vega 3 EasyProbe (Tescan, Brno, Češka), IR-spektrofotometar ALPHA-Trasmittance FTIR Spectrometre (Bruker, Karlsruhe, Njemačka).

3.2.2. Radni mikroorganizam, sirovine i testni mikroorganizmi

Radni mikroorganizam, bakterija *K. xylinus*, nabavljena je u liofiliziranom obliku iz DSMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Leibniz Institute, GmbH.

Lubenice su uzgojene u Dolini Neretve, a brane krajem svibnja 2024. godine te nabavljene u lokalnoj trgovini u Zagrebu. Pomno su oprane pod tekućom vodom da se uklone ostaci zemlje i nečistoća te dva puta isprane. Nakon što su razrezane u ploške, nožem je u potpunosti uklonjena pulpa s košticama sve do bijelog dijela pulpe i kore.

3.3. Metode

3.3.1. Priprema čiste kulture za fermentaciju

Komercijalna čista kultura *K. xylinus* je, prema nuputcima proizvođača, pripravljena u tekućoj YPM kulturi na tresilici pri 25 °C tijekom 10 dana uzgoja u aseptičnim uvjetima u termostatu. Nakon toga je 1 mL uzgojene kulture naciepljen na Petrijeve ploče s GYC agarom metodom kose niti te su ploče stavljene u termostat tijekom 8 dana pri 25 °C (slika 12 B). Nakon toga je s izraslih ploča precijepljeno 10^6 CFU/mL u 100 mL tekuće YPM kulture te je ponovno uzgajana na tresilici pri 25 °C tijekom 5 dana (slika 12 A). Ovako uzgojena kultura uporabljena je u daljnjim istraživanjima.

A



B



Slika 12. Čista kultura *K. xylinus* uzgojena u YPM podlozi: a) aktivacija liofilizirane kulture u tekućoj podlozi (završni uzgoj); B) uzgoj na čvrstoj podlozi

3.3.2. Priprema kompleksne podloge (kore lubenice)

Za pripremu podloge s korama lubenice (KL), 200 g kore lubenice je suspendirano u 500 mL vode i samljeveno blenderom. Tako je pripravljeno 480 mL homogene smjese te je taj postupak ponovljen još tri puta. Četiri jedinstvena homogenata kore lubenice su spojena i zatim promiješana. Dobiveni homogenat je propušten kroz tri sloja gaze za uklanjanje grubih čestica. Zatim je mutni filtrat filtriran kroz filter papir pomoću vodene pumpe, odvajajući bistru otopinu od preostalih krutih čestica. Bistra otopina je sterilizirana autoklaviranjem 20 minuta pri 121 °C te je nakon toga korištena kao hranjiva podloga u daljnjim istraživanjima. Postupak je primijenjen višekратно, ovisno o potrebnim volumenima hranjive podloge u istraživanju.

3.3.3. Kemijski definirane podloge uporabljene u istraživanju

1) YPM podloga (eng. *Yeast Peptone Medium*; tekuća)

Sastav/L

Kvašćev ekstrakt	5,0 g
Pepton	3,0 g
Manitol	25,0 g
Destilirana voda	1,0 L

Primjena: za aktiviranje i uzgoj liofilizirane komercijalne kulture *K. xylinus*.

2) GYC agar (eng. *Glucose Yeast Extract Calcium Carbonate Agar*)

Sastav/L

Glukoza	20,0 g
CaCO ₃	20,0 g
Kvašćev ekstrakt	10,0 g
Agar	20,0 g

Svi sastojci pomiješani su u 1,0 L demineralizirane vode, dobro promiješani i lagano zagrijavani do vrenja. Sterilizirani su i razliveni na ploče.

pH 6,8 ± 0.2 pri 25°C

Primjena: za uzgoj i održavanje *Acetobacter* spp. *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter xylinum* (*K. kylinus*), i *Gluconobacter oxydans*.

4) Standardna Hestrin–Schramm (HS) podloga pripravljena je u promijenjenom sastavu (tablica 1).

Tablica 1. Hranjive podloge za sintezu BNC uporabljene u istraživanju

Hranjiva podloga	Naziv podloge	Sastav podloge
Kemijski definirane podloge – HS podloga s promijenjenim izvorima ugljika	HS-Glc	30 g/L glukoze 5 g/L kvašćevog ekstrakta 5 g/L peptona 2,7 g/L Na ₂ HPO ₄ 1,15 g/L limunske kiseline
	HS-Fru	30 g/L fruktoze 5 g/L kvašćevog ekstrakta 5 g/L peptona 2,7 g/L Na ₂ HPO ₄ 1,15 g/L limunske kiseline
	HS-Sah	30 g/L saharoze 5 g/L kvašćevog ekstrakta 5 g/L peptona 2,7 g/L Na ₂ HPO ₄ 1,15 g/L limunske kiseline
Kompleksna podloga – kora lubenice	KL	25 g/L glukoze 21 g/L fruktoze 6 g/L saharoze izvori N, P I faktora rasta su iz kore lubenice

pH podloga podešen je na 5,0 pomoću 0,1 M NaOH i HCl. Podloge su sterilizirane i inokulirane s 10 mL prethodnog uzgojene čiste kulture *K. xylinus* i 10 % (v/v) prethodno fermentirane podloge. Erlenmeyerova tikvica od 300 mL koje sadrže 100 mL podloge i staklenke od 750 i

1000 mL koje sadrže 250, i 300 mL podloge prekrivene su sterilnom gazom kako bi se osigurali aerobni uvjeti. Fermentacija je provedena na 28 °C tijekom 12 dana u statičkim i aseptičnim uvjetima. Plutajuće pelikule uklanjane su svakih 48 h fermentacije kako bi se odredila masa BNC (g). BNC proizvedena (g/L) u podlogama s pripadajućom koncentracijom izvora ugljika odabrana je za daljnju karakterizaciju. Prevrele podloge centrifugirane su pri 2500 okr/min tijekom 10 minuta, a supernatanti su uporabljeni za daljnja određivanja. Eksperimenti su izvedeni u tri primjerka.

3.4. Analitičke metode

3.4.1. Određivanje prosječnog sastava kore lubenice

Suha tvar određena je prema metodi AOAC 930.15, sušenjem uzorka do konstantne mase. Sadržaj sirovih proteina određen je prema metodi AOAC 976.05, po Kjeldahl protokolu (6,25 uporabljen je kao faktor za proračun). Udio sirove masti određen je prema metodi AOAC 920.39 Soxhlet aparatom, a udjel sirovih minerala prema metodi AOAC 942.05 (2005).

Koncentracija šećera (glukoza, fruktoza i saharoza) i kiselina (octena, glukonska i mliječna kiselina) određena je HPLC-om (Shimadzu, Japan) pomoću kolone Supelcogel C610H (300 mm × 7,8 mm; Supelco Analytical, Bellefonte, PA, SAD) i odgovarajući zaštitni stup (Supelcogel H, 50 mm × 4,6 mm). Analiti su eluirani izokratski s 0,1 % fosfornom kiselinom pri brzini protoka od 0,5 mL/min i 55 °C. Šećeri su detektirani i kvantificirani detektorom indeksa loma (Shimadzu RID-10). Organske kiseline su analizirane pomoću UV/VIS detektora (Shimadzu SPD-M10Avp Diode Array Detector, Shimadzu, Kyoto, Japan).

3.4.2. Određivanje pH vrijednosti i ukupne kiselosti

pH uzoraka mjeren je svakodnevno kalibriranim pH metrom. Ukupna kiselost izražena je kao % (v/v) octene kiseline pomoću sljedeće jednadžbe (1):

$$\text{Ukupna kiselost (\%)} = (V \times M \times 6 / V_{\text{uzorak}}) \times 100 \quad [1]$$

gdje je (V) mL NaOH, (M) je molaritet NaOH, a (V_{uzorak}) je volumen (mL) uzorka.

3.4.3. Određivanje suhe tvari

BNC pelikule dobivene nakon 12 dana stacionarnog uzgoja izvagane su na analitičkoj vagi u mokrom stanju, a zatim osušene do konstantne težine na 80 °C/12 h u suhom sterilizatoru. Nakon toga su suhe BNC pelikule ponovno izvagane na analitičkoj vagi, a suha tvar je izračunata prema sljedećoj jednadžbi (2):

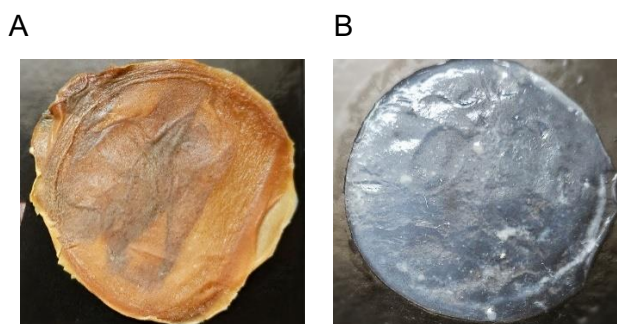
$$\text{Suha tvar (\%)} = (m_{\text{vlažna}} - m_{\text{suha}}) / m_{\text{mokra}} \times 100 \quad [2]$$

3.4.4. Debljina BNC pelikule

Debljina svake BNC pelikule (75 x 75 mm) dobivene iz različitih C-izvora izmjerena je na pet različitih položaja vodootpornim digitalnim vanjskim mikrometrom (Insize, Kina). Ujednačenost je određena kao standardna devijacija (SD) pet mjerenja, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm SD.

3.4.5. Pročišćavanje BNC pelikule

BNC pelikule izdvojene su iz hranjivih podloga, isprane s 0,1 M NaOHt te su stavljene na filter papir i toplinski obrađene na 80 °C tijekom 60 minuta. Ovaj je postupak ponovljen dvaput kako bi se uklonile pričvršćene stanice i nečistoće ugrađene u BNC matricu. Zatim su obrađene BNC pelikule uronjene u destiliranu vodu kako bi se uklonili zaostali sastojci hranjive podloge i drugi ostatci te su ostavljene dok pH vode nije postao neutralan. Konačno, pročišćene BNC pelikule su osušene na 105°C do konstantne mase (slika 13). Koncentracija je određena kao masa (g) BNC medija kulture/volumen (L).



