

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

*Ana Besednik, Ivana Hranić*

**Mikrostrukturalna, fizikalna i antimikrobna svojstva bakterijske celuloze  
(*kombucha*) proizvedene tijekom fermentacije zelenog čaja s jasminom i  
kokosovog mlijeka**

Zagreb, travanj 2017.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Sunčice Beluhan i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2016./2017.

## SADRŽAJ RADA:

1. UVOD.....	1
1.1. BAKTERIJSKA CELULOZA – IZVOR ČISTE CELULOZE.....	1
1.2. STRUKTURA BAKTERIJSKE CELULOZE.....	3
1.3. BIOSINTEZA BAKTERIJSKE CELULOZE.....	4
1.4. FERMENTACIJA.....	5
1.4.1. Biosinteza celuloze narazličitim izvorima ugljika.....	6
1.5. PRIMJENA BAKTERIJSKE CELULOZE.....	7
1.5.1. Biomedicina - terapija oštećene kože.....	9
1.5.2. Prehrambena industrija.....	10
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA.....	11
3. MATERIJALI I METODE.....	12
3.1. Priprava kulture <i>kombuche</i> .....	12
3.2. Hranjive podloge.....	12
3.2.1. Vrsta čaja.....	12
3.2.2. Kokosovo mlijeko.....	12
3.3. Priprava kompleksne podloge (fermentirani čaj).....	12
3.4. Određivanje pH vrijednosti.....	13
3.5. Određivanje koncentracije octene kiseline.....	13
3.6. Određivanje koncentracije glukonske kiseline.....	13
3.7. Određivanje alkohola kemijskom metodom.....	14
3.8. FT-IR spektroskopija.....	14
3.9. Difrakcija rendgenskim zrakama ( <i>eng.</i> X Ray Diffraction; XRD).....	14
3.10. Pretražna elektronska mikroskopija ( <i>eng.</i> Scanning Electron Microscopy; SEM).....	14
3.11. Izračunavanje mase i prinosa bakterijske celuloze.....	15
3.12. Određivanje kapaciteta zadržavanja vode ( <i>eng.</i> Water-Holding Capacity; WHC).....	15
3.13. Određivanje brzine otpuštanja vode ( <i>eng.</i> Water-Release Rate; WRR).....	16

3.14. Određivanje antimikrobnih svojstava bakterijske celuloze.....	16
4.REZULTATI.....	17
4.1. Organske kiseline i etanol .....	17
4.2. Promjena pH vrijednosti.....	21
4.3. Sinteza bakterijske celuloze .....	22
4.4. FT-IR spektroskopske analize .....	23
4.5. Difrakcija rendgenskih zraka .....	24
4.6. Pretražna elektronska mikroskopija .....	26
4.7. Zadržavanje i otpuštanje vode.....	28
4.8. Antimikrobno djelovanje .....	29
5.RASPRAVA .....	32
6.ZAKLJUČCI.....	35
7.ZAHVALE.....	36
8.POPIS LITERATURE .....	37
9.SAŽETAK .....	42
10.SUMMARY.....	43

# 1. UVOD

## 1.1. BAKTERIJSKA CELULOZA – IZVOR ČISTE CELULOZE

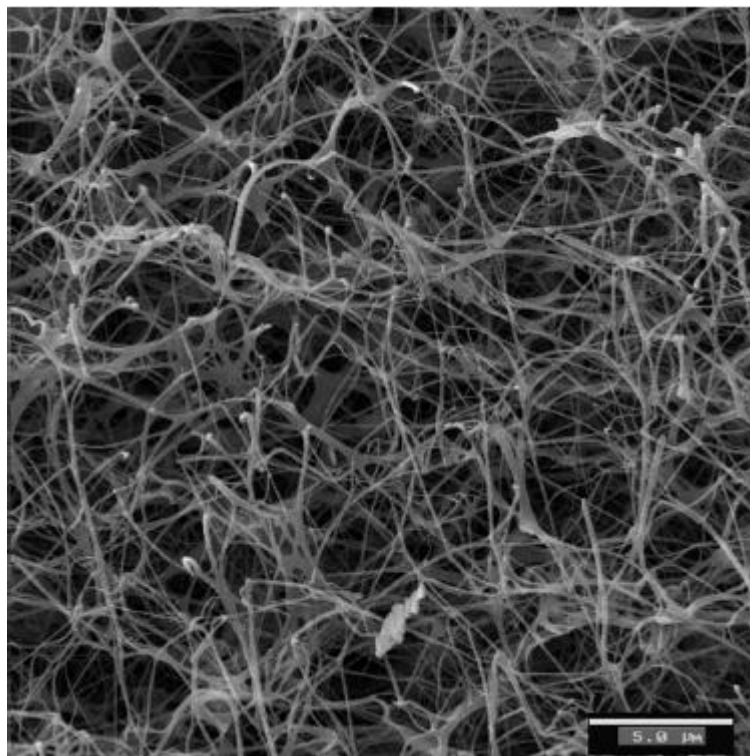
Celuloza je jedan od najzastupljenijih ugljikohidratnih biopolimera na Zemlji, sastavni je dio viših biljaka, nekih rodova bakterija, algi i viših gljiva (Siro i Plackett, 2010). Ovaj polimer u čijoj su strukturi sastavni dijelovi hemiceluloza i lignin, mora se podvrgnuti kemijskim procesima hidrolize s jakim lužinama i kiselinama da bi se dobio čisti proizvod (Sun, 2008). Zbog povećanja potražnje za derivatima biljne celuloze povećana je i potrošnja drveta kao sirovine, što je rezultiralo krčenjem šuma i postalo globalnim okolišnim problemom (Park i sur., 2003).

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 kristaliničnost te biokompatibilnost (Keshk, 2014). Rezultati prethodnih istraživanja su jasno pokazali da bakterijska celuloza i njezine preradevine imaju ogromni potencijal za primjenu u biotehnologiji i biomedicini (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).

*Acetobacter xylinum* je najviše proučavana bakterija octene kiseline jer je znanstveno dokazano da najučinkovitije sintetizira bakterijsku celulozu (El-Saied i sur., 2004), a može asimilirati različite šećere i sintetizirati velike količine celuloze u tekućoj podlozi (Ross i sur., 1991; Sani i Dalman, 2010; Moosavi-Nasab i Yousefi, 2011). 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 visoki 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 *Acetobacter* lišena je drugih polisaharida koji su sastavni dio strukture i njezino izoliranje i pročišćavanje su relativno jednostavni, te ne zahtijevaju energetske ili kemijske intenzivne procese. Nadalje, ekološki problemi zbog nusproizvoda nakon obrade 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 vrste *Acetobacter xylinum* (prema novijoj taksonomiji *Gluconobacter xylinus*) sintetizira velike količine celuloze u obliku mikrovlakana iz reda sintetskih mjesta duž uzdužne osi stanice (Ross i sur., 1991; Tanaka i sur., 2000). Sintetizirana mikrovlakna se spajaju, pri čemu tvore strukturu umreženih celuloznih vlakana (Slika 1).

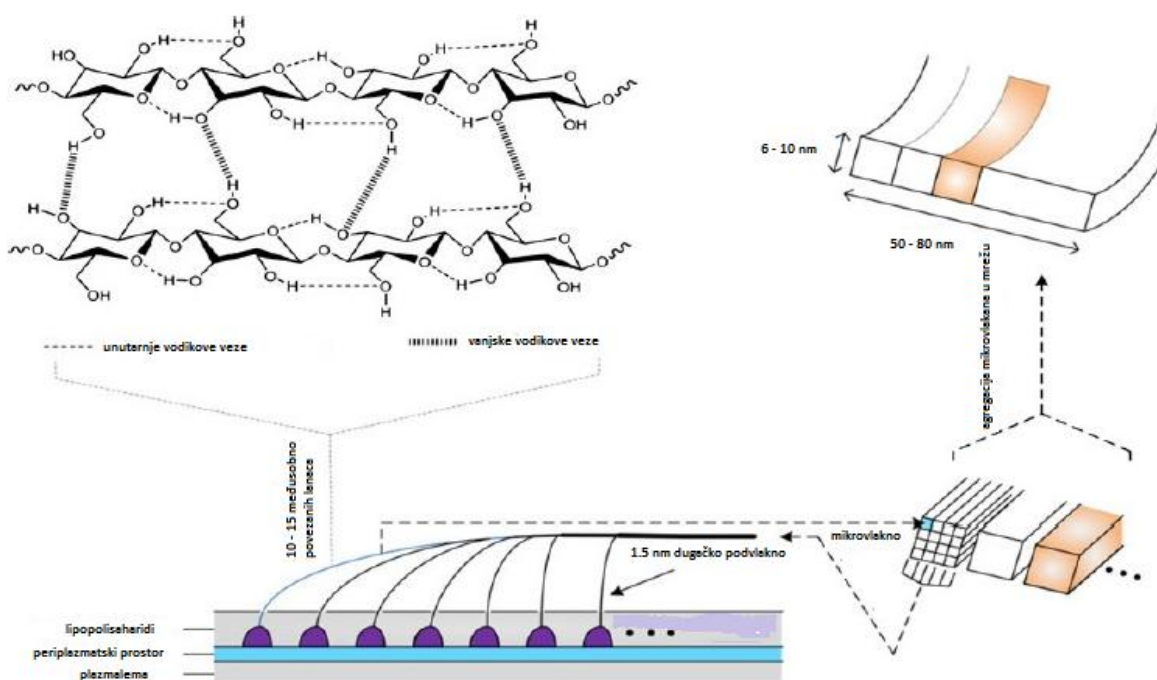


**Slika 1.** SEM snimka uzorka bakterijske celuloze koja prikazuje povezanu 3-D mrežu celuloznih vlakana (Torres i sur., 2012)

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

## 1.2. STRUKTURA BAKTERIJSKE CELULOZE

Struktura bakterijske celuloze sastoji od vlakana građenih od  $\beta$ -1,4 glukanskih lanaca, jedinstvene molekulske formule kao i kod celuloze biljnog podrijetla,  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . Glukanski lanci povezani su vanjskim i unutarnjim vodikovim vezama (Slika 2). Mikrovlakna bakterijske celuloze prvi je opisao Muhlethalerin (1949), koji je uočio da su oko 100 puta manja od vlakana iz biljne celuloze (Chawla i sur., 2009; Gayathry i Gopalaswamy, 2014).



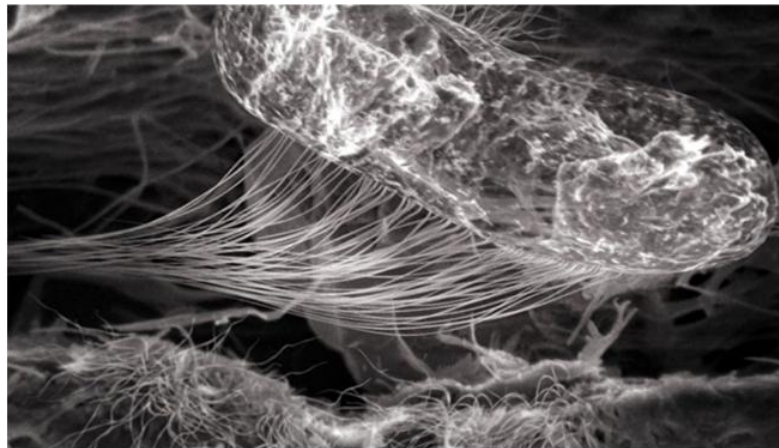
**Slika 2.** Detalji strukture i posloženosti vlakana u bakterijskoj celulozi (Huang i sur., 2014)

Vlaknasta mreža bakterijske celuloze se sastoji od trodimenzionalnih, strukturno vrlo uređenih nanovlakana, što rezultira stvaranjem hidrogela velike površine i poroznosti. Tijekom procesa sinteze, protovlakna glukoznog lanca se izlučuju kroz bakterijsku staničnu stijenkku i međusobno formiraju nanovlaknaste celulozne trake (Ross i sur., 1991). Ove trake grade mrežno oblikovanu strukturu bakterijske celuloze koju čini vrlo porozni matriks (Dahman, 2009). Ovako sintetizirana celuloza ima vrlo veliku površinu hidroksilnih grupa

čime se objašnjava njena hidrofilnost, razgradljivost i veliki kapacitet za kemijske modifikacije (Klemm i sur., 2005).

### 1.3. BIOSINTEZA BAKTERIJSKE CELULOZE

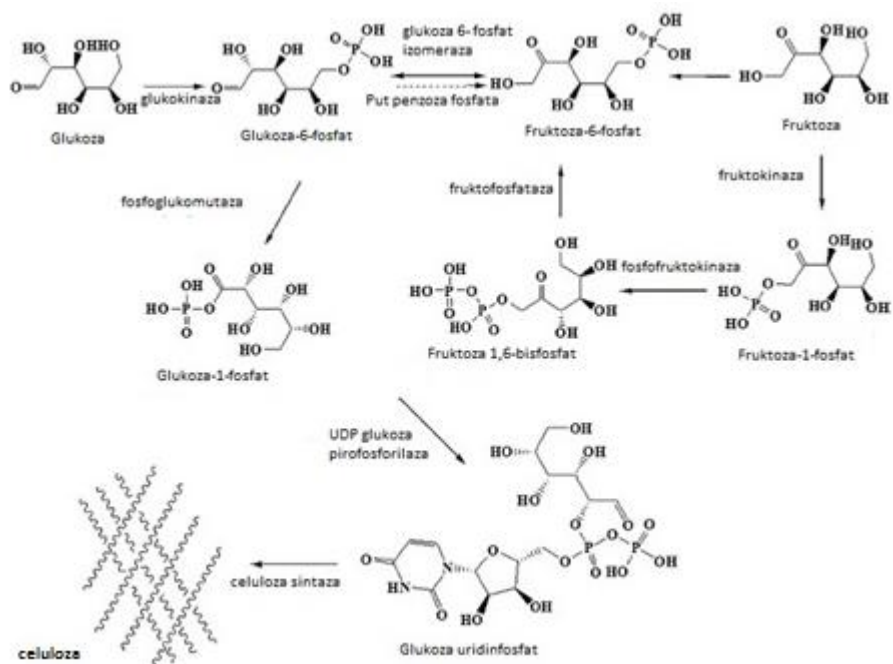
Enzim celuloza sintaza ima najvažniju ulogu u sintezi celuloze (Ross i sur., 1997). Sinteza bakterijske celuloze događa se između vanjske i citoplazmene membrane pomoću celuloza-sintetizirajućeg kompleksa vezanog za pore na površini bakterija. Pri tome nastaju tanke trake celuloze, prosječnog promjera od 10-20 do 30-40 Å, koje se nadograđuju jedna na drugu u horizontalnoj ravnini (Slika 3).



