

Učinak izvora ugljika na biotransformaciju kombuche, nastajanje organskih kiselina i sintezu bakterijske celuloze

Jukić, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:159:474735>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2016.

Ivan Jukić
682/BPI

**UČINAK IZVORA UGLJIKA NA
BIOTRANSFORMACIJU
Kombuche, NASTAJANJE
ORGANSKIH KISELINA I
SINTEZU BAKTERIJSKE
CELULOZE**

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

ZAHVALA

Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Sunčici Beluhan koja mi je omogućila svu potrebnu opremu i pomogla svojim savjetima pri izradi ovog diplomskog rada, i što je uvijek imala strpljenja i vremena za moje brojne upite.

Hvala Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu na izvrsnom teorijskom i praktičnom obrazovanju.

Također, zahvaljujem se svim svojim prijateljima i djevojci, koji su uvijek bili uz mene i bez kojih cijeli ovaj tijek mog studiranja ne bi prošao tako lako i zabavno.

Posebnu zahvalnost iskazujem cijeloj svojoj obitelji koja me je uvijek podržavala i upućivala na pravi put.

I na kraju, najveću zaslugu za ono što sam postigao pripisujem svojim roditeljima, koji su uvijek bili tu, uz mene i bez kojih sve ovo što sam dosad postigao ne bi bilo moguće.

Velika HVALA svima!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

UČINAK IZVORA UGLJIKA NA BIOTRANSFORMACIJU KOMBUCHE, NASTAJANJE ORGANSKIH KISELINA I SINTEZU BAKTERIJSKE CELULOZE

Ivan Jukić, 682/BPI

Sažetak: *Kombucha* je tradicionalni osvježavajući napitak koji se dobiva fermentacijom zaslađenog čaja zahvaljujući snažnom simbiotskom djelovanju bakterija octene kiseline i kvasaca. U radu su proučavani nastajanje organskih kiselina (octene i glukonske), etanola i bakterijske celuloze (BC) biotransformacijom kombuche u biljnom čaju zaslađenom saharozom i u Hestrin-Schrammovoju hranjivoj podlozi (HS), koja je sadržavala glukozu, etanol i glicerol kao jedine izvore ugljika. Promjene pH vrijednosti bile su posljedica simbiotske metaboličke aktivnosti kvasaca i bakterija octene kiseline i opadale su s nastajanjem organskih kiselina. Debljina i prinos bakterijske celuloze povećavali su se tijekom vremena fermentacije. Najveći prinos bakterijske celuloze dobiven je u podlozi s glicerolom (2 % vol/vol) i glukozom (20 g/L) i bio je 17 g/g i 14,5 g/g. Nastajanje bakterijske celuloze povećavalo se razmjerno povećanju odnosa površine i dubine hranjive podloge. Dobiveni rezultati ovog istraživanja ukazuju da maksimalni prinos bakterijske celuloze ovisi o mnogo čimbenika koje još treba dodatno optimizirati.

Ključne riječi: *bakterijska celuloza, biotransformacija, fermentacija, organske kiseline*

Rad sadrži: 67 stranica, 23 slika, 4 tablica, 127 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Datum obrane: ?, rujna, 2016.

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

EFFECT OF CARBON SOURCES ON KOMBUCHA BIOTRANSFORMATION, ORGANIC ACIDES PRODUCTION AND SYNTHESIS OF BACTERIAL CELLULOSE

Ivan Jukić, 682/BPI

Abstract: *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 (BC) by biotransformation of *Kombucha*, in herbal tea with wild cherry flavour, sweetened with sucrose and Hestrin and Schramm (HS) based media containing glucose, ethanol or glycerol as sole carbon sources, 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. The thickness and yield of bacterial cellulose increased with fermentation time. The highest bacterial cellulose yield was achieved when glycerol (2% v/v) and glucose (20 g/L) (17 g/g and 14.5 g/g, respectively) were used. 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: *bacterial cellulose, biotransformation, fermentation, organic acids*

Thesis contains: 67 pages, 23 figures, 4 tables, 127 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *Suncica Beluhan, Associate professor*

Reviewers:

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

Thesis defended: ?, September, 2016

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Od čaja do <i>kombuche</i> – infuzija i fermentacija	3
2.2. Mikrobiološki sastav <i>kombuche</i>	4
2.3. Blagotvorni učinci <i>kombuche</i>	4
2.3.1. Kemijski sastav	4
2.3.1. Biološka aktivnost	6
2.3.1.1. Epidemiološka istraživanja	7
2.3.1.2. Eksperimentalna istraživanja	8
2.3.1.3. Biodostupnost	9
2.3.1.4. Antibakterijska i antiviralna aktivnost	10
2.3.1.5. Drugi zaštitni učinci čaja	11
2.4. <i>Kombucha</i> : između lijeka i opasnog napitka	11
2.5. Bakterijska celuloza – izvor čiste celuloze	13
2.6. Struktura bakterijske celuloze	15
2.7. Biosinteza bakterijske celuloze	17
2.8. Fermentacija	19
2.8.1. Biosinteza celuloze iz različitih izvora ugljika	19
2.9. Primjena bakterijske celuloze	21
2.9.1. Biomedicina - terapija oštećene kože	22
2.9.2. Prehrambena industrija	23
3. MATERIJALI I METODE RADA	25
3.1. Tijek istraživanja	25
3.2. Materijali i metode rada	26
3.2.1. Priprava kulture <i>kombuche</i>	26
3.2.2. Vrsta čaja	26
3.2.3. Priprava kompleksne podloge (fermentirani čaj)	26
3.2.4. Kemijski definirane podloge	27
3.2.4. Određivanje pH vrijednosti	27
3.2.5. Određivanje koncentracije octene kiseline	28
3.2.6. Određivanje koncentracije glukonske kiseline	28
3.2.7. Određivanje alkohola kemijskom metodom	28
3.2.8. Izračunavanje mase i prinosa celulozne biomase <i>kombuche</i>	30
3.2.9. Određivanje utjecaja površine i dubine hranjive podloge na kinetiku sinteze bakterijske celuloze	30
3.2.10. Određivanje kapaciteta zadržavanja vode (WHC)	31
3.2.11. Određivanje brzine otpuštanja vode (WRR)	31
4. REZULTATI I RASPRAVA	32
4.1. Organske kiseline i etanol	33
4.1.1. Kompleksna podloga - čaj	33
4.1.2. Kemijski definirane podloge	36
4.2. Sintaza bakterijske celuloze	39
4.3. Utjecaj površine i dubine hranjive podloge na proizvodnju bakterijske celuloze	46
4.4. Utjecaj površine bakterijske celuloze na kapacitet zadržavanja i brzinu otpuštanja vode	49
5. ZAKLJUČCI	52
6. LITERATURNI NAVODI	53

1. UVOD

Biljka čajevac se uzgaja u približno 30 zemalja, a čaj dobiven infuzijom listića čajevca je najčešće, uz vodu, konzumirano piće na svijetu. *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). Napitak je osvježavajuće slatkast, blago kiseli, lagano pjenušav poput jabukovače, a zbog njegovih nutritivnih, bioloških i ekoloških vrijednosti, preporučuje se svakodnevna konzumacija u malim količinama (Blanc, 1996). Ishodište mu je u Kini, no *kombucha* se na tradicionalni način proizvodi u mnogim kućanstvima, uključujući i Europu, sjevernu Ameriku i Sjevernu Afriku. S porastom ljudske brige za unošenjem hrane i pića visoke kakvoće, povećala se zainteresiranost za ovim napitkom, posebice u razvijenim zemljama. Danas *kombucha* predstavlja komercijalni proizvod novije generacije koji se može pronaći u prodavaonicama zdrave hrane širom Europe i Amerike (Malbaša i sur., 2008).