Slika 13. Fotografski prikazi osušenih BNC pelikula nakon pročišćavanja: A) BNC HS-Sah; B) BNC KL

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

Kapacitet zadržavanja vode BNC određivan je nakon 12 dana fermentacije. BNC je iz prevrelih podloga izvađena pomoću plastične pincete, protresena da se ukloni višak tekućine i nakon toga izvagana. Nakon vaganja BNC 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 (3) (Shezad i sur., 2010):

$$\text{WHC} = (\text{masa vode uklonjena tijekom sušenja/suha tvar bakterijske celuloze}) \quad [3]$$

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

Za određivanje brzine otpuštanja vode iz novo sintetizirane BNC, 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 vremenu.

3.4.8. Određivanje kristaliničnosti bakterijske celuloze (jodni broj)

Određivanje jodnog broja izvodi metodom koja se temelji na određivanju količine apsorbiranog joda u amorfnim područjima celuloze. Ta se količina određuje indirektno, titracijom preostalog joda u otopini s 0,01M Na₂S₂O₃.

Uzorak BNC (0,3 g) stavljen je u Erlenmeyer tikvicu od 250 mL sa šlifom te preliven s 2 mL otopine joda (5 g I₂ + 40 g KI + 50 mL H₂O). Reakcija je trajala 3 minute i nakon toga je u reakcijsku smjesu dodano 100 mL zasićene Na₂SO₄, sve je promiješano i ostavljeno na tamnom mjestu 1-4 h uz miješanje (magnetna mješalica). Nakon toga je preostali jod određen titracijom s 0,01 M Na₂S₂O₃ 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 BNC).

Količina apsorbiranog joda je izračunata prema jednadžbi (4):

$$I \text{ broj} = \frac{(a-b) \cdot 2,04 \cdot 2,54}{m \cdot \left(1 - \frac{w}{100}\right)} \text{ (mg I}_2\text{/g BNC)} \quad [4]$$

gdje je:

a – volumen 0,01 M Na₂S₂O₃ utrošen za slijepu probu (mL)

b - volumen 0,01 M Na₂S₂O₃ utrošen za titraciju uzorka (mL)

m – masa uzorka (g)

w – udjel vlage (%)

Apsorpcija joda može poslužiti za određivanje indeksa kristaliničnosti jer se događa u amorfnim dijelovima molekule celuloze. Inverzna vrijednost jednog broja razmjerna je kristaliničnim dijelovima celuloze i izražava se kao indeks kristaliničnosti prema jednadžbi (5) koju su predložili Nelson i sur., (1970):

$$Cr I = 100 - (I \text{ broj } /412) \cdot 100 (\%) \quad [5]$$

3.4.9. Određivanje utjecaja površine i dubine hranjive podloge na kinetiku sinteze BNC

Svi istraživani uzorci pripremljeni su u staklenim posudama sljedećih dimenzija:

Kemijski definirane i kompleksna podloga (podloga s korom lubenice)

- Staklena posuda volumena 720 mL (d = 14 cm; h = 8 cm; a = 153,9 cm²).
- Staklena posuda volumena 1000 mL (d = 10 cm; h = 9 cm; a = 153,9 cm²).
- Staklena posuda volumena 1000 mL (d = 14 cm; h = 18,5 cm; a = 153,9 cm²).

3.5. Mikrostrukturalna određivanja BNC

3.5.1. FT-IR spektroskopija

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

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

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

3.6. Učinkovitost sinteze BNC

Nakon 12 dana fermentacije BNC pelikule su izdvojene iz Erlenmeyer tikvica i staklenih posuda i oprane demineraliziranom vodom sve dok pH vode za ispiranje nije dostigao početnu pH vrijednost. Prinos biomase BNC (g) izračunat je prema sljedećoj jednadžbi:

$$\text{Prinos BNC (g/L)} = \frac{(P-P_0)}{V} \quad [6]$$

Koeficijent konverzije supstrata u biomasu $Y_{x/s}$ (%) izračunat je prema jednadžbi (7):

$$Y_{x/s} (\text{g/g}) = \frac{(\gamma \text{ vlažne biomase nakon fermentacije} - \gamma \text{ vlažnog inokuluma})}{(\gamma \text{ izvora C na početku fermentacije} - \gamma \text{ izvora C na kraju fermentacije})} \quad [7]$$

gdje je P količina proizvedene BNC (g), P_0 je početna masa pelikule BNC (g), V je volumen hranjive podloge (L), a t je vrijeme reakcije (h).

3.7. Statistička analiza podataka

Podaci su statistički obrađeni pomoću ANOVA testova i višestrukih raspona testiranih pomoću softvera Origin 2022. Odstupanje se smatralo značajno različitim pri $p \leq 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Prosječan sastav kompleksne hranjive podloge (kora lubenice)

Rast i metabolizam mikroorganizama ovise o povoljnim uvjetima za njihov rast, kao što su optimalni pH, temperatura i odgovarajuće hranjive tvari. Što se tiče potonjeg, komponente nekog voća i povrća može osigurati potrebne nutritivne sastojke iz hranjivih podloga. Stabljike i kore voća i povrća često se odbacuju ili koriste kao kompost; međutim, ovi dijelovi imaju visoku nutritivnu vrijednost jer sadrže znatnu količinu šećera i proteina, a njihova bi uporaba mogla značajno smanjiti troškove proizvodnje hranjivih podloga za uzgoj (Mimiran i sur., 2020). Ovo istraživanje imalo je za cilj prikazati mogućnost valorizacije kore lubenice prema njihovom sastavu makronutrijenata za uzgoj BNC. Prosječan sastav kore lubenice naveden je u tablici 2.

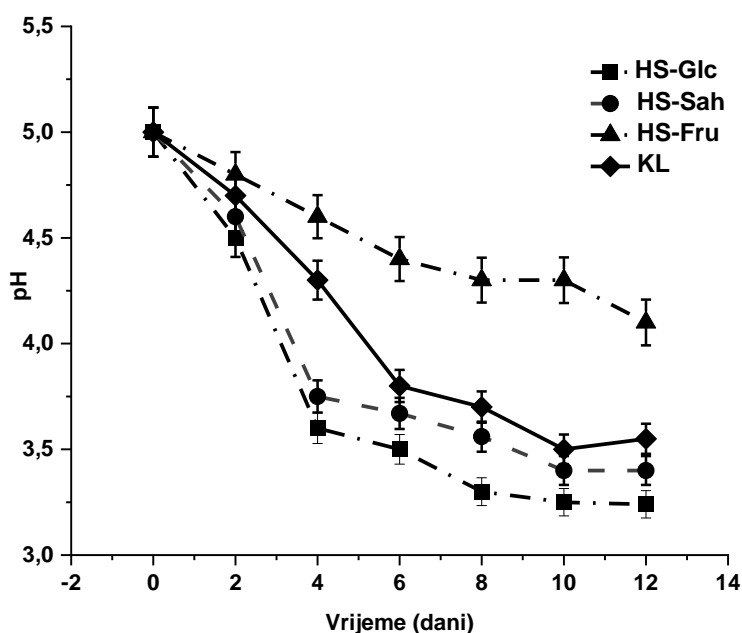
Tablica 2. Prosječan sastav kore lubenica uporabljenih u istraživanjima

Parametar	Vrijednosti
Masa kore (g)	1000 ± 0,02
Vlaga (%)	14,98 ± 0,01
Pepeo (%)	3,92 ± 0,03
Masti (%)	3,82 ± 0,02
Proteini (%)	3,71 ± 0,02
Vlakna 8%)	15,23 ± 0,25
Askorbinska kiselina (g/100 g)	6,4 ± 0,25
pH	6,29 ± 0,02
Ukupni šećeri (%)	5,2 ± 0,05
Saharoza (%)	0,6 ± 0,35
Reducirajući šećeri (%)	4,6 ± 0,15
Glukoza (%)	2,5 ± 0,23
Fruktoza (%)	2,1 ± 0,17

Masena koncentracija proteina, pepela, ukupnih masti i vlakana u kori lubenice bio je 3,71 % (tež/tež), 3,92 % (tež/tež), 3,82 % (tež/tež), odnosno 15,23 % (tež/tež). Među reducirajućim šećerima glukoza je bila dominantan izvor ugljika, zastupljena u kori s 2,5 % (tež/tež). Maseni udjel glukoze, kao i fruktoze, 2,1 % (tež/tež) bio je značajno viši od udjela saharoze, 0,6 % (tež/tež) u korama lubenica uporabljenim u istraživanju.