**Slika 3.** Sinteza bakterijske celuloze na površini bakterijske stanice (Keshk, 2014)

Metabolički put konverzije izvora ugljika (glukoza) u celulozu odvija se u više koraka. Sve započinje konverzijom glukoze u glukoza-6-fosfat djelovanjem glukokinaze, nakon čega slijedi izomerizacija fosfoglukomutazom do glukoza-1-fosfata. Treći korak je konverzija glukoza-1-fosfata u glukoza uridinfosfat pomoću UDP glukoza pirofosforilaze. Konačno, u četvrtom koraku se UDPG polimerizira u celulozu djelovanjem celuloza sintaze (Tal i sur., 1998). Cijeli mehanizam metabolizma ugljika do celuloze u *A. xylinum* je prikazan na Slici 4.





**Slika 4.** Biokemijski put sinteze bakterijske celuloze (Lin i sur., 2013)

## 1.4. FERMENTACIJA

Bakterijska celuloza se može proizvoditi statično, na tresilici ili uz miješanje, no svaki od ovih postupaka rezultira različitim oblicima celuloznih vlakana. Pri statičnim uvjetima uzgoja, sintetizirana celuloza je građena od trodimenzionalnih, međusobno isprepletenih vlakna, dok se pri uzgoju na tresilici ili u reaktoru s mješalicom sintetiziraju kugle ili peleti nepravilnog oblika (Tanskul i sur., 2013). Proces sinteze celuloze pod statičkim uvjetima ovisi o opskrbi atmosferskim kisikom na površini, a prinos o koncentraciji izvora ugljika (Budhiono i sur., 1999). Produženjem vremena rasta bakterija octene kiseline, povećava se prinos bakterijske celuloze (Sheykhnazari i sur., 2011). Sinteza bakterijske celuloze doseže svoju krajnju granicu kada pelikula pada na dno hranjive podloge, pri čemu bakterije postaju neaktivne zbog nedovoljne opskrbe kisikom (Borzani i DeSouza, 1995). U industrijskoj proizvodnji kao najbolji način pokazao se šaržni proces s pritokom supstrata, jer je postignuta veća produktivnost u odnosu na kontinuirani proces (Cakar i sur., 2014).

Suprotno tome, zbog niskog prinosa pri statičnom načinu proizvodnje, većina bakterijske celuloze koja se koristi u komercijalne svrhe proizvodi se na tresilici. Trešnjom se sintetiziraju nepravilni oblici celuloze, bilo kao vlaknasti ovjes, kugle, peleti ili nepravilna

masa (Yan i sur., 2008, Wu i Lia, 2008). Ovakva bakterijska celuloza ima manju kristaliničnost, mehaničku čvrstoću i stupanj polimerizacije u usporedbi s pelikulama iz statične kulture (Shi i sur., 2013. godine). Istraživanja Hu i sur. (2013) pokazala su da se broj sintetiziranih oblika celuloze smanjuje s povećanjem volumena inokuluma, a različite početne koncentracije glukoze utječu na prosječne promjere tih oblika celuloze, no, mehanizam formiranja različitih oblika celuloze uz trešnju još je uvijek nepoznat.

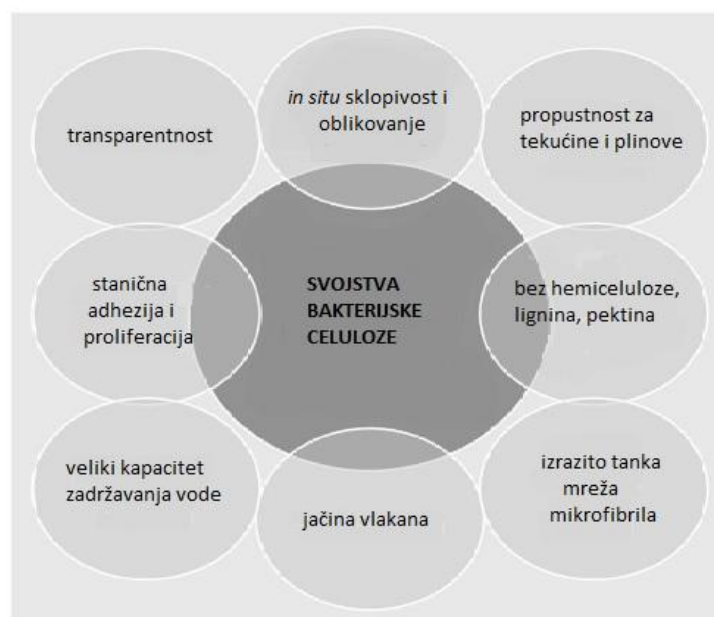
#### **1.4.1. Biosinteza celuloze narazličitim izvorima ugljika**

Najčešći izvor ugljika za proizvodnju celuloze pomoću bakterije *A. xylinum* je glukoza. Međutim, istraživanja su pokazala da je celuloza također uspješno sintetizirana i na drugim izvorima ugljika, kao što su disaharidi, škrob, različiti alkoholi i organske kiseline (Hestrin i Schramm, 1954). Prema Masaoka i sur. (1993), uzgojem u hranjivim podlogama u kojima su glavni izvori ugljika bili fruktoza i glicerol, dobiveni su gotovo isti prinosi celuloze kao u uzgoju s glukozom. Do smanjenja prinosa celuloze može doći jer se dio glukoze prevodi u glukonsku kiselinu. Optimalna pH vrijednost za proizvodnju celuloze je između 4,0 i 6,0. Proučavana je proizvodnja celuloze iz D-arabitoza s *Gluconacetobacter xylinus* KU-1 (Oikawa i sur., 1995). Količina celuloze iz D-arabitoza je bila više od 6 puta veća od celuloze iz D-glukoze. U podlozi s D-arabitolom, konačni pH se nije smanjio i D-glukonska kiselina nije detektirana što se čini jednim od razloga za visoku produktivnost celuloze iz D-arabitoza. U istraživanjima u kojima su mjereni prinosi celuloze iz glukoze, galaktoze ili ksiloze kao izvora ugljika, galaktoza i ksiloza su dale manje prinose, uglavnom zbog sporijih brzina rasta mikroorganizama. Mikrovlakna dobivena iz ksiloze su također nepravilnija od onih dobivenih iz glukoze. Plinska kromatografija je pokazala da je sastav šećera u polimerima (celuloza i drugi nusproizvodi) proizvedenih od ksiloze kao izvor ugljika još uvijek 80% glukoze i 20% drugih šećera, a tu nisu opažene razlike u stupnju polimerizacije. Vremena inicijacije proizvodnje su također različita za različite izvore ugljika. Korištenje jeftinijeg izvora ugljika moglo bi smanjiti troškove proizvodnje. Prinos bakterijske celuloze iz saharoze je u pola manji od onog iz glukoze, zbog niske aktivnosti saharaze u *A. xylinum*. Povećanje produktivnosti sinteze bakterijske celuloze uočeno je kad je saharoza učinkovito hidrolizirana. Tajima i sur. (1995) su uspjeli povećati produktivnost bakterijske celuloze pomoću kousgoja dviju različitih sojeva *G. xylinus* (NCI 1051 ili ATCC 10245 i NCI 1005). Produktivnost sinteze bakterijske celuloze kokultivacijom veća je od produktivnosti monokultivacijom. To je, čini se zbog formiranja glukoze i fruktoze nakon hidrolize saharoze

sa saharozom koju izlučuje *G. xylinus* NCI 1005. Ovi su istraživači koristili laboratorijske kulture sojeva bakterije *G. xylinus* (IFO, ATCC ili NCI), dok su u drugim istraživanjima koristili *nata* kulturu (lokalno uzgojenu u domaćinstvima) bakterije *G. xylinus*, koja je izolirana izravno iz *nate*. *Nata* je omiljena desertna poslastica porijeklom s Filipina koji se proizvodi uglavnom u regijama s kokosom. Celulozni gel ili *nata* je sintetiziran sojem *G. xylinus* koji je uzgajan u kokosovoj vodi ili voćnim sokovima (ananas i rajčice) s dodatkom saharoze (Embucado i sur., 1994a; Embucado i sur, 1994b). U tome slučaju fruktoza daje najbolji prinos, nakon čega slijedi kombinacija fruktoze i laktoze, a i saharoza također daje dobre prinose. Ova četiri izvora ugljikohidrata daju znatno bolje prinose od bilo kojih drugih izvora.

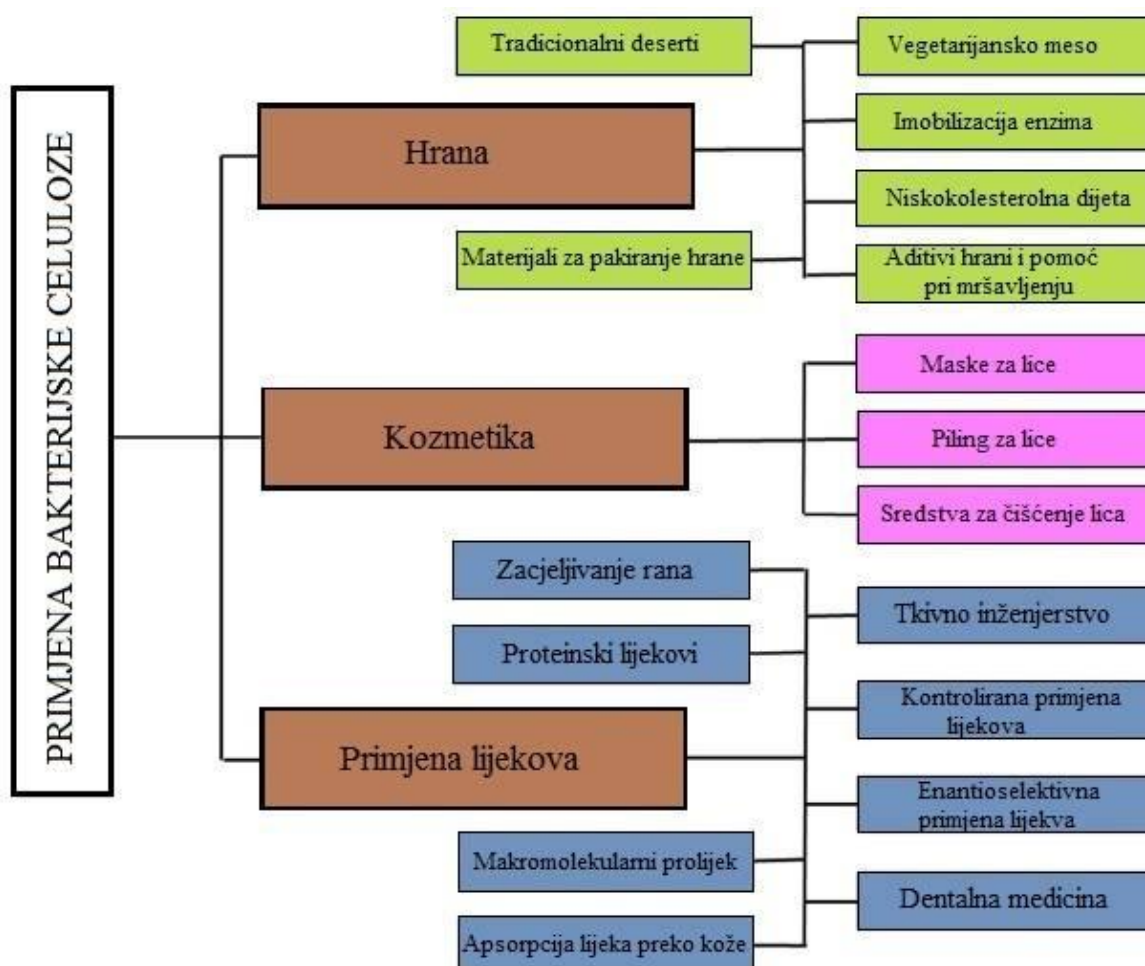
### 1.5. PRIMJENA BAKTERIJSKE CELULOZE

Bakterijska celuloza se zbog svoje visoke čistoće, hidrofилности, sposobnosti za formiranje struktura, kiralnosti i biokompatibilnosti može uporabiti u širokom spektru posebnih primjena, npr. kao hrana (*Nata de coco*), izvor dijetalna vlakana, akustične ili filter membrane, ultra čvrsti papir, fino mrežasta optička mreža s oblogom. Svojstva zgušnjavanja i suspendiranja daju već sada nekoliko primjena bakterijske celuloze u ljudskoj i veterinarskoj medicini. Na Slici 5 prikazana su sveobuhvatna svojstva bakterijske celuloze (Ul-Islam i sur., 2012).