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 stvara tanka celulozna opna, 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). Također, bakterijska celuloza pronalazi primjenu gdje se biljna celuloza ne može iskoristiti. 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 promjene koje se zbivaju tijekom biotransformacije simbiotski združene kulture bakterija octene kiseline i kvasaca (*kombucha*) tijekom 12 dana uzgoja u kompleksnoj (biljni čaj) i kemijski definiranim podlogama s različitim izvorima ugljika. U kompleksnoj podlozi glavni izvor ugljika bila je saharoza (70 g/L), dok su u kemijski definiranim podlogama izvori ugljika bile različite koncentracije glukoze (1-5% tež/vol), te etanola i glicerola (1-5 % vol/vol). Tijekom fermentacija praćeni su i određivani sljedeći parametri:

- koncentracija organskih kiselina (octene i glukonske) i nastalog etanola,
- kinetika sinteze bakterijske celuloze u kompleksnim podlogama,
- utjecaj temperature, pH vrijednosti, te različitih izvora ugljika na sintezu bakterijske celuloze u kompleksnim podlogama,
- utjecaj površine i dubine hranjive podloge na sintezu bakterijske celuloze,
- utjecaj površine bakterijske celuloze na kapacitet zadržavanja i brzinu otpuštanja vode.

2. TEORIJSKI DIO

2. 1. OD ČAJA DO KOMBUCHE – INFUZIJA I FERMENTACIJA

Čajevac pripada porodici *Theaceae*, a najpoznatije su dvije glavne sorte: *Camellia sinensis* var. *sinensis* (uzgaja se u Kini) i *Camellia sinensis* var. *assamica* (uzgoj u Indiji i Sri Lanki) (Hara i sur., 1995a). Prvi apikalni listovi se beru sa zimzelenih grmova i mogu se obrađivati na različite načine. Zeleni čaj se zatim suši sa ili bez faze fiksacije zbog inaktivacije enzima (Hara i sur., 1995b). Crni čaj, najpopularniji predstavnik čajeva na svijetu dobiva se oksidacijom polifenola lista čajevca multienzimskim procesom (Hara i sur., 1995c), pri čemu se stvaraju novi kompleksi polifenolnih molekula.

Tradicionalno su crni čaj i konzumni šećer najčešći supstrati za pripremu *kombuche*, no u posljednje se vrijeme različite vrste čajeva koriste za pripravu ovog napitka (Reiss, 1994). Čajni listići dodaju se u kipuću vodu zaslađenu s određenom koncentracijom saharoze (od 50 do 100 g/L), ekstrahiraju 10-15 minuta, a nakon toga se čaj procijedi i ostavlja da se ohladi. Procijeđeni čaj se ulijeva u čistu staklenu ili porculansku posudu sa širokim otvorom, te se zakiseljava dodatkom octa ili već pripremljenim *kombucha* napitkom. Nakon toga se na površinu čaja pažljivo dodaje „majčinska“ kultura *kombuche* iz prošlog uzgoja i posuda se prekriva sa čistom pamučnom tkaninom ili gazom, te brzo zatvara. Fermentacija se odvija na sobnoj temperaturi (između 20 i 30 °C) tijekom 2-8 tjedana. Tijekom fermentacije, stanice kćeri *kombuche* sintetiziraju bakterijsku celulozu (tanke opne biomase) na površini čaja. Po završetku fermentacije, bakterijska celuloza *kombuche* ili čajne gljive se pažljivo uklanja s površine i skladišti pri +4 °C u malom volumenu fermentiranog čaja do nove inokulacije. Fermentirani čaj se kroz gazu procijedi u boce s čepovima gdje se skladišti do konzumacije u hladnjaku pri +4 °C. Okus *kombuche* se mijenja tijekom fermentacije od ugodno voćno kiselkasto pjenušavog okusa nakon par dana, do srednje octenog okusa nakon duže inkubacije (Blanc, 1995).