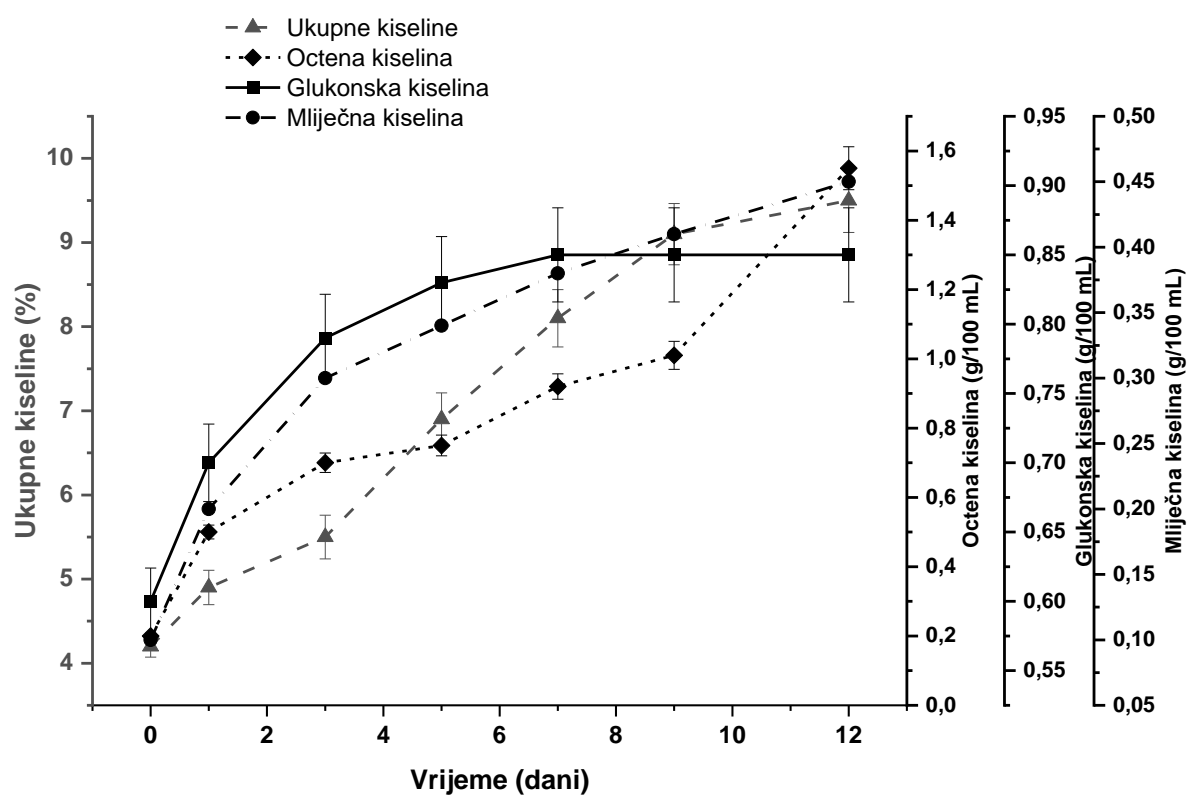
4.2. pH vrijednost i nastajanje organskih kiselina (*kombucha*)

Svaki mikroorganizam ima optimalan pH raspon za svoj rast i sintezu BNC, a kontrola pH vrijednosti hranjivih podloga kritična je za visoku produktivnost. Slika 14 prikazuje promjene u pH vrijednosti u *kombuchi* s različitim izvorima ugljika kao supstratima tijekom fermentacije. Kao što se može vidjeti na slici 14, smanjenje pH vrijednosti u HS podlogama (HS-Glc i HS-Sah) slijedile su obrnuti eksponencijalni zakon s najbržim opadanjem vrijednosti na početku fermentacije (do četvrtog dana). Početna pH vrijednost svih ispitivanih uzoraka bio je 5,0, uz primjetni pad na pH 3,6 i 3,75 u podlogama s glukozom i saharozom dok je nakon četiri dana fermentacije u podlozi s fruktozom pH vrijednost blago pala na 4,6. U podlogama s korom lubenice (KL) smanjenje pH vrijednosti je kontinuirano lagano padalo do kraja fermentacije (12 dana) kad je izmjerena pH vrijednost iznosila 3,55. Nakon osmog dana pad pH vrijednosti je u sve tri kemijski definirane HS podloge postao znatno sporiji te je na slici 14 vidljiva pH stagnacija do kraja fermentacije. Smatra se da su optimalne pH vrijednosti za sintezu BNC od 4,5 do 6,5 pri čemu je najveća učinkovitost oko 6,5 dok je ispod vrijednosti 3,5 sinteza BNC-a inhibirana. Međutim, Puspawati i Arihantana (2016) su dokazali da su izolirane bakterije mliječne kiseline iz *kombuche* bile otporne na pH niži od 2,0. Kiselost hranjive podloge smanjuje se kada je prethodno fermentirana majčinska tekućina iz prethodne fermentacije dodana tijekom inokulacije BNC, čime se onemogućava pojava plijesni i omogućava zaštita od nepoželjnih mikroorganizama.



Slika 14. Promjena pH vrijednosti tijekom 12 dana fermentacije u podlogama s različitim izvorima ugljika

U KL podlozi ukupna kiselost (% v/v) rasla je linearno s vremenom od 3,1 % do 9,64 % na kraju fermentacije (slika 15). Metabolizam ugljika rezultiralo je nakupljanjem octene, glukonske i mliječne kiseline i smanjenom pH vrijednošću. Prethodno je objavljeno da brzo smanjenje pH vrijednosti tijekom fermentacija ne povećava proizvodnju BNC, već je uglavnom posljedica povećanja koncentracija organskih kiselina kao primarnih metabolita (Gullo i sur., 2018). Koncentracija analiziranih organskih kiselina tijekom 12 dana fermentacije *kombuche* prikazana je na slici 15. Octena i glukonska kiseline su primarne organske kiseline koje proizvode bakterije octene kiseline u *kombuchi*, no iako u manjoj koncentraciji, određena je i mliječna kiselina. Koncentracija octene kiseline tijekom procesa fermentacije u KL mediju povećana je potrošnjom glukoze bakterijama octene kiseline. Unatoč konstantnom, ali sporom rastu od početka uzgoja (0,21 g/100 mL), na kraju procesa je konačna koncentracija octene kiseline bila 1,55 g/100 mL. Glukonska kiselina bila je druga glavna organska kiselina pronađena u metabolizam *kombuche*, ali se stvarala u nižim koncentracijama od octene kiseline (0,85 g/100 mL). Povećana koncentracija glukonske kiseline rezultira sniženim pH hranjive podloge, odnosno smanjenjem intracelularne pH vrijednosti. Najmanje vrijednosti zabilježene su na kraju uzgoja u koncentraciji mliječne kiseline (0,45 g/mL).

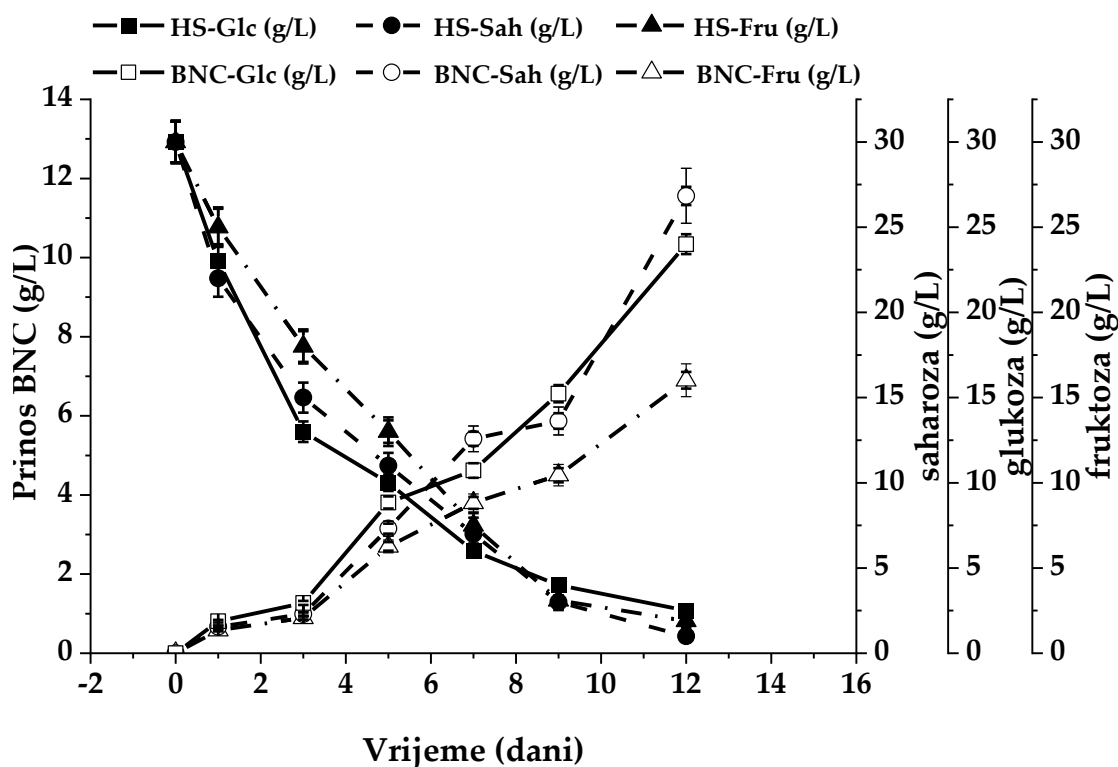


Slika 15. Promjena koncentracije ukupnih kiselina, octene, glukonske i mliječne kiseline tijekom fermentacije u KL podlozi