**Slika 5.** Svojstva bakterijske celuloze (Ul-Islam i sur., 2012)

Bakterijska celuloza se primjenjuje u više područja kao što su zbrinjavanje rana (Muangman i sur., 2011), regeneracija krvnih žila (Wippermann i sur., 2009) i papirna restauracija (Santos i sur., 2014). Iako bakterijska celuloza ima jedinstvena svojstva, postoje ograničenja koja smanjuju mogućnost njene primjene, a to je nedostatak antibakterijskih svojstava i optičke transparentnosti. Prirodna struktura bakterijske celuloze je porozna i jednostavno može poslužiti kao matrica za imobilizaciju raznih čestica ili supstancija koje služe za pojačanje strukture. Takva „pojačana“ bakterijska celuloza ima daleko veću primjenu zbog svojih bioloških i fizikalno-kemijskih svojstava (Shah i sur., 2013). Različite modifikacije bakterijske celuloze sintetiziraju se ili *in situ* ili *ex situ* metodama. U *in situ* postupku, čestice za pojačanje celuloze se dodaju u polimer tijekom sinteze (Saibuatong i Philsalaphong, 2010), dok se u *ex situ* bakterijska celuloza impregnira za česticama za pojačanje naknadno (Ul-Islam i sur., 2012). Kao što je prikazano na Slici 6, bakterijska celuloza je primjenjiva u različitim industrijama; prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj.



**Slika 6.** Primjena bakterijske celuloze u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (Ul-Islam i sur., 2012)

### 1.5.1. Biomedicina - terapija oštećene kože

Bakterijska celuloza sintetizirana s bakterijom vrste *A. xylinum* posljednje je vrijeme sve interesantnija u području biomedicine zbog svoje jedinstvene strukture i svojstava. Svojstva, poput visoke vlažne čvrstoće, izrazitohidrofilne površine, homologne strukture s nativnim ekstracelularnim matriksom, jedinstvenom nanostrukturom, izvrsnom biorazgradivošću i biološkim afinitetom čine bakterijsku celulozu obećavajućim materijalom u biomedicinskoj primjeni. Visoka mehanička čvrstoća u mokrom stanju, znatna propusnost za tekućine i plinove i niska iritacija kože ukazuje na to da bi želatinozna membrana bakterijske celuloze mogla biti upotrebljiva kao umjetna koža za privremeno pokrivanje rana (Slika 7).

Na tržištu se mogu naći proizvodi bakterijske celuloze sa širokom primjenom u kirurgiji i stomatologiji (dentalni implantanti), te općenito u području biomedicine. Slučajevi drugog i trećeg stupnja opekline, čireva i drugi mogu se uspješno liječiti bakterijskom nanocelulozom kao privremenim nadomjestkom za čovjekovu kožu (Fontana i sur., 1990). Autori su dokumentirali sljedeće prednosti: neposredno smanjivanje bolova, bliska adhezija s ranom, smanjene nelagode nakon operacije, smanjena stopa infekcija, transparentnost pri pregledu rane, brži oporavak i poboljšano zadržavanje izlučivanja vlažnosti, spontano odvajanje bakterijske celuloze nakon kojeg slijedi rehospitalizacija, što rezultira smanjenjem vremena i troškova liječenja. Spominje se samo jedan nedostatak, a to je ograničena elastičnost u pregibima gdje je potrebna velika pokretljivost. Kawecki i sur. (2004) su opisali primjenu bakterijske celuloze u veterinarskoj medicini za liječenje svježih, velikih površinskih rana na konjima i psima.



**Slika 7.** Membrana bakterijske celuloze koja se nikad ne suši i pokazuje nevjerovatnu podatnost na različite oblike tijela, održava vlagu tkiva i značajno olakšava bol nakon zadobivanja opekline (Czaja i sur., 2006)

### 1.5.2. Prehrambena industrija

Filipinski nacionalni desert *Nata de Coco*, jedan je od tradicionalnih proizvoda posljednjih sedamdeset godina (Keshk i Sameshima, 2006). Izvoz *Nata* iz Filipina u Japan imao je veliki utjecaj na globalni pogled za širenje proizvodnje mikrobnje celuloze. Kao rezultat proizvodnje *Nata de Coco* pomoću *G. xylinus*, David (1996) je pokazao da *Nata de Coco* ima učinak snižavanja kolesterola plazme. Bakterijska celuloza je primjenjiva i kao funkcionalni dodatak hrani jer može poslužiti kao zgušnjivač i raspršivač. Pri tome bakterijska celuloza iz trešene kulture ima puno veći emulgatorski učinak nego iz statičke kulture (Ogawa i Tokura, 1992). *Monascus*-bakterijski celulozni kompleks, koji ima svojstva i bakterijske celuloze i *Monascus* gljive, pokazao se potencijalnom novom hranom u vegetarijanskoj prehrani, kao zamjena za meso ili morske plodove. Boja i tekstura kompleksa su poput jetre ili nemasnog mesa. Također je izvor visokog sadržaja vlakana, nisko kaloričan je i sadrži zdrave hranjive tvari. Štoviše, otpadni bujon iz fermentacije može se dodatno koristiti kao izvor topljivih pigmenta. Također, Shirai i sur. (1994) su izvijestili da želatinozna celuloza dobivena fermentacijom s *Acetobacter aceti* AJ 12.368 sadrži celulozna vlakna (0,9%), vezanu (0,3%) i slobodnu vodu (98,8%). Celulozna mreža slabo apsorbira vodu u kapilarama oko 0,5 do 1,0 mikrona. Kad je pod stresom gel otpušta svoju vodu i deformira se bez loma. Gel je sam po sebi previše tvrd za gristi, ali je postao jestiv nakon obrade sa šećernim alkoholom ili alginatom i kalcijevim kloridom. Teksture nalikuju na voće, kao što je grožđe ili mekušce, kao što su lignje. Mehanizam je imobilizacija vode želatinozne celuloze s viskoznim ili gel-formirajućim materijalim, a time se gel može lakše gristi. Ovi rezultati pokazuju da želatinozna celuloza sa svojom vlaknastom teksturom može biti novi materijal za pripravu salata, niskokaloričnih deserata i gotovih jela.

Pakiranje ima važnu ulogu u zaštiti i očuvanju hrane. Industrija preferira bio-materijale za pakiranje namirnica ili hrane jer postaje sve veća zabrinutosti javnosti zbog utjecaja nerazgradive ambalaže na okoliš. Bakterijska celuloza se smatra jednom od prikladnih sirovina za proizvodnju biorazgradivih materijala (Tang i sur., 2012). Strukturno se sastoji od fino umreženih mikrovlakana vrlo otpornih na vodu, no nema antibakterijska i antioksidativna svojstva kojima bi se spriječilo onečišćenje hrane.

## 2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

*Kombucha* čaj je nutritivno vrijedni napitak dobiven biotransformacijom saharozom zaslađenog čaja sa simbiotičkim, odnosno združenim kulturama bakterija octene kiseline i raznih vrsta osmofilnih kvasaca koji, tijekom 10-14 dana fermentacije, sintetiziraju „čajnu gljivu“, odnosno celulozni sloj 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 g/L (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 opne, odnosno bakterijska celuloza koja s trajanjem fermentacije sve više dobiva na volumenu. Bakterijska celuloza ima širok raspon primjena u biomedicini i prehrani zbog svoje visoke čistoće i jedinstvenih fizikalno-kemijskih svojstava (Dufresne i Farnworth, 2000). U prehrambenoj industriji, bakterijska celuloza se koristi u proizvodnji hrane, dijetalnih vlakna, kao sredstvo za zgušnjavanje i stabilizaciju, te za povezivanje različitih vrsta proizvoda (Okiyama i sur., 1993).

Cilj ovog rada bio je istražiti biokemijske i morfološke promjene koje se zbivaju tijekom biotransformacije simbiotički združene kulture bakterija octene kiseline i kvasaca (*kombucha*) tijekom 12 dana uzgoja u kompleksnim podlogama (zeleni čaj sa cvjetovima jasmina i kokosovo mlijeko). U hranjivim podlogama glavni izvor ugljika bila je saharoza (80 i 100 g/L). Tijekom fermentacija praćeni su i određivani sljedeći parametri:

- kinetika nastajanja etanola i organskih kiselina (octene i glukonske),
- promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije,
- kinetika sinteze bakterijske celuloze u kompleksnim podlogama,
- prinos bakterijske celuloze *kombuche* na kraju procesa fermentacije
- kristaliničnost, amorfnost i morfološka struktura bakterijske celuloze
- utjecaj površine bakterijske celuloze na kapacitet zadržavanja i brzinu otpuštanja vode,
- antimikrobna aktivnost *kombucha* napitaka.

## **3.MATERIJALI I METODE**

### **3.1. Priprava kulture *kombuche***

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

### **3.2. Hranjive podloge**

#### **3.2.1. Vrsta čaja**

Uzgojena *kombucha* (3 % tež/vol) nacijepljena je na zeleni čaj sa cvjetovima jasmina proizvođača AhmadLtd., 1 Wood Streat, London, EC2V 7WS.

Sastojci: zeleni čaj, cvjetovi jasmina.

#### **3.2.2. Kokosovo mlijeko**

Uzgojena *kombucha* (3 % tež/vol) nacijepljena je na napitak od kokosovog mlijeka proizvođača Alpro CVA, Francuska.

Sastojci: voda, kokosovo mlijeko (5.3 %) (kokos krema, voda), riža (3.3 %), trikalcijev fosfat, stabilizatori (karagenan, guar guma, ksantan guma), morska sol, vitamini (B12, D2), arome.

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

Infuzije biljnog čaja su pripravljene dodatkom 40 g listića čaja u 1 L kipuće vode u koju je dodano 80 ili 100 g/L saharoze (bijeli konzumni šećer). Nakon ekstrakcije koja je trajala 8 minuta (prema naputku proizvođača), čaj je ohlađen na sobnu temperaturu i filtrirani su čajni listići. Bistri filtrati su prelivevani u sterilne Erlenmeyer tikvice od 500 mL korisnog volumena. Nacijepljeni uzorci svježe uzgojenom *kombucha* kulturom su inkubirani pri 25 °C (sobna temperatura) tijekom 12 dana. isupernatant je uporabljen za daljnja određivanja.



### 3.4. Određivanje pH vrijednosti

Uzorcima je pH vrijednost mjerena svaki dan tijekom 12 dana fermentacije. Mjerenja su provedena nakon pažljivog izuzimanja 5 mL uzorka pipetiranjem uz rub posuda, kako ne bi došlo do oštećenja celulozne biomase koja pluta na površini uzorka. Mjerenja su provedena pomoću pH metra HannaIndustrial model HI 98103.

### 3.5. Određivanje koncentracije octene kiseline

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

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

gdje je:

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

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

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

### 3.6. Određivanje koncentracije glukonske kiseline

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

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

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)

### 3.7. Određivanje alkohola kemijskom metodom

Udjel alkohola u fermentiranim uzorcima zelenog čaja sa cvjetovima jasmina i kokosovim mlijekom tijekom previranja šećera do etanola i biooksidacije etanola do octene kiseline, određivan je kemijskom metodom koja se zasniva na oksidaciji alkohola s kalijevim bikromatom ( $K_2Cr_2O_7$ ) u kiselom okolišu.

Koncentracija (vol %) alkohola je izračunata prema jednadžbi:

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

a = utrošak 0.1 M otopine  $Na_2S_2O_3$  (mL)

### 3.8. FT-IR spektroskopija

Svi uzorci bakterijske celuloze su sušeni suhom sterilizatoru pri 60 °C u Petrijevim zdjelicama u tankom sloju, a nakon toga usitnjeni u tarioniku do praha. IR spektri čvrstih uzorakasnimljeni su u kalijevu bromidu na IR-spektrofotometru Bomem MB 100 mid FT pri rezoluciji od 2  $cm^{-1}$  u rangu od 4000 do 400  $cm^{-1}$ .

### 3.9. Difrakcija rendgenskim zrakama (*eng.* X RayDiffraction; XRD)

Rendgenska difrakcijska analiza provedena je korištenjem difraktometra Shimadzu XRD 6000 sa  $CuK\alpha$  zračenjem. Uzorci su snimljeni u području  $2\theta$  5°–40° s korakom od 0.02°. Veličina kristalita određena je Scherrerovom jednadžbom:

$$B(2\Theta) = K \cdot \lambda / \beta \cos \Theta \quad (4)$$

### 3.10. Pretražna elektronska mikroskopija (*eng.* ScanningElectronMicroscopy; 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.

### 3.11. Izračunavanje mase i prinosa bakterijske celuloze

Nakon 12 dana fermentacije, plutajući gelovi celulozne biomase, koji su formirani na površini hranjivih podloga su pažljivo izvađeni iz staklenih posuda, oprani demineraliziranom vodom i ostavljeni preko noći u 1M NaOH na sobnoj temperaturi kako bi se uklonile stanice mikroorganizama i sastojci podloga. Nakon toga su gelovi bakterijske celuloze ispirani demineraliziranom vodom sve dok pH vode za ispiranje nije dostigao početnu vrijednost vode (Toda i sur., 1997). Oprani gelovi su uronjeni u 96 %-tni EtOH tijekom 2 sata, izvagani da bi se izmjerila masa vlažne celulozne biomase, i nakon toga stavljeni na sušenje u suhi sterilizator pri 50 °C/4 sata. Izmjerena je masa celulozne biomase (g) prema slijedećoj formuli:

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

gdje je:

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

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

$m_i$  = masa inokuluma (g)

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

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

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

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

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

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

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

### **3.14. Određivanje antimikrobnih svojstava bakterijske celuloze**

Antimikrobna aktivnost inhibicija rasta odabranih test mikroorganizama *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas sp.* i *Vibrio cholerae* određivana je disk-difuzijskom metodom. Kao test mikroorganizmi korišteni su sojevi bakterijskih kultura iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu.