2.2. MIKROBIOLOŠKI SASTAV KOMBUCHE

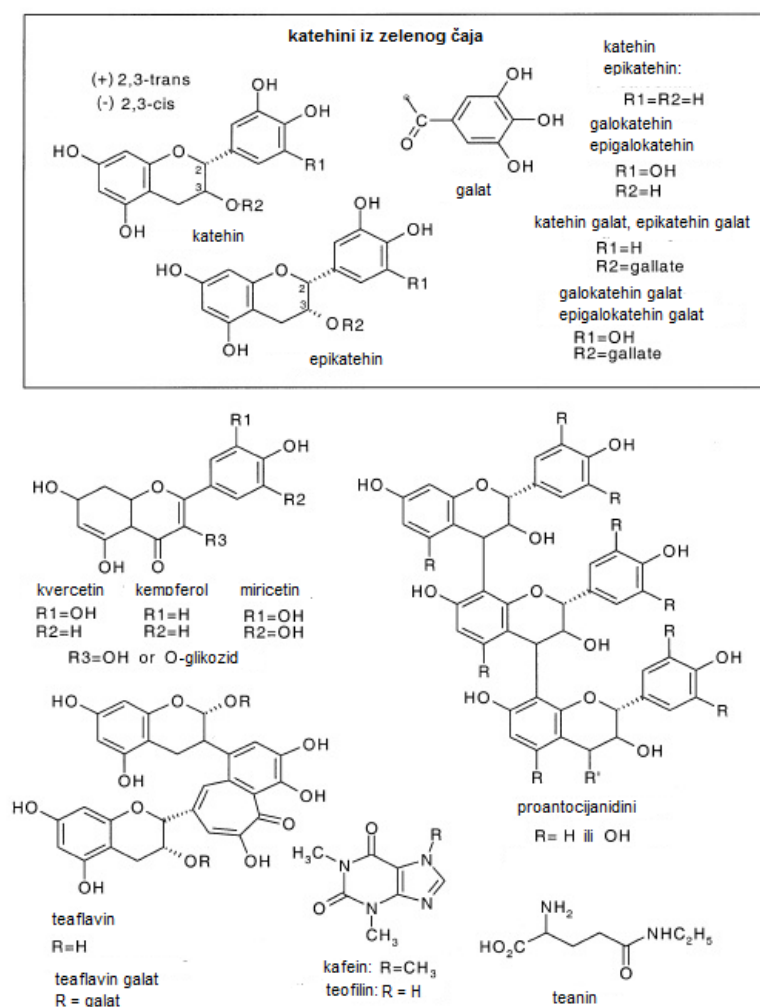
Kombucha je simbiotski združena kultura bakterija octene kiseline i osmofilnih kvasaca. Vrste glavnih bakterija octene kiseline izolirane iz čajne gljive su *Acetobacter xylinum* (Balentine, 1997), *A. xylinodes*, *Bacterium gluconicum* (Reiss, 1994), *A. aceti*, *A. pasteurianus* (Liu i sur., 1996). Identificirani kvasci su vrste *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces ludwigii*, *S. cerevisiae*, *Kloackera apiculata*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Brettanomyces bruxellensis*, *B. lambicus*, *B. custersii*, *Candida* i *Pichia* (Balentine, 1997; Liu i sur., 1996; Mayser i sur., 1995). Istraživanja ovakve „bliske suradnje mikroorganizama“ koji čine *kombuchu* te njihova interakcija sa supstratima fermentacije predmet su brojnih istraživanja (Balentine, 1997; Sievers i sur., 1995; Yurkevich i Kutysenko, 1998). *Acetobacter xylinum* posjeduje mogućnost sinteze plutajuće celulozne mreže (matriksa) u kojoj su bakterije octene kiseline imobilizirane, dok su kvasci najčešće na površini matriksa (Balentine i sur., 1997). Glavni metaboliti pronađeni u fermentiranom čaju su: octena, mliječna, glukonska i glukuronska kiselina, etanol i glicerol (Blanc, 1996; Liu i sur., 1996). Stanice kvasca hidroliziraju saharozu do fruktoze i glukoze i proizvode etanol (Reiss, 1994; Sievers i sur., 1995). Bakterije octene kiseline prevode glukozu u glukonsku kiselinu i fruktozu u octenu kiselinu. Kofein i srodni ksantini čaja stimuliraju sintezu bakterijske celuloze pomoću bakterija (Balentine i sur., 1997). Octena kiselina potiče kvasac da proizvodi etanol koji pogoduje rastu bakterija octene kiseline te sintezi octene kiseline (Liu i sur., 1996). Etanol i octena kiselina posjeduju antimikrobnu aktivnost protiv patogenih bakterija i na taj način zaštićuju *kombuchu* od mogućih kontaminacija (Liu i sur., 1996).