4.3. Sinteza BNC

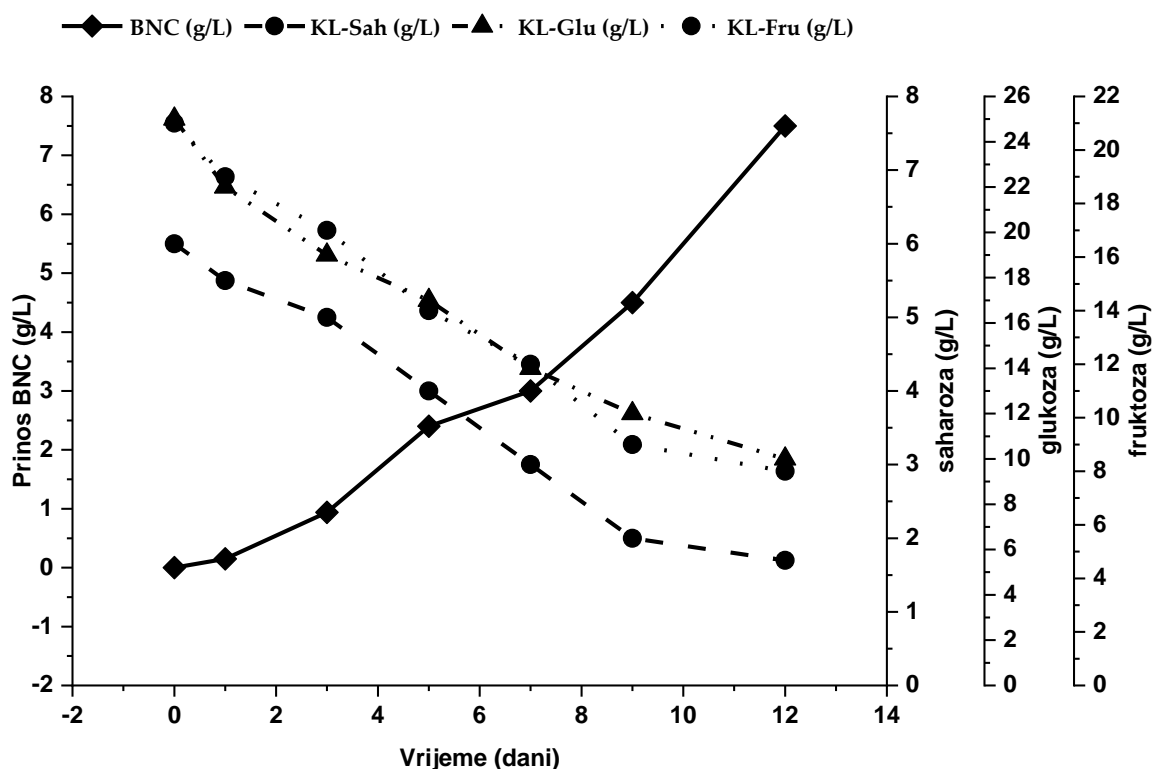
Uobičajeni čimbenici koji utječu na proizvodnju BNC-a uključuju hranjivu podlogu za rast, uvjete okoliša i stvaranje nusproizvoda. Izlučivanje egzopolisaharida (BNC) obično je najuočljivije kada su bakterije koje su proizvođači opskrbljene obilnim izvorima ugljika i minimalnim izvorima dušika (Chawla i sur., 2009). Početna koncentracija šećera i mnogi različiti čimbenici trebali bi utjecati na koncentraciju svakog metabolita proizvedenog u *kombuchi* i kemijski sastav proizvoda.

Učinak različitih izvora ugljika iz kemijski definirane (HS) hranjive podloge, odnosno monosaharida (3 % (tež/vol) glukoze i 3 % (tež/vol) fruktoze) i disaharida (3 % tež/vol) saharoze), na suhu tvar i prinos proizvedenog BNC prikazan je na slici 16. Budući da različite bakterije imaju različite enzimske i metaboličke sustave, mogu koristiti različite izvore ugljika za rast i proizvodnju BNC uz različitu učinkovitost. Povećana proizvodnja BNC mogla bi ovisiti o učinkovitom korištenju izvora ugljika. Iako su strukturno vrlo slične, glukoza i fruktoza dale su iznenađujuće različite prinose BNC. Glukoza i saharoza stalno su proizvodile visoke prinose BNC dok je fruktoza davala mnogo niže prinose (slika 16). Kako je proizvodnja BNC razmjerna rastu stanica, moguće je da se fruktoza ne može iskoristiti za rast stanica tako učinkovito kao glukoza (Tabai i Entiazi, 2016).



Slika 16. Dinamika potrošnje šećera i BNC sinteze u modificiranoj HS hranjivoj podlozi

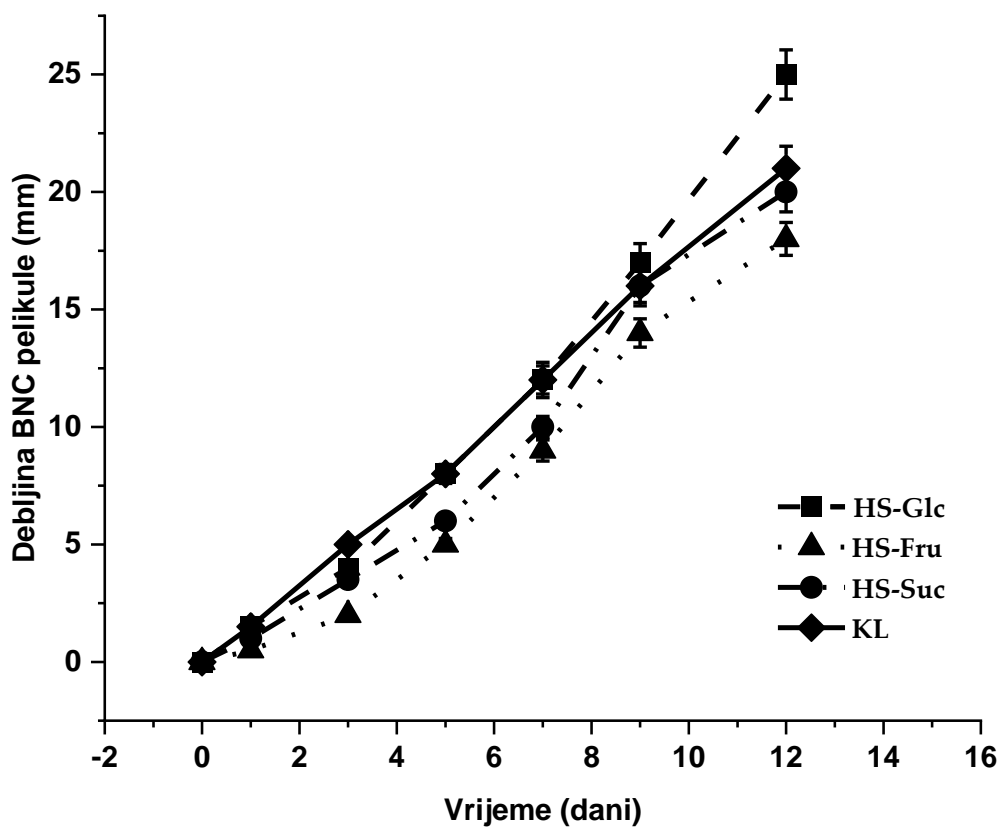
Isti ciljevi su ispitivani na kompleksnoj (KL) podlozi s 0,6 % (tež/vol) saharoze te 2,5 % (tež/vol) glukoze i 2,1 % (tež/vol) fruktoze kao glavnim izvorima ugljika (slika 16). Zanimljivo je da je KL hranjiva podloga u početku sadržavala 2,1 % (tež/vol) glukoze, približno istu količinu kao i standardna HS podloga. Rezultati su pokazali da je sadržaj fruktoze tijekom fermentacije niži od sadržaja glukoze što sugerira da su stanice kvasca preferirale fruktozu kao izvor ugljika. Istraživanja Neffe-Skocinska i suradnika (2017) također pokazuju da je nakon 23-satne fermentacije *kombucha* čaja na 20-22 °C, 88 % fruktoze i samo 40 % glukoze metabolizirano u etanol. Čini se da tip metaboličke aktivnosti kvasaca određuje konverzije ovih šećera tijekom fermentacije. Stanice kvasca i AAB koriste supstrate za fermentaciju na različite i komplementarne načine. AAB koristi glukozu za proizvodnju glukonske kiseline i etanol za proizvodnju octene kiseline (Jayabalan i sur., 2014). Precizan mehanizam biokemijskih promjena tijekom fermentacije zašećerenih hranjivih podloga sa simbiotskim sustavom kvasac-AAB je složen pa redoslijed i detaljna slika tih promjena nisu u potpunosti razumljivi.



Slika 17. Dinamika potrošnje šećera i BNC sinteze u KL hranjivoj podlozi

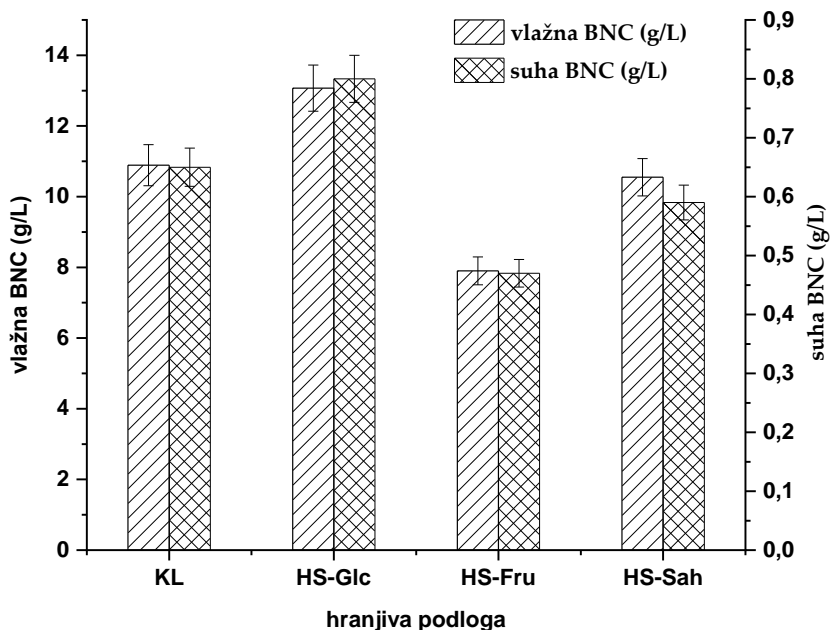
Slika 18 ilustrira debljinu sintetizirane BNC pelikule (mm) prema dodanom izvoru ugljika. Prvi, oku vidljiv tanki sloj sintetizirane pelikule uočen je već prvog dana uzgoja. Visina sloja BNC stalno se povećavala do kraja uzgoja. Debljina KL-BNC pelikule linearno se povećavala do

sedmog dana (12 mm), nakon čega je uočena blaga stagnacija u porastu debljine koja se nastavila do kraja uzgoja (21 mm). Najveća brzina sinteze i debljina BNC pelikule postignuta je u mediju HS-Glc, gdje je debljina na kraju kultivacije iznosila 25 mm. BNC sintetizirana u HS-Fru imala je najmanju debljinu pelikule na kraju uzgoja (18 mm), uz blagu stagnaciju u porastu 11. dana uzgoja. Sinteza BNC u HS-Suc supstratu bila je najsporija prva tri dana, s debljinom pelikule od samo 2 mm, nakon čega je linearno rasla i na kraju procesa dostigla vrijednost od 20 mm. BNC s različitim debljinama imaju različit potencijal primjene. Kontrola ovog parametra može biti važna za odabir njihove primjene, a postiže se jednostavnim izborom izvora ugljika.