Na površinu čvrste hranjive podloge u Petrijevoj zdjelici, na koju je prethodno nacijepjen test-mikroorganizam, postavljeni su diskovi sa određenim antimikrobnim agensom. Tijekom inkubacije spoj je difundirao radijalno iz diska u agar tvoreći gradijent koncentracije i ovisno o njegovom antimikrobnom djelovanju inhibira rast mikroorganizma u okolini diska. Prozirna zona u kojoj nema vidljivog rasta naziva se zona inhibicije (ZI) i indikacija je osjetljivosti mikroorganizma prema antimikroorganizmu. Svi pokusi su provedeni u trima paralelama, te je izračunata srednja vrijednost dobivenih rezultata.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Organske kiseline i etanol

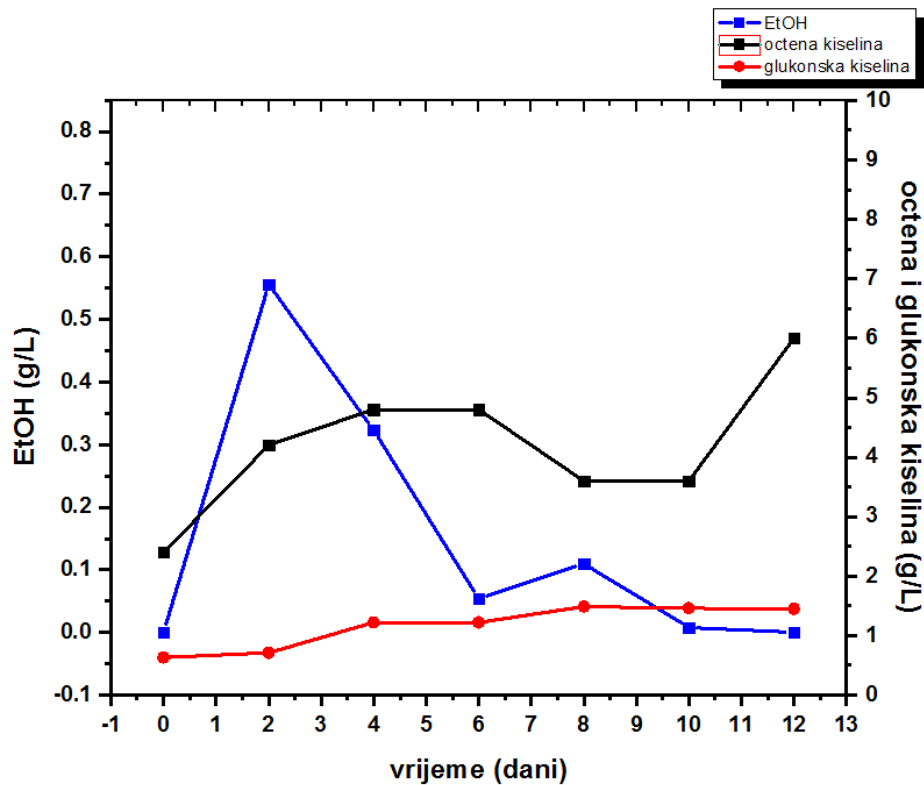
Tijekom fermentacije, bakterije i kvasci metaboliziraju saharozu ili neki drugi izvor ugljika do različitih organskih kiselina, uglavnom octene i glukonske u većim koncentracijama, te glukuronske, mliječne i limunske, čije koncentracije ne prelaze 1 g/L (Jayabalan i sur., 2007). Kvaščeve stanice hidroliziraju saharozu do glukoze i fruktoze pomoću enzima invertaze i proizvode etanol putem glikolize, pri čemu preferiraju fruktozu kao supstrat. Bakterije octene kiseline koriste glukozu za proizvodnju glukonske kiseline i etanola za proizvodnju octene kiseline.

Koncentracija organskih kiselina tijekom 12 dana fermentacije u zelenom čaju sa cvjetovima jasmina i kokosovom mlijeku mijenjala se tijekom vremena što je prikazano na Slikama 8-11. Koncentracija octene kiseline (jasmin, 80 g/L) se povećala od 2,4 g/L na početku istraživanja do 6,0 g/L na kraju fermentacije (Slika 8). Pri višoj koncentraciji šećera u istoj podlozi (100 g/L), od početne koncentracije 2,1 g/L koncentracija octene kiseline je porasla do 14 g/L (Slika 9). Pri fermentaciji *kombuche* u kokosovom mlijeku nisu uočene značajnije razlike u koncentracijama octene kiseline na kraju fermentacijskog procesa (početne 1,8 i 1,6 g/L, a konačne 8,5 i 9,0 g/L; Slike 10 i 11). Na tim je slikama vidljivo da je koncentracija octene kiseline u kokosovom mlijeku sa 100 g/L relativno linearno rasla, dok je pri koncentraciji 80 g/L dodanog šećera linearnost rasta prisutna do četvrtog dana, nakon čega je uslijedio blagi „plato“ vrijednosti i u konačnici pad vrijednosti s 9 g/L na 8,5 g/L.

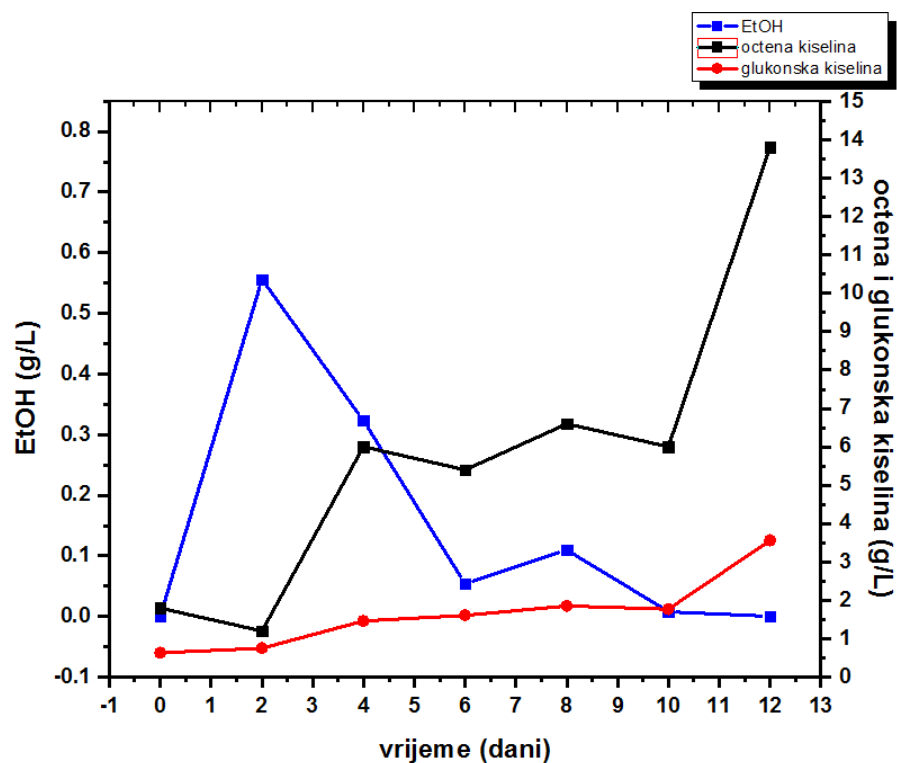
Uz sposobnost sinteze relativno visokih koncentracija octene kiseline, bakterije octene kiseline pokazuju i toleranciju na kiselost, koja je rijetka među aerobnim homotrofima i heterotrofima. Ovo im svojstvo omogućava rast na hranjivoj podlozi koja već na početku uzgoja ima pH vrijednost nižu od 4,5 (Malbaša i sur., 2008). Glukozu bakterije octene kiseline oksidiraju u glukonsku kiselinu. Glukonska kiselina je druga glavna organska kiselina koja nastaje kao posljedica metabolizma *kombuche*. Kao što je vidljivo na Slici 8, koncentracija glukonske kiseline tijekom fermentacije u zelenom čaju sa cvjetovima jasmina bila je manja gotovo 5 puta od koncentracije octene kiseline, no zabilježen je blagi linearni rast tijekom cijelog vremena fermentacije, od 0,55 g/L na početku, do 1,5 g/L na kraju istraživanja (Slika 8). Vrlo slični rezultati su izmjereni pri koncentraciji šećera 100 g/L (Slika 9). Za razliku od izmjerene koncentracije octene kiseline nakon fermentacije *kombuche* u

zelenom čaju sa cvjetovima jasmina, tijekom fermentacije u kokosovom mlijeku zabilježena je veća koncentracija glukonske kiseline, tako da je izmjerena pri 80 g/L povećana od početne 0,5 g/L na 2,5 g/L (Slika 10), a pri koncentraciji šećera 100 g/L od 1 g/L dostigla je vrijednost 3,9 g/L (Slika 11).

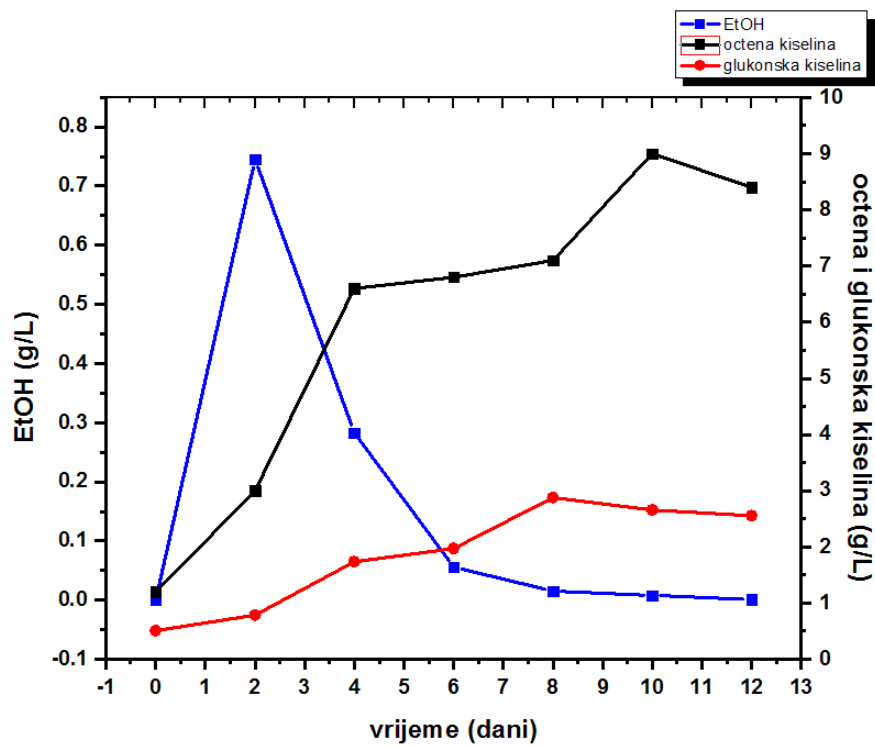
Prema većini autora, koncentracija etanola u *kombucha* napitcima nije veća od 1% (vol/vol) (Teoh i sur., 2004). Sievers i sur. (1995) su nakon 10 dana fermentacije izmjerili 0,36 g/L EtOH, uz početnih 70 g/L saharoze u hranjivoj podlozi. Reiss (1995) je ispitivao utjecaje različitih izvora ugljika (saharaza, laktoza, glukoza i fruktoza) na metabolizam *kombuche*, te uočio da koncentracija proizvedenog etanola ovisi o vrsti i količini dodanog šećera. U ovom radu je u zeleni čaj sa cvijetom jasmina dodano 80 i 100 g/L saharoze (konzumni bijeli šećer) i već nakon drugog dana fermentacije, izmjerena je maksimalna koncentracija etanola, 0,55 g/L, koja se u 4. danu smanjila na 0,31 g/L, a nakon toga je pala na manje od 0,05 g/L i nije se značajnije mijenjala do kraja fermentacije (Slika 8), dok se pri koncentraciji 100 g/L šećera najveća koncentracija etanola smanjila tek nakon šest dana fermentacije na 0,45 g/L, uz oscilacije do kraja fermentacije (Slika 9). Kokosovo mlijeko, kao hranjiva podloga za uzgoj *kombuche* rezultiralo je većom koncentracijom etanola već drugog dana fermentacije, 0,75 g/L (80 g/L šećera) i čak 0,8 g/L (100 g/L) šećera (Slike 10 i 11). Nakon osam dana fermentacije, pri objema koncentracijama šećera, nije izmjerena veća koncentracija etanola od 0,1 g/L.