2.3. BLAGOTVORNI UČINCI KOMBUCHE

2.3.1. Kemijski sastav

Glavni sastojci listića zelenog čaja pripadaju polifenolnim spojevima (25-35 % suhe tvari) (Balentine i sur., 1997; Hara i sur., 1995c). Važni i karakteristični polifenoli čaja su flavanoli od kojih su dominantni katehini (flavon-3-oli), a glavni katehini su: (-)-

epikatehin, (-)-epikatehin galat, (-)-epigalokahetin, (-)-epigalokahetin galat, (+)-katehin i (+)-galokatehin (Hara i sur., 1995c). Ovi spojevi doprinose i gorčini i okusu slatkoće čajeva nakon konzumacije (Hara i sur., 1995e). Čaj također sadrži flavonole, uglavnom kvercetin, kempferol, miricetin i njihove glikozide. U crnom čaju, oksidacija polifenola tijekom obrade dovodi do formiranja kompleksa katehina i galne kiseline kao što su teaflavini, teaflavinske kiseline, teaarubigini ili teasinensini i polimere proantocijanidina (Balentine i sur., 1997; Hara i sur., 1995d). Metilksantini su prisutni kao kofein (2-4 %) i mali udjel teofilina i teobromina (Hara i sur., 1995c). Čaj također sadrži mnogo aminokiselina, ali teanin, specifičan za biljku čaja, čini 50 % svih aminokiselina (Slika 1).



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

Razgradnja aminokiselina utječe na stvaranje, odnosno oblikovanje arome čaja (Balentine i sur., 1997). Klorofil, karotenoidi, lipidi i hlapljivi spojevi nisu glavni sastojci infuzije čaja, ali također imaju važnu ulogu u razvoju arome (Hara i sur., 1995c). Hlapljivi sastojci listova čaja su detaljno proučavani i izolirano je čak 600 različitih molekula (Hara i sur., 1995c,e; Shimoda i sur., 1995; Shimoda i sur., 1995) koje uključuju terpenoide i produkte razgradnje aminokiselina, karotenoide i linolnu kiselinu (Hara i sur., 1995c). Čaj također sadrži ugljikohidrate, vitamine E, K, A, male količine vitamina B i vitamina C (samo u zelenom čaju). Također sadrži zadovoljavajuće količine kalija, mangana, te ione fluora (Hara i sur., 1995f).

2.3.1. Biološka aktivnost

Iako se *kombucha* konzumira u mnogim zemljama već niz godina, a ponegdje stoljećima i tisućljećima, tek se posljednjih tri desetljeća znanstvena zajednica zainteresirala za istraživanja blagotvornih učinaka biološki aktivnih supstancija u tom napitku.

Mnogi ljudi diljem svijeta koji konzumiraju *kombucha* čaj tvrde da taj čaj ima mnogo pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje. Međutim, većina je blagotvornih učinaka proučavana samo eksperimentalno i manjak je znanstvenih dokaza temeljenih na kliničkim istraživanjima na ljudima.

Učinci *kombuche* prema rezultatima znanstvenih istraživanja su slijedeći: detoksikacija krvi, smanjenje razine kolesterola, smanjenje ateroskleroze regeneracijom staničnih stijenki, smanjenje krvnog tlaka, smanjenje upalnih problema, ublažavanje artritisa, reume i simptoma gihta, poboljšanje funkcije jetre, normaliziranje crijevne aktivnosti, uravnoteženje crijevne flore, liječenje hemoroida, smanjenje pretilosti i reguliranje apetita, sprječavanje / liječenje infekcije mjehura i smanjenje kalcifikacije bubrega, poticanje endokrinog sustava, zaštita protiv dijabetesa, povećavanje otpornosti organizma na rak, antibiološko djelovanje protiv bakterija, virusa i kvasaca, poboljšavanje imunološkog sustava i stimuliranje proizvodnje interferona, olakšavanje bronhitisa i astmu, smanjenje menstrualnih poremećaja i olakšavanje menopauze, poboljšavanje strukture kose, kože i noktiju, smanjivanje želje alkoholičara za alkoholom, smanjivanje stresa i živčanih poremećaja i nesanice, ublažavanje glavobolje,

poboljšavanje vida, usporavanje starenja, te poboljšavanje općeg metabolizma (Dufresne i Farnworth, 2000).