Slika 18. Kinetika sinteze BNC pelikula u kemijski definiranim (HS) i kompleksnoj (KL) hranjivim podlogama

Ne postoji izravna veza između mase (moke ili suhe) i debljine BNC pelikule. U ovom radu debljina BNC sintetizirane u podlozi s čistom glukozom bila je niža od one dobivene iz složenih KL izvora ugljika, ali BNC iz kompleksne hranjive podloge imala je veću suhu masu nego iz HS-Glc podloge (slika 19). To je vjerojatno bilo povezano s različitom strukturom BNC pelikula proizvedenih u podlogama s različitim izvorima ugljika.



Slika 19. Učinak različitih izvora ugljika na sadržaj vlage sintetiziranih BNC pelikula

4.4. Učinak površine i dubine medija kulture na proizvodnju BNC-a

S obzirom na proizvodnju BNC, bitno je naglasiti da sastav hranjive podloge, pH vrijednost i temperatura nisu jedini čimbenici koji utječu na ukupni prinos pelikule. Čimbenici kao što su oblik posude ili bioreaktora, površina i volumen za statični uzgoj kulture također su bitni. Kada se uzgaja u statičnim uvjetima, BNC formira debelu ovojnicu na granici zrak-tekućina jer aerobne bakterije proizvode nanocelulozu samo na površini podloge (Zhong, 2020). Kada BNC pelikula pluta na površini, sintetizira se sve dok površina otopine nije u potpunosti prekrivena. Nakon toga se sintetizira pelikula sloj po sloj. Optimalna aeracija ili zračni kontakt hranjive podloge određen je omjerom površine/volumena i dubine (a/h) te predstavlja bitan čimbenik koji utječe na sintezu BNC u statičnom uzgoju kulture. Za postizanje različitih površina korištene su staklenke različitih veličina i volumena. Kada je korišten mali volumen podloge (250 mL), dubina u staklenci bila je mala, a BNC je proizvedena samo kao tanki sloj i bila je ograničenog prinosa. S većim volumenima od 720 mL do 1000 mL postignuti su bolji odnosi između površine i prinosa BNC (tablica 3).

Tablica 3. Utjecaj omjera površine i dubine hranjive podloge na prinos BNC nakon 12 dana uzgoja u kompleksnoj (KL) i kemijski definiranim podlogama (HS)

Hranjiva podloga	Volumen posude (mL)	Volumen podloge (mL)	Konc. šećera (g/L)	Promjer posude (cm)	Dubina (cm) h	Površina (cm ²) a	Odnos a/h	Debljina BNC (mm)
HS-Glu	720	250	30	14	8	153,94	19,24	26
HS-Fru	720	250	30	14	8	153,94	19,24	18
HS-Sah	720	250	30	14	8	153,94	19,24	22
KL1	720	250	52	14	8	153,94	19,24	25
KL2	1000	300	52	10	9	153,94	8,73	21
KL3	1000	300	52	14	18,5	153,94	8,32	18

Učinak dubine hranjive podloge na proizvodnju BNC ispitan je sintetiziranjem pelikule u staklenkama i tikvicama različitih volumena i dubina (tablica 3). Kad je dubina hranjive podloge za fermentaciju bila značajno različita (npr. 8 cm i 18,5 cm), proizvodnja BNC uglavnom je ovisila o volumenu podloge. Dobiveni rezultati slažu se s Goh i suradnicima (2012) koji su otkrili da se u dubokim spremnicima sintetizira manja količina BNC. Količina zarobljenog ugljičnog dioksida mogla bi objasniti ova opažanja o veličini pelikule. Što je hranjiva podloga dublja, to se više ugljičnog dioksida nakuplja u ovojnici. Pelikula je manje aerobna pa su rast stanica i stvaranje pelikule inhibirani jer su bakterije octene kiseline obvezni aerobi. Stoga je omjer površine/dubine hranjive podloge vitalan u sintezi BNC.

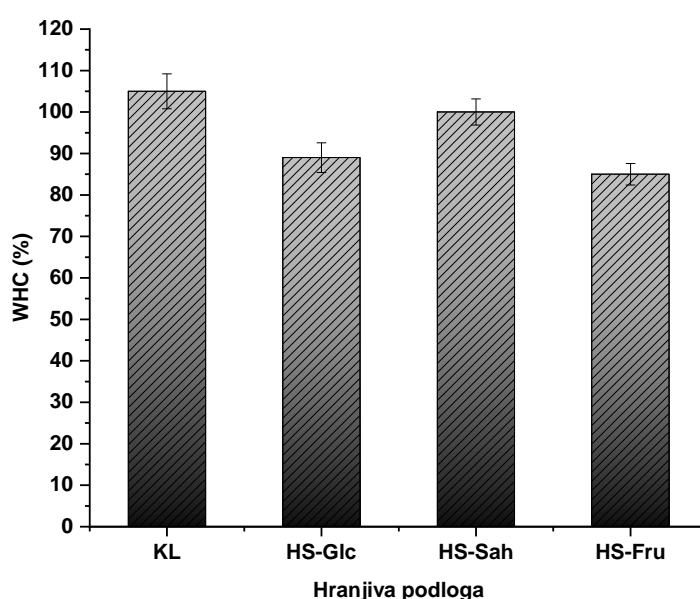
4.5. Kapacitet zadržavanja vode (WHC), brzina ispuštanja vode (WRR) i vrijednost apsorpcije joda (ISV)

BNC ima mnoga intrinzična svojstva koja ju čine idealnom za zaštitu ozlijeđenog tkiva tijekom previjanja i regeneraciju rana, posebno za opekline tkiva i kao privremenu zamjenu za oštećeno tkivo. Može zadržati vlagu, apsorbirati eksudat iz rane i ubrzati granulaciju te omogućiti laku i bezbolnu promjenu obloga bez oštećenja novonastale kože. To je ključno jer prodiranje djelatnih tvari u ranu olakšava vlažna okolina (Gorgieva i Trček, 2019).

Kapacitet zadržavanja vode (WHC) i brzina otpuštanja vode (WRR) najvažnija su fizička svojstva BNC pelikula s obzirom na biomedicinsku primjenu BNC kao materijala za zavoje. Varijacije između WHC-a povezane su s poroznošću i površinom svake BNC pelikule. Što je

veća površina i veličina pora, značajnija se količina vode veže u BNC matrici. Slike 20 i 21 prikazuju WHC i WRR svojstva BNC sintetiziranih u istraživanim hranjivim podlogama.

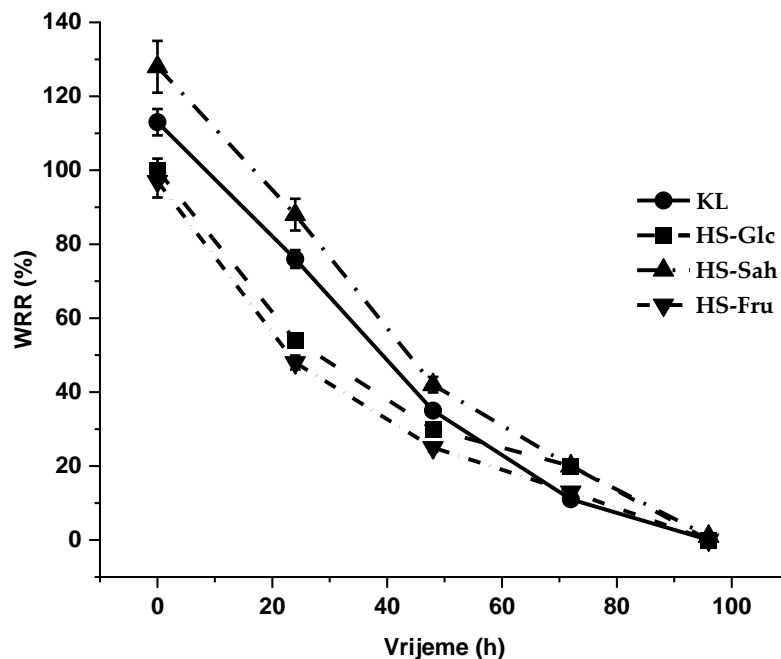
Prema dobivenim rezultatima WHC BNC sintetizirana u KL podlozi je pokazala najveću sposobnost zadržavanja vode ($105 \pm 4,2$ %), a BNC sintetizirana u HS-Sah je pokazala neznatno manju sposobnost ($100,1 \pm 3,16$ %). Uzorci BNC sintetizirani u HS-Glc ($89 \pm 3,57$ %) i HS-Fru ($85 \pm 2,61$ %) bili su podjednaki, no imali su niži kapacitet zadržavanja vode (slika 20). Količina molekula vode koje prodiru kroz nanoceluloznu matricu i difundiraju u amorfna područja uglavnom ovisi o snazi fizičke adsorpcije te veličini i broju pora u BNC pelikulama (Fijalkowski i sur., 2016).