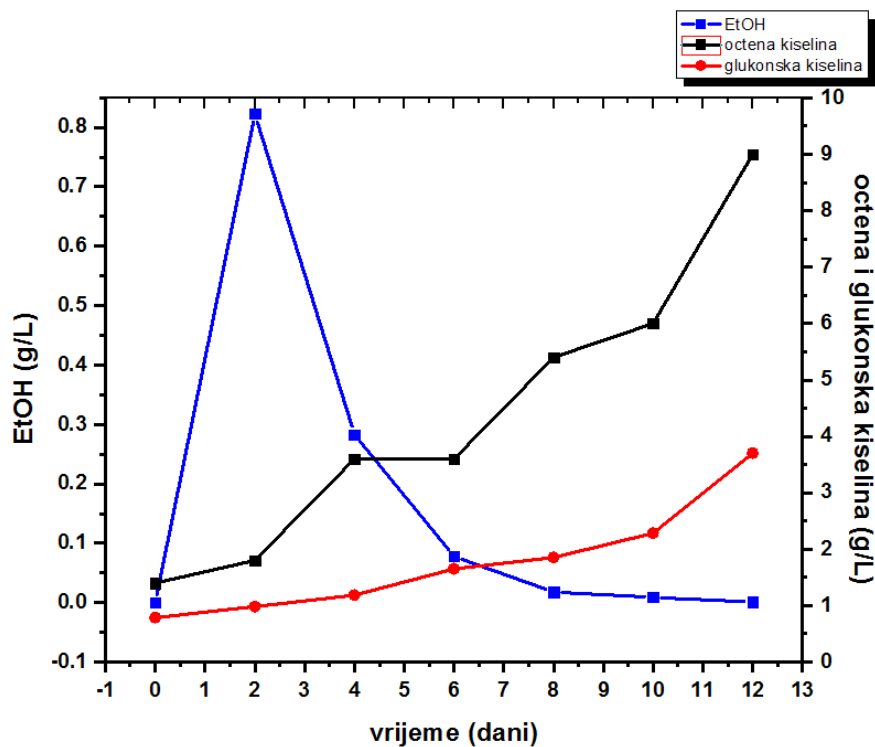
Slika 8. Kinetika nastajanja EtOH, octene i glukonske kiseline tijekom 12 dana fermentacije *kombucha* čaja zelenog čaja sa cvijetom jasmina (80 g/L saharoze)



Slika 9. Kinetika nastajanja EtOH, octene i glukonske kiseline tijekom 12 dana fermentacije *kombucha* čaja zelenog čaja sa cvijetom jasmina (100 g/L saharoze)



Slika 10. Kinetika nastajanja EtOH, octene i glukonske kiseline tijekom 12 dana fermentacije kombucha napitka u kokosovom mlijeku (80 g/L saharoze)



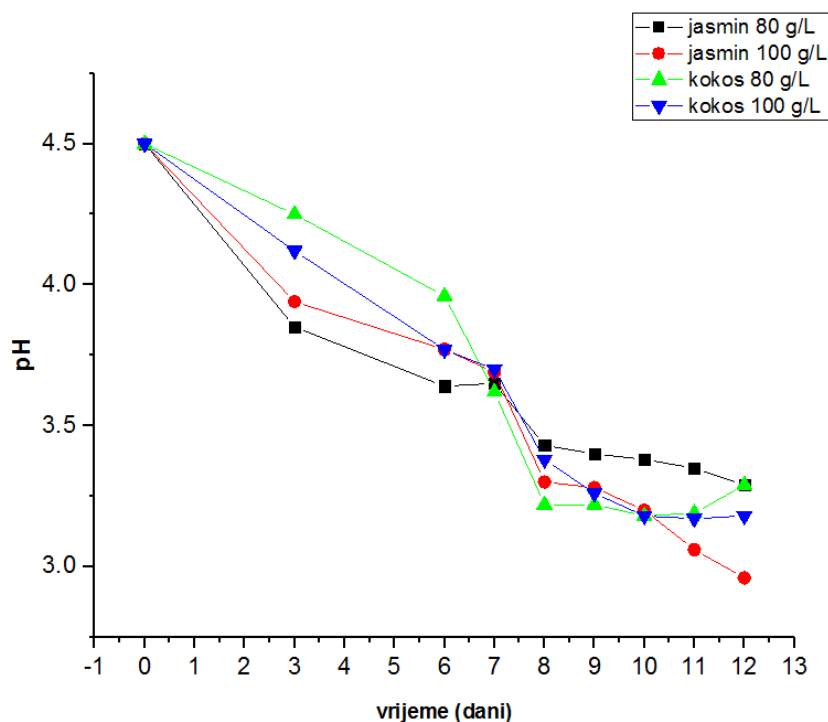
Slika 11. Kinetika nastajanja EtOH, octene i glukonske kiseline tijekom 12 dana fermentacije kombucha napitka u kokosovom mlijeku (100 g/L saharoze)



## 4.2. Promjena pH vrijednosti

Kao rezultat porasta koncentracije organskih kiselina, pH vrijednost pada, tako da je u ovom radu pH vrijednost s početnih 4,5 do kraja istraživanja postupno pala na 3.11 (Slika 12). Prema Hwang i suradnicima (1999), konverzija glukoze u glukonsku kiselinu rezultira značajnim smanjenjem pH vrijednosti tijekom fermentacije. Nadalje, inokulacija majčinske kulture *kombuche* u novu hranjivu podlogu, ne samo da osigurava brzi početak fermentacije (Sievers i sur., 1995), nego i štiti od moguće kontaminacije plijesnima i neželjenim mikroorganizmima (Greenwalt i sur., 2000).

Prema Bergeyevom „Manual of Determinative Bacteriology“ (Bergey i Holt, 1994), optimalna pH vrijednost za rast bakterija iz roda *Acetobacter* je između 5,4 i 6,3. Rast se postiže i pri nižim pH vrijednostima, od 4,0 do 4,5, a minimalni rast je zabilježen pri neutralnom pH 7,0 te do blago lužnatom (pH 8,0). Rezultati dobiveni ovim istraživanjem ukazuju da su bakterije octene kiseline iz *kombuche*, sposobne rasti, proizvoditi organske kiseline i bakterijsku celulozu čak i pri pH vrijednostima nižim od 3,2 (Slika 12).



**Slika 12.** Promjena pH vrijednosti tijekom 12 dana fermentacije *kombuche* u čaju i kokosovom mlijeku s različitim koncentracijama šećera (80 i 100 g/L)

### 4.3. Sinteza bakterijske celuloze

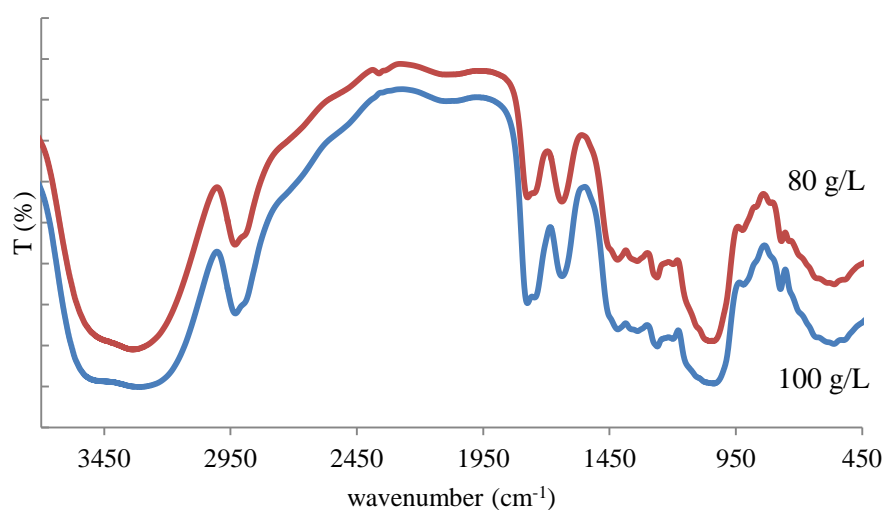
Jedna od prvih i vidljivih proizvoda biotransformacije zaslađenog supstrata je celulozna opna koja se u obliku tankog sloja oblikuje po površini tekućine. Celuloznu opnu na površini održava CO<sub>2</sub> koji nastaje kao posljedica fermentativne aktivnosti kvasaca (Sievers i sur., 1995). Prinos biomase tijekom fermentacije je usko povezan s izvorom ugljika, odnosno supstratom. Prema dobivenim rezultatima, zeleni čaj sa cvjetovima jasmina (80 g/L saharoze) je najbolji supstrat jer je nakon 12 dana fermentacije izmjereno 127.08 g/L vlažne bakterijske celuloze (Tablica 1).

**Tablica 1.** Prinos celulozne biomase *kombuche* nakon 12 dana fermentacije u zelenom čaju sa cvjetovima jasmina i kokosovom mlijeku

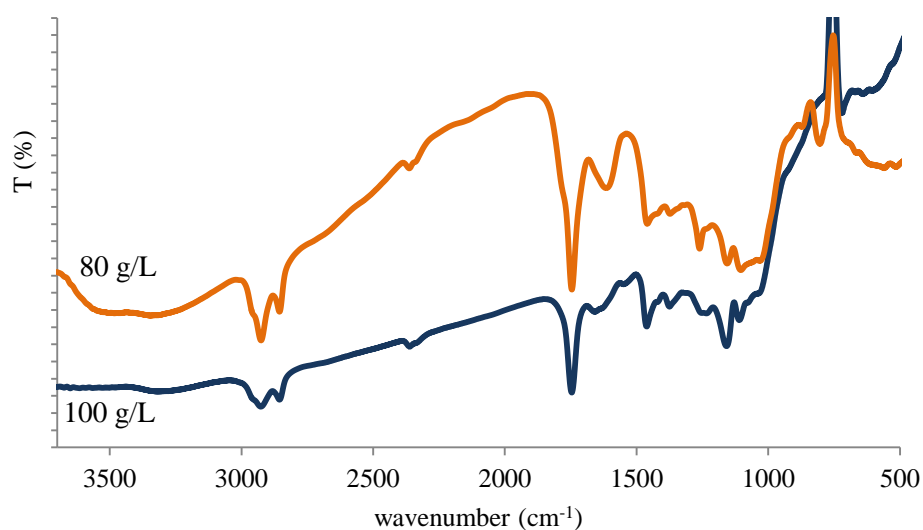
Hranjiva podloga	$\gamma$ inokuluma (g/L)	$\gamma$ celulozne biomase (g/L)	Prinos (%)
Jasmin (80 g/L)	12.87	127.08	143.66
Jasmin (100 g/L)	12.10	81.98	69.88
Kokos (80 g/L)	19.62	71.56	64.93
Kokos (100 g/L)	19.44	73.71	54.27

#### 4.4. FT-IR spektroskopske analize

Kemijska struktura bakterijske celuloze sintetizirane u zelenom čaju sa cvjetovima jasmina i kokosovom mlijeku je određivana u infracrvenom spektru (IR). Na Slici 13 je vidljivo karakteristično područje istezanja ( $960 - 730 \text{ cm}^{-1}$ ), pri čemu pikovi kod  $862,54 \text{ cm}^{-1}$  mogu potvrditi prisutnost  $\beta$ -1,4-glukozidnih veza. U uzorcima iz kokosovog mlijeka također su potvrđene  $\beta$ -1,4-glukozidne veze izmjerene na  $803 \text{ cm}^{-1}$ , pri čemu su se pikovi preklapali u objema koncentracijama (Slika 14).



**Slika 13.** FT-IR spektri bakterijske celuloze sintetizirane u zelenom čaju sa cvjetovima jasmina



**Slika 14.** FT-IR spektri bakterijske celuloze sintetizirane u kokosovom mlijeku

## 4.5. Difrakcija rendgenskih zraka

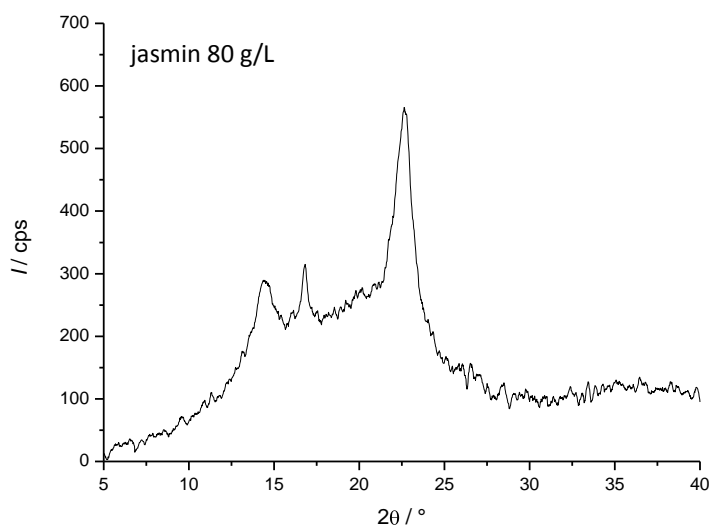
Analiza difrakcijom rendgenskim zrakama napravljena je sa ciljem usporedbe mikrostrukturnih promjena u uzorcima bakterijske celuloze fermentiranim u dvije različite kompleksne podloge i različitim koncentracijama šećera (80 i 100 g/L). Posebice se to odnosi na kristaliničnost struktura uzoraka (Tablica 2, Slike 15 - 18).