Nekoliko epidemioloških istraživanja na životinjama i *in vitro* istraživanja doveli su do zaključka da čaj ima pozitivan utjecaj na mnoga zdravstvena stanja.

2.3.1.1. Epidemiološka istraživanja

Epidemiološkim istraživanjima uloge zelenog čaja (Bushman, 1998; Imai i sur., 1997), crnog čaja (Blot i sur., 1997) ili oba u liječenju raka, nisu u potpunosti dobiveni uvjerljivi znanstveni rezultati (Yang i Wang, 1993; Yokozawa i sur., 1998a). Da bi podaci dobiveni epidemiološkim istraživanjima imali smisla, moraju se uzeti u obzir pojedinačni oblici karcinoma. Rizici za oboljenje od karcinoma usne šupljine i ždrijela su obično manji kod konzumenata čaja, ali dobiveni rezultati nisu bili statistički značajni (Dreosti i sur., 1997). Uočeno je da je mogućnost oboljenja od karcinoma jednaka značajno povećana kod konzumiranja crnog čaja u nekim zemljama, u kojima se napitak ispija vrlo vruć, no nije uočena povezanost sa zelenim čajem na kojem je provedeno znanstveno istraživanje koje je ukazalo na potencijalno obrambeni učinak (Katiyar i Mukhtar, 1996). Neka epidemiološka istraživanja ukazuju da čaj ima obrambeni učinak prema raku želuca iako druge studije pokazuju suprotne rezultate (Bushman, 1998; Katiyar i Muhktar, 1996). Većina dostupnih izvješća ukazuje na obrnutu povezanost zelenog čaja s takvim tipom raka. Što se tiče raka ždrijela, ispijanje vrlo vrućeg čaja povećava rizik. Većina istraživanja koja se bave rizicima raka debelog crijeva ukazuju kako nema poveznice s navikama ispijanja čaja (Bushman, 1998). Međutim, utvrđena je obrnuta povezanost s povećanim unosima zelenog čaja i pojavom adenomatoznog polipa, ali rezultati nisu bili statistički značajni. Čini se, da prema mnogim studijama unos zelenog čaja smanjuje rizik razvoja raka gušterače. Nedosljedni ili nekorelirajući rezultati su objavljeni o utjecaju ispijanja čaja na prevenciju raka pluća, dojke, maternice, jetre, gušterače, bubrega i urinalnog trakta (Yokozawa i sur., 1998a). Za širu populaciju zeleni čaj može biti vrlo korisna alternativa preventivnim kemijskim pripravnicima jer je netoksičan i lako dostupan (Imai i sur., 1997). Potrebna su preciznija epidemiološka istraživanja da bi se dobili dosljedniji podaci. Moglo bi se zaključiti da današnje znanstvene informacije ukazuju da crni ili zeleni čaj pružaju

određeni obrambeni efekt protiv nekoliko vrsta karcinoma, posebice probavnog trakta (Blot i sur., 1997).

Epidemiološka istraživanja su također provedena na flavonoidima iz čaja i učestalosti kardiovaskularnih bolesti (Mitscher i sur., 1997, Tijburg i sur., 1997). Studije su pokazale vrlo malo smanjenje srčanih infarkta kod češćih konzumenata crnog čaja. Dugoročna istraživanja ukazala su na značajno smanjenje rizika od umiranja od kroničnih srčanih bolesti i manju učestalost srčanog infarkta kada ljudi konzumiraju veće količine čaja. Čaj je bogat izvor flavonoida, stoga bi epidemiološke studije o učinku flavonola na učestalost kardiovaskularnih bolesti mogle biti korisne. Nema povezanosti ili obrnute povezanosti između konzumacije flavonola i učestalosti kardiovaskularnih bolesti (Tijburg i sur., 1997). Profili lipida u serumu u ljudskim cohort studijama ukazuju na smanjenje serumskog kolesterola, ali nije dokazan učinak na serumske trigliceride ili lipoproteine visoke gustoće (Mitscher i sur., 1997).