Slika 20. Kapacitet zadržavanja vode (WHC) u BNC sintetizirane u različitim hranjivim podlogama

Sposobnost otpuštanja vode drugo je važno svojstvo pelikule BNC. Na slici 21 prikazana je kinetika otpuštanja vode iz uzoraka BNC tijekom 96 sati pokusa. Iz slike je vidljivo da je izmjereni specifični udjel vode (g BNC/g uzorka) u početku bio najveći u uzorku sintetiziranom u HS-Sah podlozi ($128 \pm 4,2$ g/g), slijedila ga BNC iz KL podloge ($113 \pm 3,57$ g/g) te HS-Glc s $100 \pm 3,15$ g/g. Najmanja početna vrijednost je izmjerena u uzorku ugojenom na fruktozi ($97 \pm 4,35$ g/g). Nakon 72 sata pokusa vrijednosti su bile potpuno jednake za BNC iz HS-Glc i HS-Sah ($20 \pm 0,6$ g/g i $20 \pm 1,1$ g/g) dok su BNC uzorci iz HS-Fru i KL pokazali niže vrijednosti ($13 \pm 0,65$ g/g i $11 \pm 0,45$ g/g). U svim je istraživanim uzorcima apsorbirana voda za 96 sati potpuno evaporirala (ishlapila) što je pokazalo da nije ostalo vode vezane u BNC matriksu. Izlazak molekula vode iz BNC matriksa uglavnom ovisi o rasporedu mikrovlakana. Gusto umrežena mikrovlakna vežu molekule vode puno učinkovitije zbog jačih interakcija među

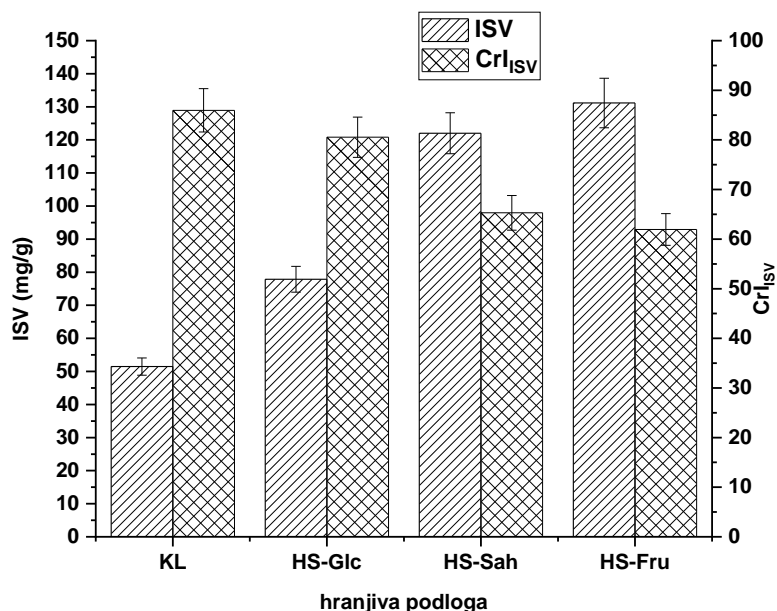
vodikovim vezama u strukturi nanoceluloznog matriksa. Prema literaturnim podacima i kapacitet zadržavanja vode (WHC) i brzina otpuštanja vode (WRR) jako su ovisni o strukturnim značajkama BNC, posebice o veličini i ukupnom volumenu pora. Uzorci s manjim promjerima pora mogu zadržati vodu u matriksu duže vrijeme, ali veći promjer pora znači da će uzorak akumulirati više vode i time povećati kapacitet zadržavanja vode (Ul-Islam i sur., 2012).



Slika 21. Brzina otpuštanja vode (WRR) u BNC sintetizirane u različitim hranjivima podlogama

Poznato je da su adsorpcijska svojstva BNC vlakana usko povezana s udjelom amorfnih područja u vlaknima. Test apsorpcije joda općenito se smatra empirijskom metodom za mjerenje pristupačnosti amorfnih dijelova nanoceluloze prema vodenim otopinama. U početku je predložen kao metoda za određivanje stupnja mercerizacije. Kasnije je primjena proširena na određivanje kristaliničnosti celuloznih vlakana (Nikolić i sur., 2018). Vrijednost apsorpcije joda (ISV) predstavlja količinu joda apsorbiranog iz jednog grama nanoceluloznog supstrata. S obzirom da se jod inkorporira u amorfne dijelove BNC, inverzna vrijednost jodnog broja je razmjerna kristaliničnim dijelovima BNC i izražava se kao indeks kristaliničnosti (CrI_{ISV}). Jod se veže samo za manje uređena amorfna područja BNC pelikule, stoga se količina apsorbiranog joda smanjuje s povećanjem kristaliničnosti. Slika 22 predstavlja ISV vrijednosti (mg/g) i izračunati indeks kristaliničnosti (CrI_{ISV}) BNC sintetiziranih u hranjivim podlogama s različitim izvorima ugljika. ISV vrijednosti pokazale su da je najmanja količina joda vezana za

KL BNC ($51,48 \pm 2,61$ mg/g), a najveća za HS-Fru BNC ($131,15 \pm 7,5$ mg/g) i HS-Sah BNC ($122,0 \pm 6,2$ mg/g). HS-Glc BNC vezala se 30 % više nego KL BNC, $77,87 \pm 3,91$ mg/g.

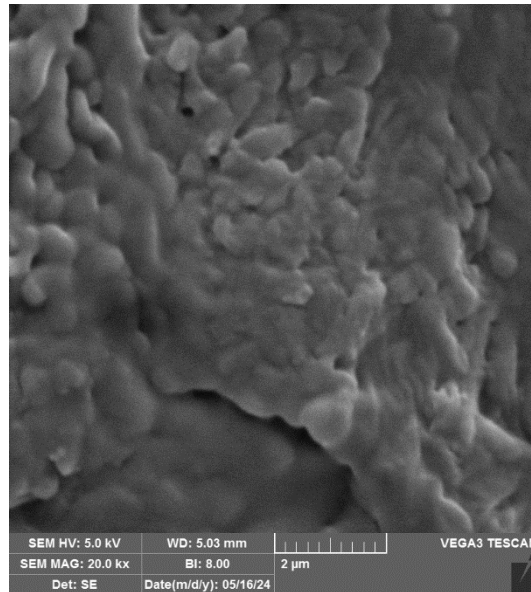


Slika 22. Vrijednosti apsorpcije joda (ISV) i indeks kristaliničnosti (CrI_{ISV}) BNC sintetizirane u različitim hranjivima podlogama

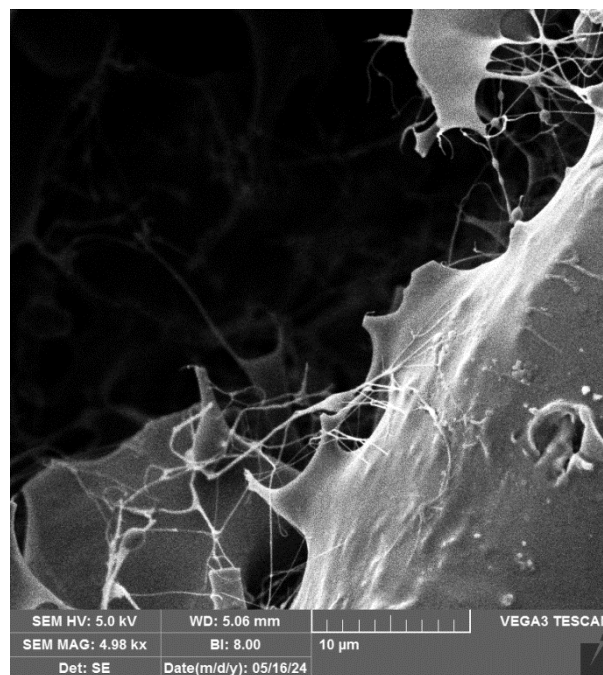
4.6. Morfologija BNC (SEM)

Makroskopski izgled BNC pelikula sintetiziranih na KL i HS podlogama bio je sličan, vidljiv u obliku želatinoznih pelikula formiranih na površini tekuće faze podloge kulture. BNC proizvedena statičnim uzgojem je hidrogelna opna s trodimenzionalnom (3D) mrežastom strukturom koja se može promatrati pod elektronskim mikroskopom (Tsuoko i sur., 2015).

Do danas se fermentacija *kombucha* napitka prvenstveno oslanjala na autohtonu mikrobiotu ugrađenu u BNC pelikulu (biofilm). Novi slojevi nastaju tijekom svakog dana fermentacije, neovisno o tome radi li se o autohtonoj simbiotskoj kulturi ili čistoj kulturi bakterija octene kiseline uz dodatak autohtone mikrobiote iz kompleksne kemijske podloge. Populacije AAB bile su posebno aktivne u plutajućem biofilmu budući da je za tu skupinu primijećen najveći porast populacije. Morfološke strukture proizvedenih BNC pelikula analizirane su pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) (slike 23 i 24). Mikrografija slike 23 prikazuje stanice kvasca sferičnog oblika i stanice Gram-negativnih bakterija štapićastog oblika (AAB). Snopovi nanoceluloznih mikrofibrila promatrani su izravno s površine stanice tvoreći trodimenzionalnu ovojniciu na granici zrak-tekućina (slika 24).