**Tablica 2.** Kristaliničnost uzoraka bakterijske celuloze uzgojene u zelenom čaju sa cvjetovima jasmina i kokosovom mlijeku s različitim koncentracijama šećera

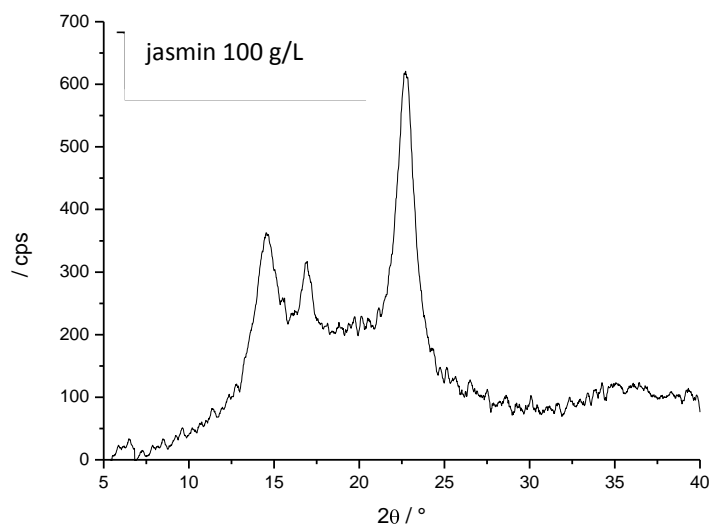
Uzorak	$d_1 / \text{Å}$	$d_2 / \text{Å}$	$d_3 / \text{Å}$	$2\theta_2 - 2\theta_1 / ^\circ$	$t_1 / \text{nm}$	$t_2 / \text{nm}$	$t_3 / \text{nm}$
jasmin 80 g/L	6,12	5,26	3,92	2,36	9,0	24	8,3
jasmin 100 g/L	6,11	5,25	3,92	2,38	7,8	15	7,6
kokos 80 g/L	6,08	5,26	3,92	2,28	6,6	13	6,5
kokos 100 g/L	6,13	5,26	3,92	2,40	6,7	20	7,4

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

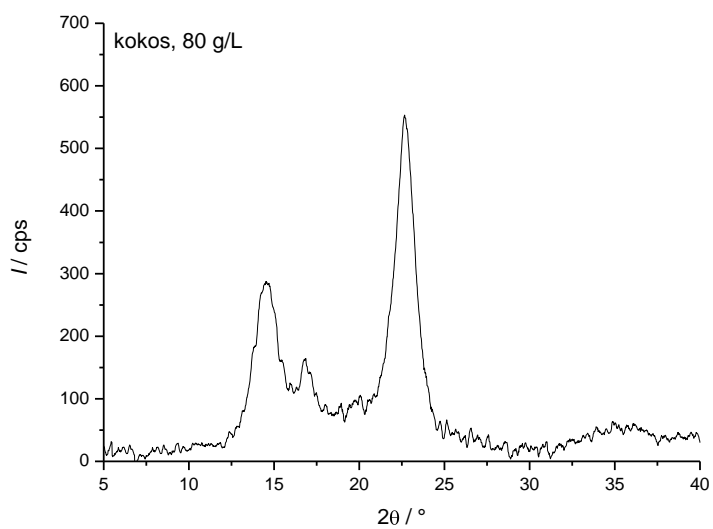
$t$  – veličina kristalita određena Scherrerovom jednačicom



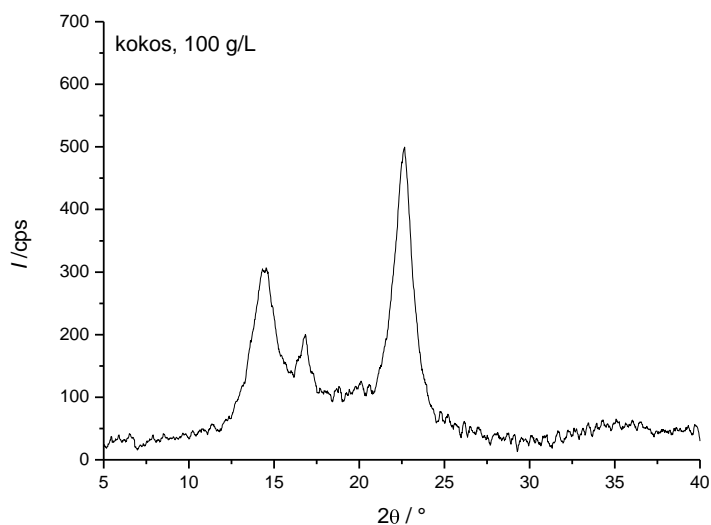
**Slika 15.** Difraktogram rendgenskim zrakama bakterijske celuloze nakon 12 dana fermentacije u zelenom čaju sa cvjetovima jasmina (koncentracija šećera 80 g/L)



**Slika 16.** Difraktogram rendgenskim zrakama bakterijske celuloze nakon 12 dana fermentacije u zelenom čaju sa cvjetovima jasmina (koncentracija šećera 100 g/L)



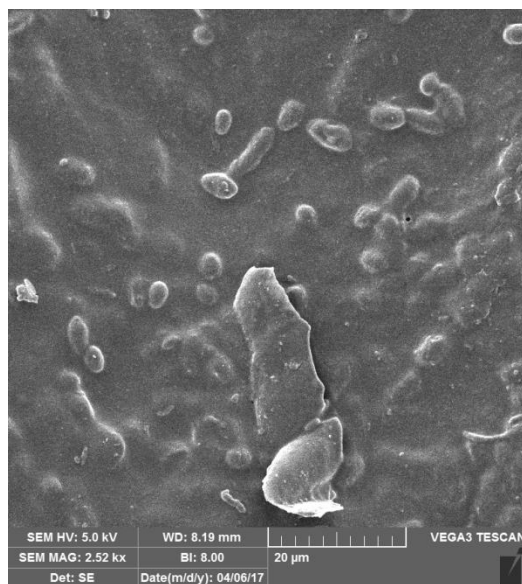
**Slika 17.** Difraktogram rendgenskim zrakama bakterijske celuloze nakon 12 dana fermentacije u kokosovom mlijeku (koncentracija šećera 80 g/L)



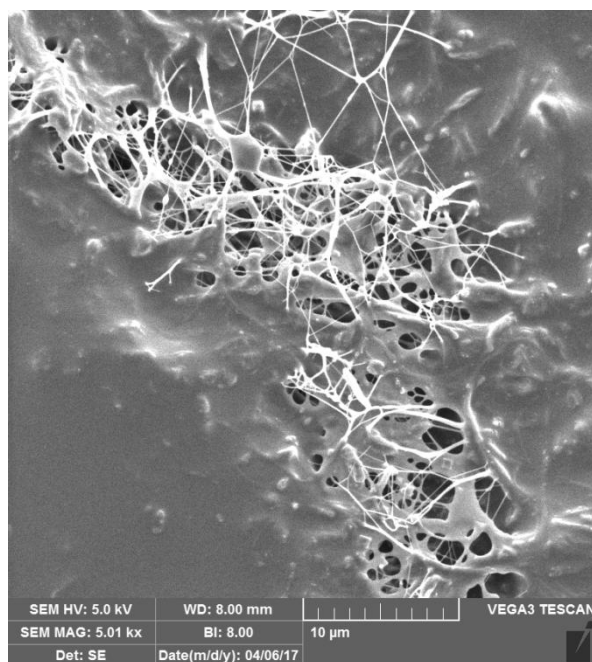
**Slika 18.** Difraktogram rendgenskim zrakama bakterijske celuloze nakon 12 dana fermentacije u kokosovom mlijeku (koncentracija šećera 100 g/L)

#### 4.6. Pretražna elektronska mikroskopija

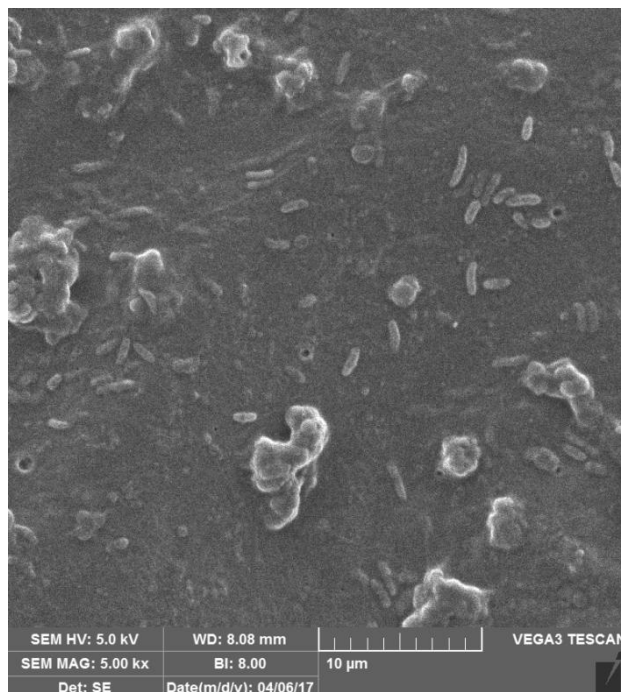
Površina i struktura mikrovlakana bakterijske celuloze snimane su pretražnim elektronskim mikroskopom (Slike 19 – 22). Na Slikama 19 i 21 jasno su vidljive stanice bakterija i kvasaca na površini pelikule bakterijske celuloze, a na Slikama 20 i 22 isprepletenost mikrovlakana sintetizirane celuloze.



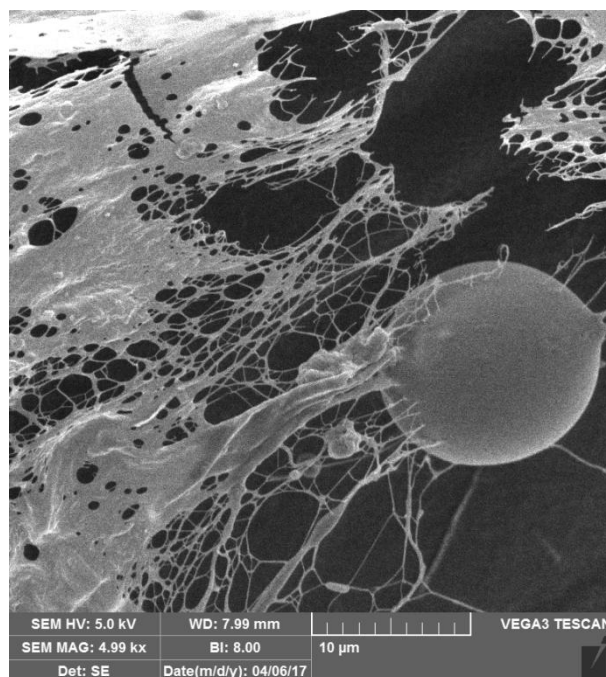
**Slika 19.** SEM snimka površine bakterijske celuloze nakon 12 dana fermentacije u zelenom čaju sa cvjetovima jasmina i koncentracijom šećera 100 g/L



**Slika 20.** SEM snimka mreže bakterijskih celuloznih mikrovlakana nakon 12 dana fermentacije u zelenom čaju sa cvjetovima jasmina i koncentracijom šećera 100 g/L



**Slika 21.** SEM snimka površine bakterijske celuloze nakon 12 dana fermentacije u kokosovom mlijeku i koncentracijom šećera 100 g/L



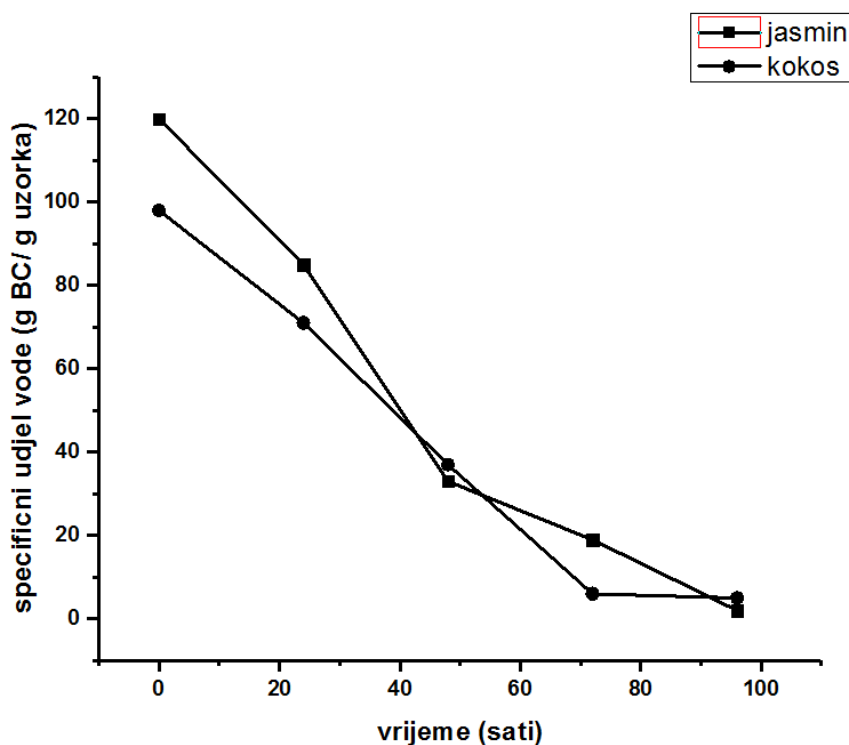
**Slika 22.** SEM snimka mreže bakterijskih celuloznih mikrovlakana nakon 12 dana fermentacije kokosovom mlijeku s koncentracijom šećera 100 g/L.