Slika 23. SEM fotografija uzorka BNC sintetizirane u KL hranjivoj podlozi s vidljivom mikrobiotom na površini pelikule

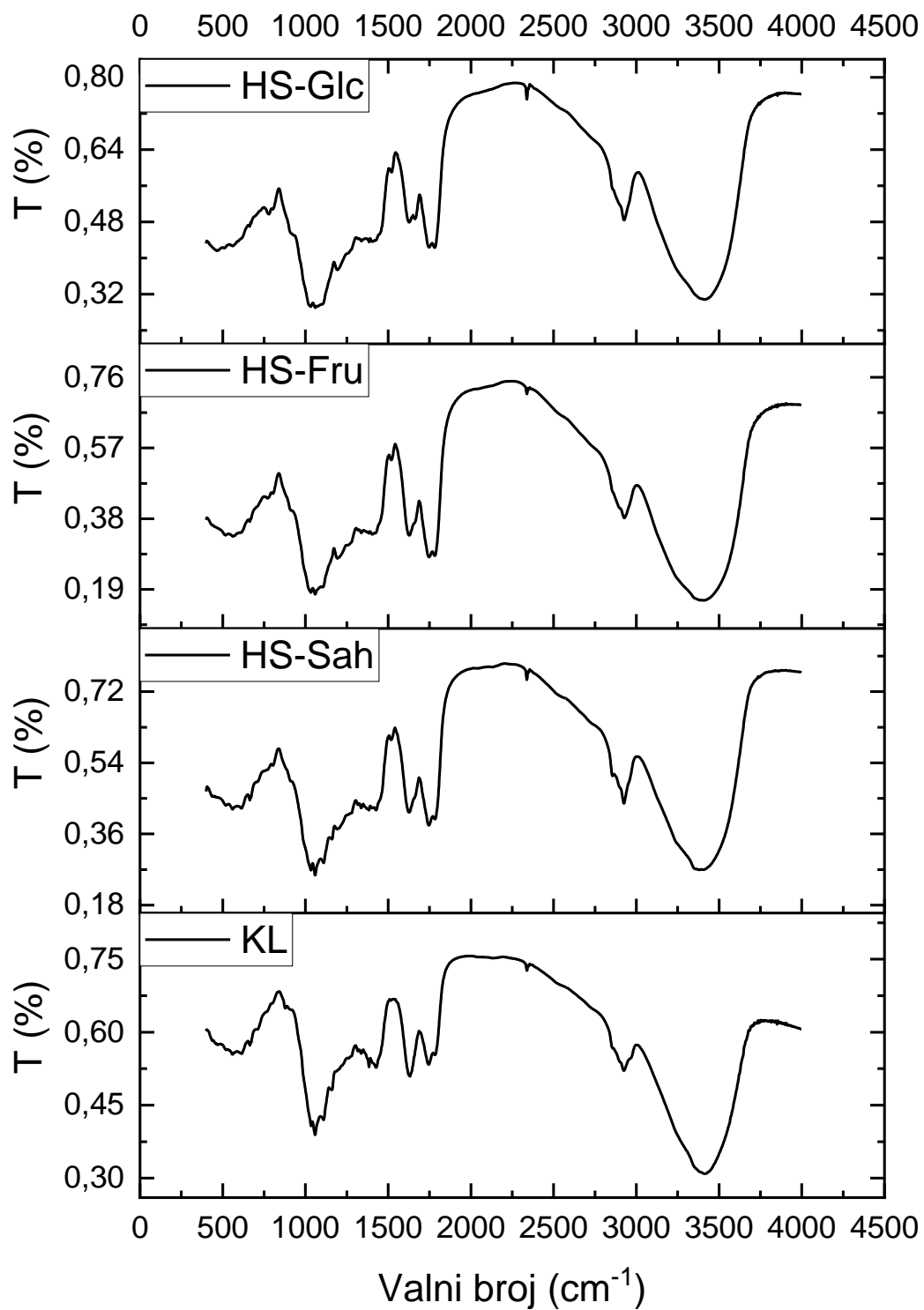


Slika 24. SEM fotografija 3D nanocelulozne strukture BNC sintetizirane u KL hranjivoj podlozi

4.7. FT-IR spektroskopska analiza

Infracrveni spektri Fourierove transformacije (FT-IR) BNC uzoraka analizirani su kako bi se dobio uvid u različitost morfologije i strukture BNC proizvedenih u različitim hranjivim podlogama. Svi spektri pokazuju karakteristične trake kristalinične strukture celuloze I. Slika 25 prikazuje spektar između 400 i 4000 cm^{-1} koji sadrži nekoliko različitih područja. Ta područja

sadrže vrhove pojedinačnih kemijskih vibracijskih traka tipičnih za IR spektre snimljene iz nanoceluloze bakterijskog podrijetla i relevantne za mjerenje kristaliničnosti BNC pelikula. Područje vodikovih veza na desnoj strani BNC spektra proteže se od 3800 do 3000 cm^{-1} i prikazuje odaziv koji se pripisuje O-H vibracijama rastezanja celuloze I. Vrlo uski vrh na 3408 cm^{-1} predstavlja prisutnost intramolekularnih vodikovih veza (Cichosz i Masek, 2020). Apsorpcijska vrpca na 2896 cm^{-1} povezana je s asimetričnim C-H rastezanjem alifatskih CH_2 i CH_3 skupina. Vibracije istežanja hidroksilnih skupina alkohola pojavljuju se kao široke apsorpcijske trake u rasponu od 3600 do 3200 cm^{-1} . Slobodna hidroksilna skupina je registrirana kao uska traka na oko 3600 cm^{-1} , a obično se opaža kao široki signal koji odražava vodikovu vezu između hidroksilnih skupina molekula alkohola. U IR spektrima sva četiri uzorka vidljiva je apsorpcijska vrpca na 3350 cm^{-1} koja se odnosi na hidroksilnu skupinu. Intenzitet ovog apsorpcijskog pojasa je jak i širok što može ukazivati na prisutnost slobodnih hidroksilnih skupina u spojevima ispitivanih uzoraka. Alkani (zasićeni spojevi) pokazuju apsorpcijske trake između 2800 i 3000 cm^{-1} budući da je ovaj raspon karakterističan za frekvencije rastezanja C-H veze. Trake slabog intenziteta oko 2936 cm^{-1} nalaze se u sva četiri uzorka što je posljedica frekvencije rastezanja C-H veze. Još jedan relativno intenzivan vrh nalazi se na 1626 cm^{-1} što odgovara vibraciji savijanja molekula vode (H-O-H) apsorbiranih u strukturi BNC. Najkompleksnije područje BNC FT-IR spektra je područje koje se kreće od 1430 cm^{-1} do oko 850 cm^{-1} . Dva karakteristična signala pri 1430 cm^{-1} i 1348 cm^{-1} pripisuju se simetričnom istežanju CH_2 i vibracijama CH_2 skupina izvan ravnine. Prema literaturnim podacima apsorpcijski pojas na 1430 cm^{-1} pripisuje se visoko uređenim (kristaliničnim) područjima BNC pelikule (Abol-Fotouh i sur., 2020). FT-IR spektri pokazuju četiri intenzivna signala u području od 1160 cm^{-1} do 1040 cm^{-1} koji odgovaraju C-O-C antisimetričnom rastežanju β -1,4-glikozidne veze, C-C i C-O vibracijama istežanja i C-O-H savijanju ugljikohidrata. Apsorpcijske vrpce u dijelu spektra od 1100 do 1030 cm^{-1} odgovaraju frekvenciji rastezanja jednostruke C-O veze. U svim uzorcima apsorpcijska vrpca srednje jakosti je oko 1042 cm^{-1} , a može se pripisati eterskoj vezi prisutnoj u ugljikohidratima. Uzak vrh na 837 cm^{-1} , poznat kao "amorfnu traku", povezan je s izvanfaznim rastežanjem prstena β -1,4-glikozidnih veza u strukturi sintetiziranih BNC. Konačno, između 850 i 400 cm^{-1} je područje koje sadrži višestruke trake koje odgovaraju savijanju i rotaciji teških atoma. Dodijeljena apsorpcijska vrpca vrlo slabog intenziteta na 669 cm^{-1} u spektrima svih uzoraka potvrđuje prisutnost β -1,4-glikozidne veze (Wang i sur., 2018).



Slika 25. FT-IR spektri BNC pelikula sintetiziranim u HS i KL hranjivim podlogama

5. ZAKLJUČCI

1) *Kombucha* je nutritivno vrijedni napitak vrlo složenog sastava. Glavni proizvodi mikrobnog metabolizma su organske kiseline (octena, glukonska i mliječna) te bakterijska nanoceluloza (BNC) koja se sintetizira u obliku tanke opne (pelikule) i oblikuje na površini napitka.

2) Uzgoj BNC proveden je u statičnim uvjetima tijekom 12 dana fermentacije. Istraživanja su provedena u kemijski definiranim Hestrin-Schramm podlogama uz dodatak 30 g/L glukoze, fruktoze i saharoze te kompleksnoj podlozi s dodatkom kore lubenice. Koncentracija šećera u kompleksnoj podlozi bila je 25 g/L glukoze, 21 g/L fruktoze i 6 g/L saharoze.

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

4) Površina posude za uzgoj i dubina hranjive podloge značajno utječe na prinos BNC. Fermentacija se treba odvijati u plitkim posudama sa širokim grlom zbog što boljeg otapanja kisika iz zraka za bakterije octene kiseline koje su odgovorne za sintezu BNC.

5) Učinkovitost BNC da apsorbira ili otpusti velike količine tekućine izričito ovisi o strukturnim značajkama, posebice o specifičnoj površini i ukupnom volumenu te poroznosti strukture.

6) FT-IR spektroskopskom analizom dokazana je pretežito kristalinična struktura BNC pelikula u svim istraživanim uzorcima.

6. LITERATURA

AOAC, (2005) Official methods of analysis, 18th edition. Association of Official Analytical Chemists. Washington DC, USA. A.A.C.C. Approved Method of the AACC, 2000. 10th Edition. American Association of Cereal Chemists. Incorporated Saint Paul Minnesota, USA

Abol-Fotouh D, Hassan MA, Shokry H, Roig R, Azab MS, Kashyout AB (2020) Bacterial nanocellulose from agro-industrial wastes: Low-cost and enhanced production by *Komagataeibacter saccharivorans* MD1. *Sci Rep* **10**, 3491. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60315-9>.

Beluhan S, Herceg F, Leboš Pavunc A, Djaković S (2022) Preparation and Structural Properties of Bacterial Nanocellulose Obtained from Beetroot Peel Medium. *Energies* **15**, 9374. <https://doi.org/10.3390/en15249374> (2022)

Beluhan S, Mihajlovski K, Šantek B, Ivančić Šantek M (2023) The Production of Bioethanol from Lignocellulosic Biomass: Pretreatment Methods, Fermentation, and Downstream Processing. *Energies* **16**, 7003. <https://doi.org/10.3390/en16197003>

Blanco A, Consencion Morte M, Campano C, Balea Martin A (2018) Nanocellulose for Industrial Use: Cellulose Nanofibers (CNF), Cellulose Nanocrystals (CNC), and Bacterial Cellulose (BC). U: Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications (str.74-126). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813351-4.00005-5>

Chawla PR, Bajaj IB, Survase SA, Singhal RS (2009) Microbial cellulose: Fermentative production and applications (Review). *Food Technol Biotechnol* **47**, 107–124.

Cichosz S, Masek A (2020) IR Study on Cellulose with the Varied Moisture Contents: Insight into the Supramolecular Structure. *Materials* **13**, 4573. <https://doi.org/10.3390/ma13204573>.

Costa AFS, Almeida FCG, Vinhas GM, Sarubbo LA (2014) Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter Hansenii* Using Corn Steep Liquor as Nutrient Sources. *Front Microbiol* **8** (2027), 2027–2112. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02027>

Fijałkowski K, Zywicka A, Drozd R, Kordas M, Rakoczy R (2016) Effect of *Gluconacetobacter xylinus* cultivation conditions on the selected properties of bacterial cellulose. *Pol J Chem Technol* **18**, 116–122. <https://doi.org/10.1515/pjct-2016-0080>.

Goh WN, Rosma A, Kaur B, Fazilah A, Karim AA, Bhat R (2012) Microstructure and physical properties of microbial cellulose produced during fermentation of black tea broth (Kombucha). II. *Int Food Res* **19**, 153–158.

Gorgieva S, Trček J (2019) Bacterial Cellulose: Production, Modification and Perspectives in Biomedical Applications. *Nanomaterials* **9**, 1352. <https://doi.org/10.3390/nano9101352>

Gromovikh TI, Pigaleva MA, Gallyamov MO, Ivanenko IP, Ozerova KE, Kharitonova EP, Bahman M, Feldman NB, Lutsenko SV, Kiselyova OI (2020) Structural organization of bacterial cellulose: The origin of anisotropy and layered structures. *Carb Pol* **237**, 116140. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116140>

Gullo M, La China S, Falcone PM, Giudici P (2018) Biotechnological Production of Cellulose by Acetic Acid Bacteria: Current State and Perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* **102**, 6885–6898. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9164-5>.

Halib, N., Amin, M. C. I. M., Ahmad, I. (2012). Physicochemical properties and characterization of nata de coco from local food industries as a source of cellulose. *Sains Malaysiana* **41** (2), 205–211.

Han T, New N, Win P (2018) Bacterial Cellulose and its Applications. *Handbook of Biopolymers* **18**, 183–222. <https://doi.org/10.1201/9780429024757-8>

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

Huang Y, Zhu C, Yang J, Nie Y, Chen C, Sun D (2014) Recent Advances in Bacterial Cellulose. *Cellulose* **21**, 1–30. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0088-z>

Islam SU, Ul-Islam M, Ahsan H, Ahmed MB, Shehzad A, Fatima A i sur. (2021) Potential Applications of Bacterial Cellulose and its Composites for Cancer Treatment. *Int J Biol Macromolecules* **168**, 301–309. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.042>

Jadhav P, Sonne M, Kadam A, Patil S, Dahigaonkar K, Oberoi JK (2018) Formulation of cost effective alternative bacterial culture media using fruit and vegetables waste. *Int J Curr Res Rev* **10**, 6–15. <https://doi.org/10.7324/IJCRR.2018.1022>.

Jayabalan R, Malbaša RV, Lončar ES, Vitas JS, Sathishkumar M (2014) A review on Kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxic-ity, and tea fungus. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **13**, 538–550. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>

Kamal T, UI-Islam M, Fatima A, Ullah MW, Manan S (2022) Cost-Effective Synthesis of Bacterial Cellulose and Its Applications in the Food and Environmental Sectors. *Gels* **8**, 552. <https://doi.org/10.3390/gels8090552>

Khirrudin MS (2012) Production of Bacterial Cellulose: Effect of Different Mediums and Modes of Operation. Doktorska dizertacija. Universiti Malaysia, Pahang, Malaysia.

Klemm D, Kramer F, Moritz S, Lindström T, Ankerfors M, Gray D, Dorris A (2018) Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials. *Angewandte Chemie International Edition*, **50**(24), 5438–5466. <https://doi/10.1002/anie.201001273>

Mishra S, Singh PK, Dash S, Pattnaik R (2018) Microbial Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Enhanced Biomethanation and Waste Management. *3 Biotech* **8**, 458–470. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1480-z>

Mishra S, Singh PK, Pattnaik R, Kumar S, Ojha SK, Srichandan H, Parhi PK, Jyothi RK, Sarangi PK (2022) Biochemistry, Synthesis, and Applications of Bacterial Cellulose: A Review. *Front Bioeng Biotechnol* **10**, 780409. doi: 10.3389/fbioe.2022.780409

Moraes PRFdS, Saska S, Barud H, Lima LRd, Martins VdCA, Plepis AMdG i sur. (2016) Bacterial Cellulose/collagen Hydrogel for Wound Healing. *Mat Res* **19**, 106–116. <http://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2015-0249>

Naomi R, Idrus RBHJ, Busra Fauzi MH (2020) Plant vs. Bacterial-Derived Cellulose for Wound Healing: A Review. *Int J Environ Res Public Helath* **17**, 6803. doi:10.3390/ijerph17186803

Neffe-Skocińska K, Sinek B, Ścibisz I, Kołożyn-Krajewska D (2017) Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physico-chemical, microbiological and sensory properties. *CYTA J Food* **15**, 601–607. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1321588>.

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

Neo KRS, Yang KL (2015) Continuous Hydrolysis of Carboxymethyl Cellulose with Cellulase Aggregates Trapped inside Membranes. *Enzyme Microb Technol* **78**, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.06.005>

Nikolić T, Hajrih T, Kramar A, Petronijević Z, Košić M (2018) Influence of periodate oxidation on sorption properties of viscose yarn. *Cellul Chem Technol* **52**, 459–467.

Puspawati NN, Arihantana NMIH (2016) Viability of lactic acid bacteria isolated from kombucha tea against low ph and bile salt. *Sci J Food Technol* **3**, 18–25.

Sanwal N, Gupta A, Bareen MA, Sharma N, Sahu JK (2023) Kombucha fermentation: Recent trends in process dynamics, functional bioactivities, toxicity management, and potential applications. *Food Chem Adv* **3**, 100421. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100421>

Seddigi H, Olicaci E, Hergamed H, Jin J, Gonzon LC, Bacabac RG, Klein-Nulend J (2021) Cellulose and its derivatives: towards biomedical applications. *Cellulose* **28**, 1983-1931. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03674-w>

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

Shi Z, Zhang Y, Phillips GO, Yang G (2014) Utilization of Bacterial Cellulose in Food. *Food Hydrocolloids* **35**, 539–545. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.012>

Taokaew S (2024) Bacterial Nanocellulose Produced by Cost-Effective and Sustainable Methods and Its Applications: A Review. *Fermentation* **10**, 316. <https://doi.org/10.3390/fermentation10060316>

Tabaai MJ, Emtiazi G (2016) Comparison of bacterial cellulose production among different strains and fermented media. *Appl Food Biotechnol* **3**, 35–41. <https://doi.org/10.22037/afb.v3i1.10582>.

Trache D, Hussin MH, Hui Chuin CT, Sabar S, Fazita MRN, Taiwo OFA i sur. (2016) Microcrystalline Cellulose: Isolation, Characterization and Bio- Composites Application-A Review. *Int J Biol Macromolecules* **93**, 789–804. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.056>

Tsouko E, Kourmentza C, Ladakis D (2015) Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams. *Int J Mol Sci* **16**, 14832–14849. <https://doi.org/10.3390/ijms160714832>.

Ullah H, Santos HA, Khan T (2016) Applications of Bacterial Cellulose in Food, Cosmetics and Drug Delivery. *Cellulose* **23**, 2291–2314. <https://doi.org/10.1007/s10570-016-0986-y>

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

Volova TG, Prudnikova SV, Sukovatyi AG, Shishatskaya EI (2018) Production and Properties of Bacterial Cellulose by the Strain *Komagataeibacter Xylinus* B 12068. *Appl Microbiol Biotechnol* **102**, 7417–7428. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9198-8>

Wang T, Yang H, Kubicki JD, Hong M (2016) Cellulose Structural Polymorphism in Plant Primary Cell walls Investigated by High-Field 2D Solid- State NMR Spectroscopy and Density Functional Theory Calculations. *Biomacromolecules* **17**, 2210–2222. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b00441>

Wang SS, Han YH, Chen JL, Zhang DC, Shi XX, Ye YX, Chen DL, Li M (2018) Insights into Bacterial Cellulose Biosynthesis from Different Carbon Sources and the Associated Biochemical Transformation Pathways in *Komagataeibacter* sp. W1. *Polymers* **10**, 963. <https://doi.org/10.3390/polym10090963>

Wu D, Li X, Shen C, Lu J, Chen J, Xie G (2014) Decreased Ethyl Carbamate Generation during Chinese rice Wine Fermentation by Disruption of CAR1 in an Industrial Yeast Strain. *Int J Food Microbiol* **180**, 19–23. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.007>

Xiao L, Mai Y, He F, Yu L, Zhang L, Tang H i sur. (2012) Bio-based green Composites with High Performance from Poly(lactic Acid) and Surface-Modified Microcrystalline Cellulose. *J Mater Chem* **22** (31), 15732–15739. <https://doi.org/10.1039/c2jm32373g>

Zhong C (2020) Industrial-Scale Production and Applications of Bacterial Cellulose. *Front. Bioeng Biotechnol* **8**, 605374. doi: 10.3389/fbioe.2020.605374

Zubaidah E, Dewantari FJ, Novitasari FR, Srianta I, Blanc PJ (2018) Potential of snake fruit (*Salacca zalacca* (Gaerth.) Voss) for the development of a beverage through fermentation with the *Kombucha* consortium. *Biocatal Agric Biotechnol* **13**, 198–203.

<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.12.012>.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Elena Klarić, izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Elena Klarić

Vlastoručni potpis