#### 4.7. Zadržavanje i otpuštanje vode

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

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





**Slika 23.** Kinetika otpuštanja vode (WRR) tijekom 96 sati iz uzoraka bakterijske celuloze nakon 12 dana fermentacije u zelenom čaju sa cvjetovima jasmina i kokosovom mlijeku

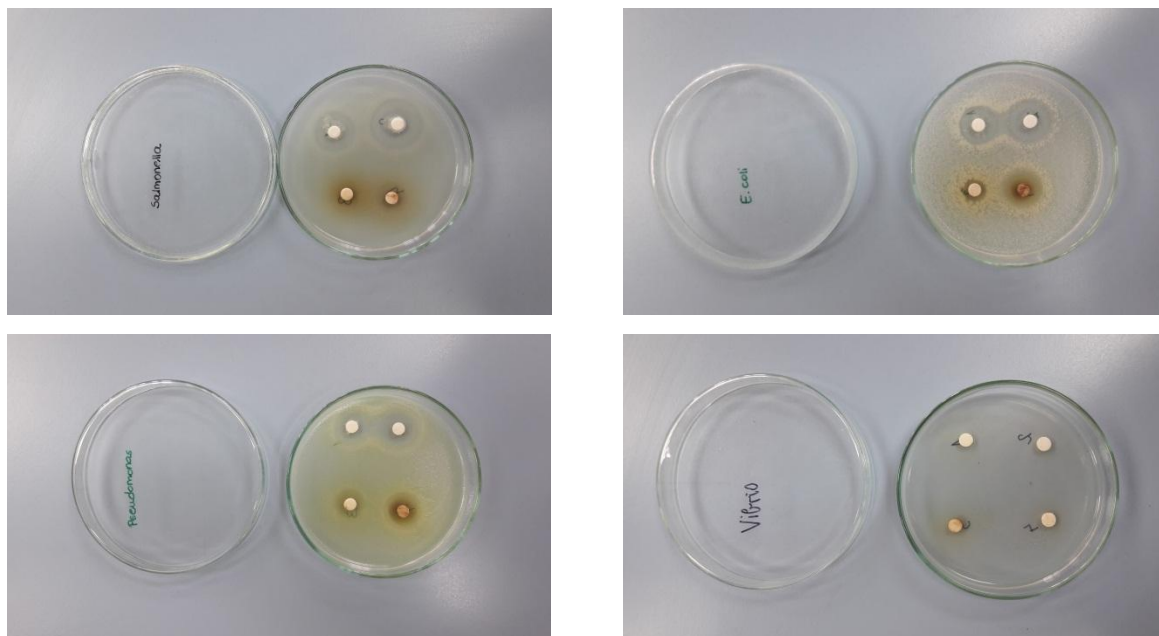
**Tablica 4.** Kapacitet zadržavanja vode bakterijske celuloze u istraživanim uzorcima

Uzorak	Masa vlažne BC (g)	Specifična površina BC (cm <sup>2</sup> /g)	WHC (g vode/g uzorka)
jasmin	205	1,659	116,43
kokos	165	0,566	89,55

#### 4.8. Antimikrobno djelovanje

Na antimikrobna svojstva *kombuche* više je puta ukazivano i raznim metodama potvrđeno (Greenwalt i sur., 1998). U ovom radu je antimikrobna aktivnost fermentiranih čajeva *kombuche* ispitivana sa četiri testna mikroorganizma; bakterije vrsta *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp. i *Vibrio cholearea*. Rezultati prikazani u Tablici 5 ukazuju na izvrsno antimikrobno djelovanje na bakteriju *E. coli* i vrlo dobro

djelovanje na *S. typhimurium* i *Pseudomonas* sp., dok su u prisutnosti *V. cholearea* uočene izrazito male i zamućene zone inhibicije. Također je uočeno da je fermentirani zeleni čaj sa cvjetovima jasmína pripravljen uz dodatak 100 g/L saharoze imao najveće antimikrobno djelovanje (Tablica 5).



**Slika 24.** Zone inhibicije testnih mikroorganizama s *kombucha* uzorcima zelenog čaja sa cvjetovima jasmína i kokosovim mlijekom

**Tablica 5.** Antimikrobno djelovanje različitih vrsta *kombucha* napitaka

Zone inhibicije (mm)	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Vibrio cholearea</i>
Vrsta napitka				
jasmin 80 g/L	13	22	14	1*
jasmin 100 g/L	16	30	18	1*
kokos 80 g/L	13	12	9	1*
kokos 100 g/L	16	10	11	1*

\*zamućena zona

Bakterijska celuloza ima jedinstveno svojstvo izrazito tanke, mrežaste, odnosno porozne strukture koja može u potpunosti prijanjati uz površinu na kojoj se nalazi, što je izrazito važno u biomedicini (Slika 25).



**Slika 25.** Izgled tankog sloja bakterijske celuloze uzgojene u kokosovom mlijeku u ovom radu

## 5. RASPRAVA

*Kombucha* je visokovrijedni nutritivni napitak koji se dobiva fermentacijom zaslađenog čaja ili voćnog soka (saharozom ili nekim drugim izvorom ugljika) pomoću združene kulture bakterija octene kiseline i raznih vrsta kvasaca, koja se popularno naziva „čajna gljiva“. Napitak je u početku slatkast, kasnije blago kiseli i pjenušav, te nutritivno i biološki vrlo vrijedan zbog čega se i preporučuje njegovo svakodnevno konzumiranje u malim volumenima (0,5 dL/2 puta dnevno) (Greenwalt i sur., 2000; Dufresne i Farnworth, 2000).

Koncentracija i životnost čajne gljive (majčinska kultura bakterijske celuloze) može varirati od uzgoja do uzgoja. Bakterije octene kiseline sintetiziraju plutajuću biomasu *kombuche* na površini infuzije čaja, čime se pojačava združivanje bakterija i kvasaca (Balentine i sur., 1997), a kvasci previru saharozu u fruktozu i glukozu, proizvodeći etanol, dok zbog izloženosti kisiku bakterije octene kiseline biooksidacijom etanola proizvode octenu kiselinu (Reiss, 1994).

Iako tijekom fermentacije s *kombuchom* najviše nastaje octena kiselina, metabolizmom nastaju i druge organske kiseline: glukonska, glukuronska i mliječna kiselina (Dufresne i Farnworth, 2000). Rezultati dobiveni ovim istraživanjem pokazali su da je najveća koncentracija octene kiseline nakon 12 dana fermentacije postignuta u čaju od zelenog čaja sa cvjetovima jasmina uz 100 g/L dodanog šećera (14 g/L; Slika 8), a puno manje koncentracije izmjerene su u istom čaju sa 80 g/L šećera (6 g/L; Slika 9), te u fermentiranom kokosovom mlijeku (oko 9 g/L) (Slike 10 i 11). Glukozu bakterije octene kiseline oksidiraju u glukonsku kiselinu. Glukonska kiselina je druga glavna organska kiselina koja nastaje kao posljedica metabolizma *kombuche*. Kao što je vidljivo na Slici 8, koncentracija glukonske kiseline nastale tijekom fermentacije *kombuche* u zelenom čaju sa cvijetom jasmina (80 g/L šećera), bila je manja 6 puta od koncentracije octene kiseline, dok je pri koncentraciji šećera od 100 g/L, u istom čaju, bila manja 10 puta (Slika 10). Kod fermentacije u kokosovom mlijeku zabilježene su manje razlike u koncentracijama octene i glukonske kiseline, tako da je pri 80 g/L šećera omjer octene i glukonske kiseline bio 4 puta manji (Slika 10), a pri koncentraciji šećera od 100 g/L 2,5 puta manji (Slika 11). Prema dostupnim literaturnim podacima, masena koncentracija etanola u *kombucha* pripravcima ne prelazi koncentraciju od 1 % (vol/vol) (Markov i sur., 2003). Sievers i sur. (1995) su objavili da su nakon 10 dana fermentacije *kombuche* u crnom čaju izmjerili maksimalnu masenu koncentraciju etanola od 3.6 g/L. U

ovom radu su se koncentracije etanola nakon 48 h fermentacije kretale između 0,55 i 0.75 g/L, a nakon 12 dana fermentacije su u svim uzorcima smanjene na 0.01 g/L (Slike 8-11).

Svaki mikroorganizam za svoj rast i metabolizam ima svoj optimalni pH interval, tako da pH vrijednost hranjive podloge ima važnu ulogu u mikrobnom rastu i sintezi bakterijske celuloze (Sinclair, 1987). Tijekom 12 dana fermentacije, pH vrijednosti infuzije zelenog čaja sa cvjetovima jasmína se razmjerno smanjivala bez obzira na hranjivu podlogu i udjel šećera (Slika 12). Dobiveni rezultati su u suglasju s istraživanjima Hwanga i sur. (1999), koji su zaključili da prijetvorba glukoze u glukonsku kiselinu rezultira značajnim padom pH vrijednosti tijekom fermentacije.

Tijekom fermentacije čaja pomoću *kombuche*, već nakon 24 h je vidljivo stvaranje prozirne opne na površini tekućine, koja s vremenom fermentacije postaje sve deblja i želatinoznija. Prema istraživanjima Goha i sur. (2012), koji su pratili prinos biomase *kombuche* ovisno o koncentraciji šećera (od 50 do 250 g/L), uočeno je da se prinos biomase povećavao do 90 g/L (66.7 %), a nakon toga se naglo smanjivao, te je pri najvećoj koncentraciji od 250 g/L bio samo 9.9 %. Ovisno o vrsti hranjive podloge postignuti su različiti prinosi celulozne biomase, pri čemu je prinos postignut nakon 12 dana uzgoja u zelenom čaju sa cvjetovima jasmína (80 g/L) postignut prinos od 143,66 % celulozne biomase, dok su uzgojem u kokosovom mlijeku postignuti dvostruko manji prinosi (54, 27 do 64,93 %) (Tablica 1).

Kemijska struktura bakterijske celuloze sintetizirane u zelenom čaju sa cvjetovima jasmína i kokosovom mlijeku je određivana u infracrvenom spektru (IR). Nakon analiza se pokazalo da su uzorci bili amorfnije strukture no što je očekivano jer je bakterijska struktura znana po svojoj kristalichnosti (Huang i sur., 2014). Pikovi kod  $862,54\text{ cm}^{-1}$  i  $803\text{ cm}^{-1}$  potvrdili su  $\beta$ -1,4-glukozidne veze, koje su poveznica, uz vodikove veze, cijele strukture bakterijske celuloze (Slike 13 i 14).

Difrakcija rendgenskim zrakama pokazala je da svi uzorci pokazuju manje ili više izražene difrakcijske maksimume karakteristične za celulozu, te amorfni halo (odstupanje od ravne bazne linije), što pokazuje da je celuloza razmjerno slabo kristalna. Kristalnost, procijenjena iz veličine haloa, raste u nizu (g/L): jasmín 80 < jasmín 100 < kokos 100 <= kokos 80. Razlika položaja prva dva maksimuma ( $2\theta_2 - 2\theta_1$ ) najveća je za kokos (100 g/L) i zeleni čaj s jasmínom (100 g/L), a ni zeleni čaj s jasmínom (80 g/L) se ne razlikuje znatno. Ta tri uzorka imaju i najveći  $d_1$ . Kokos (80 g/L) ima srednju razliku položaja maksimuma i  $d_2$ . Razlike u međuplošnim razmacima pripisuju se promjenama u omjeru  $I_\alpha$  i  $I_\beta$  celuloze (Czaja i sur., 2004), no u ovom radu dolazi do primjetne promjene samo u položaju prvog

maksimuma. Veličina kristalita određena Scherrerovom formulom ne razlikuje se previše od uzorka do uzorka. Veličina svih kristalita je 7 – 9 nm, s iznimkom veličine određene iz srednjeg, najmanjeg maksimuma, kod kojega je i najveća pogreška određivanja zbog djelomičnog preklapanja s prvim maksimumom.

Pretražnom elektronskom mikroskopijom konačno smo ušli u srž bakterijske celuloze, te je snimanjem i površinskog i strukturnog dijela vidljiva prisutnost bakterija octene kiseline i kvasaca na površini bakterijskih celuloza uzgojenih u zelenom čaju sa cvjetovima jasmina i kokosovom mlijeku (Slike 19 i 22). Na Slici 19 je jasno vidljivo pupanje kvasca, što ukazuje na životnost simbiotičke kulture bakterija octene kiseline i kvasaca, dok na Slici 21 dominiraju bakterije octene kiseline. Na Slici 20 vidljiva je 3D mreža bakterijskih celuloznih vlakana nakon fermentacije u zelenom čaju sa cvjetovima jasmina (100 g/L šećera), u kojoj su vlakna vidljivo deblja od vlakana bakterijske celuloze dobivene nakon fermentacije u kokosovom mlijeku (100 g/L šećera) (Slika 22).

Inokulacija čajne gljive zajedno s prethodno fermentiranim čajem (3 % v/v), ne samo da osigurava brzi početak fermentacije (Sievers i sur., 1995), nego i štiti od naseljavanja plijesni, kao i drugih neželjenih mikroorganizama (Frank, 1999). Ovo zapažanje su naknadno potvrdili Greenwalt i sur. (2000), uz objašnjenje da je smanjenjem pH infuzija čaja s prethodno fermentiranim čajem mogućnost kontaminacije drugim mikroorganizmima značajno smanjeno.

Antimikrobna aktivnost fermentiranih uzoraka čajeva kvantitativno je praćena mjerenjem prisutnosti ili odsustva zona inhibicije rasta testiranih vrsta bakterija (*S. typhimurium*, *E. coli*, *Pseudomonas* sp. i *V. cholearea*, te pojave zamućenih zona, kojima se može objasniti djelomična inhibicija rasta mikroorganizama (Slika 24, Tablica 5). Dobiveni rezultati su pokazali da je rast *Pseudomonas* sp. bio djelomično inhibiran samo uzgojem u kokosovom mlijeku gdje su primijećene zamućene, a ne čiste zone inhibicije. Rast *E. coli* nije inhibirao niti jedan od istraživanih hranjivih podloga, dok je kod *S. typhimurium* zabilježena najveća antimikrobna aktivnost. Niti jednahranjiva podloga nije inhibirala rast *V. cholearea* (Slika 24, Tablica 5). Ovi se rezultati mogu djelomično usporediti s rezultatima koje su dobili Battikh i sur. (2012), koji su istraživali antimikrobne učinke fermentacije infuzija začinskog bilja s *kombuchom*. Do sada nisu objavljeni bilo kakvi rezultati istraživanja provedenih na fermentaciji ovih kompleksnih podloga s *kombuchom* koje su istraživane u ovom radu.

## 6. ZAKLJUČCI

1. *Kombucha* je nutritivno vrijedni napitak dobiven fermentacijom saharozom zaslađenog napitka pomoću simbiotički združene kulture bakterija octene kiseline i raznih vrsta kvasaca. U ovom radu su istraživane fermentacije *kombuche* na infuzijama zelenog čaja sa cvjetovima jasmina i kokosovom mlijeku.

2. Tijekom 12 dana fermentacije, istraživane su koncentracije nastalih organskih kiselina (octene i glukonske) i etanola s komercijalnom kulturom *kombuche* pri sobnoj temperaturi, uz dodatak 80 i 100 g/L saharoze. Koncentracije octene i glukonske kiseline su tijekom fermentacije rasle u kokosovom mlijeku, dok je kod zelenog čaja porast zabilježen tek pri kraju fermentacije.

3. U svim je uzorcima tijekom fermentacije pad pH vrijednosti i koncentracije etanola bio u korelaciji s povećanjem koncentracije octene kiseline.

4. Najveći prinos celulozne biomase nakon 12 dana fermentacije izmjeren je u zelenom čaju sa cvjetovima jasmina sa 80 g/L šećera (143,66 %), a najmanji u kokosovom mlijeku sa 100 g/L šećera (54.27 %).

5. Kemijska i morfološka struktura, te kristaliničnost su ispitivane FT-IR, XRD i SEM analizama, kojima je potvrđena jača amorfna struktura od kristalinične.

6. Antimikrobna aktivnost ispitivana je mjerenjem zona inhibicije rasta bakterija *S. typhimurium*, *E. coli*, *Pseudomonas* sp. i *Vibrio cholarea*. Fermentirani čaj i kokosovo mlijeko pokazale su izvrsnu antimikrobnu aktivnost prema bakterijskim kulturama, no vrsta *V. cholarea* nije bila inhibirana.

## 7. ZAHVALE

Najljepše se zahvaljujemo našoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Sunčici Beluhan sa Zavoda za biokemijskog inženjerstva Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta koja nas je stručno i strpljivo vodila kroz sve faze izrade ovog rada te svojim savjetima, znanjem, iskustvom i riječima podrške uvijek bila spremna pomoći pri izradi ovog rada.

Zahvaljujemo se izv. prof. dr. sc. Jeleni Macan sa Zavoda za fizikalnu kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu koja nam je omogućila izvođenje analiza pretražne elektronske mikroskopije (SEM) i difrakcije rendgenskim zrakama (XRD) te nam svojim znanjem pomogla pri interpretaciji rezultata.

Zahvaljujemo se izv. prof. dr. sc. Senki Djaković sa Zavoda za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta koja nam je omogućila FT-IR spektroskopsku analizu te nam pomogla pri izvođenju i stručnom obrazloženju rezultata.

Veliko hvala gospođama Ljiljani Blažević i Marini Vnućec koje su nam uvijek bile na raspolaganju i spremne pomoći u laboratoriju kao i našim prijateljima na podršci i razumijevanju tijekom izrade ovog rad.



## 8. POPIS LITERATURE

1. Bergey, D.H., Holt, J.G. (1994) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, *Williams i Wilkins* **9**, USA.
2. Borzani, W., DeSouza, S.J.(1995) Mechanism of the film thickness increasing during the bacterial production of cellulose on non-agitated liquid media. *Biotech. Lett.* **17**, 1271–1272.
3. Budhiono, A., Rosidi, B., Taher, H., Iguchi, M.(1999) Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in Nata-de-Coco culture system. *Carbohydr. Polym.* **40**, 137–143.
4. 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.
5. Chawla, P.R., Bajaj, I.B., Survase, S.A., Singhal, R.S. (2009) Microbial cellulose: Fermentative production and applications. *Food Technol. Biotechnol.* **47**, 107-124.
6. Chen, C., Liu, B.Y. (2000) Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *J. Appl. Microbiol.* **89**, 834-839.
7. Chen, P., Cho, S.Y., Jin, H.J.(2010) Modification and applications of bacterial celluloses in polymer science. *Macromol. Res.* **18**,309–320.
8. Colvin, J. R. (1980) The biosynthesis of cellulose: Plant biochemistry, *Academic Press Inc.*, New York, 543-570.
9. Czaja, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S., Brown, R.M. Jr (2006) Microbial cellulose-the natural power to heal wounds. *Biomaterials* **27**,145–151.
10. Dahman, Y.(2009) Nanostructured biomaterials and biocomposites from bacterial cellulose nanofibers. *J. Nanoscience Nanotechnology* **9**, 5105–5122.
11. 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.
12. David, N. S. (1996) Chemical modification of Lignocellulosic Materials: Chemical structures of cellulose, hemicelluloses and lignin, *Marcel Dekker. Inc.*, New York, USA.
13. Dufresne, C., Farnworth, E. (2000) Tea, Kombucha and health: a review. *Food Res. Int.* **33**, 409-421.

14. 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.
15. Embuscado, M., Marks, J., Bemiller, J. (1994) Bacterial cellulose. I. Factors affecting the production of cellulose by *Acetobacter xylinum*. *Food Hydro.* **8**, 407-418.
16. Embuscado, M., Marks, J., Bemiller, J. (1994) Bacterial cellulose. II. Optimization of cellulose production by *Acetobacter xylinum* through response surface methodology. *Food Hydro.* **8**, 419-430.
17. Fontana, J. D., Souza, A. M., Fontana, C. K., Toriani, I. L., Moreschi, J. C. (1990) *Acetobacter* cellulose pellicle as a temporary skin substitute. *Appl. Biochem. Biotech.* **24**, 253-264.
18. Gayathry, G., Gopalaswamy, G.(2014) Production and characterization of microbial cellulosic fibre from *Acetobacter xylinum*. *Indian J. Fibre Text.* **39**,93-96.
19. 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.
20. Guo, J., Catchmark, J.M. (2012) Surface area and porosity of acid hydrolyzed cellulose nanowhiskers and cellulose production by *Gluconobacter xylinus*. *Carbohydr. Polym.* **87**, 1026-1037.
21. Hestrin S., Schramm M. (1954) Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochem. J.* **58**(2),345
22. Hwang, J.W., Yang, Y.K., Hwang, J.K., Pynu, Y.R., Kim, Y.S. (1999) Effect of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* RBC5 in agitated culture. *J. Sci. Bioeng.* **88**, 183-188.
23. Jayabalan, R., Marimuthu, S., Swaminathan, K. (2007) Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chem.* **102**, 392-398.
24. Kawecki, M., Krystynowicz, A., Wysota, K., Czaja, W., Sakiel, S. (2004) Bacterial cellulose biosynthesis, properties and applications. *International Review Conference Biotechnology*, Vienna, Austria, 14–18.
25. Keshk, S.M.A.S. (2014) Bacterial cellulose production and its industrial applications. *J. Bioprocess Biotech.* **4**, 1-10.

26. Keshk, S.M.A.S., Sameshima, K. (2006) Utilization of Sugar Cane Molasses with/without the Presence of Lignosulfonate for the Production of Bacterial Cellulose. *Appl. Microb. Biotech.* **72**, 291-296.
27. Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.P., Bohn, A.(2005) Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew. Chem. Int. Edit.* **44**, 3358–3393.
28. Lin, S.P., Calvar, I.L., Catchmark, J.M., Liu, J.R., Demirci, A., Cheng, K.C. (2013) Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. *Cellulose* **20**, 2191–2219.
29. 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.
30. Masaoka, S., Ohe, T., Sakota, N. (1993) Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. *J. Ferment. Bioeng.* **75**, 18-22.
31. Oikawa, T., Morino, T., Ameyama, M. (1995) Production of cellulose from D-Arbitol by *Acetobacter xylinum* KU-1. *Biosci. Biotech. Bioch.* **59**, 1564-1565.
32. Okiyama, A., Motoki, M., Yamanka, S.M. (1993) Bacterial cellulose III. Development of a new form of cellulose. *Food Hydrocoll.* **6**, 493-501.
33. Park, J.K., Park, Y.H., Jung, J.Y.(2003) Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* PJK isolated from rotten apple. *Biotechnol. Bioproc. E* **8**, 83–88.
34. 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.
35. Ross, P., Mayer. R., Benziman, M. (1991) Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol. Rev.* **55**, 35-58.
36. Saibuatong, O.A., Phisalaphong, M.(2010) Novo aloe vera-bacterial cellulose composite film from biosynthesis. *Carbohydr. Polym.* **79**, 455–460.
37. 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.
38. Santos, S.M., Carbajo, J.M., Quintana, E., Ibarra, D., Gomez, N., Ladero, M., Eugenio, M.E., Villar, J.C.(2014). Characterization of purified bacterial cellulose focused on its use on paper restoration. *Carbohydr. Polym.*

39. Shah, N., Ul-Islama, M., Khattaka, W.A., Parka, J.K.(2013) Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material. *Carbohydr. Polym.* **98**, 1585–1598.
40. Sheykhnazaria, S., Tabarsaa, T., Ashorib, A., Shakeric, A., Golalipourd, M.(2011) Bacterial synthesized cellulose nanofibers; effects of growth times and culture mediums on the structural characteristics. *Carbohydr. Polym.* **86**, 1187– 1191.
41. Shezad, O., Khan, S., Khan, T., Park, J. K. (2010) Physicochemical and mechanical characterization of bacterial cellulose produced with an excellent productivity in static conditions using a simple fed-batch cultivation strategy. *Carbohydr. Polym.* **82**, 173–180.
42. 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.
43. Siró, I., Plackett, D. (2010) Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. *Cellulose* **17**,459–494.
44. 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.
45. 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.
46. Tajima, K., Fujiwara, M., Takai, M. (1995) Biological control of cellulose. *Macromol.Symp.* **99**, 149-155.
47. 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.
48. Tanaka, M., Murakami, S., Shinke, R., Aoki, K. (2000) Genetic characteristics of cellulose-forming acetic acid bacteria identified phenotypically as *Gluconacetobacter xylinus*. *Biosci. Biotechnol. Bioch.* **64**,757-60.
49. Tang, X., Kumar, P., Alavi, S., Sandeep, K.(2012) Recent advances in biopolymers and biopolymer-based nanocomposites for food packaging materials. *CrcCr. Rev. Food Sci.* **52**, 426–442.

50. Tanskul, S., Amornthatree, K., Jaturonlak, N.(2013) A new cellulose-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. MI 2: screening and optimization of culture conditions. *Carbohydr. Polym.* **92**, 421-428.
51. Teoh, A.L., Heard, G., Cox, J. (2004) Yeast ecology of Kombucha fermentation. *Int. J. Food Microb.* **95**, 119-126.
52. Torres, F. G., Commeaux, S., Tronsoco, O.P. (2012) Viocompatibility of bacterial cellulose based biomaterials. *J. Funct. Biomater.* **3**, 864-878.
53. 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.
54. Watanabe, K., Tabuchi, M., Morinaga, Y., Yoshinaga, F. (1998) Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. *Cellulose* **5**, 187–200.
55. Wippermann, J., Schumann, D., Klemm, D., Kosmehl, H., Salehi-Gelani, S., Ahlers, T.(2009) Preliminary results of small arterial substitute performed with a cylindrical biomaterial composed of bacterial cellulose. *Eur. J. Vasc. Endovasc.* **37**, 592-596.
56. Zhu, H., Jia, S., Yang, H., Tang, W., Jia, Y., Tan, Z.(2010) Characterization of bacteriostatic sausage casing: A composite of bacterial cellulose embedded with polylysine. *Food Sci. Biotechnol.***19**, 1479-1484.
57. Ç akar, F., Özer, I., Aytekin, A.Ö., Şahin, F.(2014)Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium. *Carbohydr. Polym.* **106**, 7–13.

## 9. SAŽETAK

*Kombucha* je osvježavajući napitak koji se dobiva fermentacijom zaslađenog čaja ili voćnih napitaka zahvaljujući snažnom simbiotskom djelovanju bakterija octene kiseline i kvasaca. U radu je proučavano nastajanje organskih kiselina (octene i glukonske), etanola i bakterijske celuloze biotransformacijom *kombuche* u zelenom čaju s jasminom i kokosovom mlijeku zaslađenim saharozom (80 i 100 g/L). Promjene pH vrijednosti posljedica su simbiotske metaboličke aktivnosti osmofilnih kvasaca i bakterija octene kiseline i smanjivale su se s nastajanjem organskih kiselina. Najviše koncentracije octene i glukonske kiseline bile su 14 g/L (zeleni čaj sa cvjetovima jasmina) i 3,8 g/L (kokosovo mlijeko).

Analiziranjem uzoraka pomoću FT-IR spektroskopije, XRD analize i SEM pretraživanja, otkriveno je da su svi uzorci imali veći postotak amorfne strukture, a ne kristalične, kako je očekivano. Debljina i prinos bakterijske celuloze povećavali su se tijekom vremena fermentacije. Najveći prinos bakterijske celuloze dobiven je u podlozi sa zelenim čajem i cvjetovima jasmina (143.66 %). Dobiveni rezultati ovog istraživanja ukazuju da maksimalni prinos bakterijske celuloze ovisi o mnogo čimbenika koje još treba dodatno optimizirati.

**Ključne riječi:** *kombucha*, bakterijska celuloza, morfologija, fizikalna svojstva, antimikrobna svojstva

## 10. SUMMARY

*Kombucha* is a traditional refreshing beverage obtained by the fermentation of sweetened tea with a powerful symbiosis of acetic bacteria and yeasts. The production of organic acids (acetic and gluconic) and bacterial cellulose by biotransformation of *kombucha*, in green tea with jasmine and cocoa milk, sweetened with sucrose (80 and 100 g/L) was studied. Changes in pH were related to the symbiotic metabolic activities of yeasts and acetic acid bacteria, and it is decreased by the formation of organic acids. Analysing samples by FT-IR spectroscopy, XRD analysis and scanning electron microscopy, it was detected that all the samples had higher percentage of amorphous regions, than crystalline regions, as it was expected. The thickness and yield of bacterial cellulose increased with fermentation time. The highest yield of bacterial cellulose was obtained green tea with jasmine substrate (143,66%). The bacterial cellulose production increased correspondingly with increased surface area depth ratio. Findings from this study suggest that the yield of cellulose depends on many factors that need to be optimized to achieve maximum yield.

**Keywords:** *kombucha*, bacterial cellulose, morphology, physical properties, antimicrobial properties