Mnogi promjenjivi ili zbunjujući faktori kao navika konzumiranja duhana ili alkohola, dijeta, životni stil, nedostatak informacija o učestalosti ispijanja čaja mogu pridonijeti nedosljednosti rezultata. Bilo kakvi pozitivni učinci čaja mogu biti utjecani drugim uzročnim faktorima i razvoju mehanizama povezanom jednom specifičnom slučajem raka. Epidemiološka istraživanja mogu se koristiti da bi se dobile važne informacije o ljudskom odgovoru na konzumaciju čaja, ali je potrebno provesti još istraživanja. Eksperimentalna istraživanja provedena *in vitro* i sa životinjama pridonose boljem razumijevanju metabolizma i funkcije sastojaka čaja i mogu se iskoristiti kako bi se objasnili potencijalni pozitivni učinci čaja na zdravlje ljudi.

2.3.1.2. Eksperimentalna istraživanja

Mnoga su istraživanja provedena kako bi se odredili aktivni sastojci u čaju i objasnili njihova kemijska i biološka svojstva. Nekoliko različitih pristupa dovelo je do istih otkrića, a to je da su katehini i flavonoli čaja dobri antioksidansi u prisutnosti reaktivnih spojeva s kisikom (*eng.* Reactive Oxygen Species; ROS) i slobodnih radikala u vodenim i lipofilnim uvjetima (Roedig-Penman i Gordonm 1997; Sawai i Sakata, 1998; Vinson i sur., 1995; Wiseman i sur., 1997; Yokozawa i sur., 1998). U stvari, čajni katehini su najmoćniji antioksidansi među istraženim biljnim fenolima. Prema nekim

laboratorijskim testovima, epigalaktokatehin-3-galat (EGCG) je 20 puta aktivniji od vitamina C, 30 puta aktivniji od vitamina E i 2 do 4 puta aktivniji nego butilat hidroksianisol (BHA) ili butilirani hidroksitoluen (BHT). Antioksidacijska aktivnost se povećava s brojem *o*-dihidroksi grupa, iako aktivnost ovisi i o oksidacijskom okruženju. U istim uvjetima, katehini mogu pokazati vrlo visok obrambeni potencijal, inhibirajući peroksidaciju lipida u moždanom tkivu životinja s 200 puta većom aktivnošću nego α -tokoferol (Anon, 1997). Također je pokazano da katehini mogu sinergistički djelovati s tokoferolima i organskim kiselinama (Antony i Shankaranaryana, 1997; Hara i sur., 1995f). U nekim *in vitro* uvjetima mogu imati prooksidativni učinak u prisustvu Cu^{2+} ili Fe^{3+} i H_2O_2 , kao što je primijećeno i s drugim fenolnim anitoksidansima i vitaminom C (Yen i sur., 1997).

2.3.1.3. Biodostupnost

Biodostupnost flavonoida iz čaja uključujući apsorpciju, metabolizam i eliminaciju, a te mehanizme je važno istražiti da bi dobili jasnu sliku o mogućem utjecaju na žive organizme (Hollman i sur., 1997). Čisti flavonoli slabo se apsorbiraju, ali njihovu glikozidi pokazuju umjerenu do brzu apsorpciju u čovjeku, vjerojatno zbog aktivnog transporta glukoze u tankom crijevu. Katehini i produkti kondenzacije katehina iz crnog čaja se dobro apsorbiraju u ljudskom organizmu. Katehini se metaboliziraju u velikoj mjeri, ali su nejasna apsorpcija, kao i metabolički mehanizmi velikih molekula pristunih u crnom čaju. Katehini prolaze glukuronidaciju, sulfaciju i *O*-metilaciju u jetri. U debelom crijevu bakterije probijaju prsten stvarajući valerolaktone, fenilpropionsku i benzojevu kiselinu. Polifenoli imaju visoki afinitet za proteine preko različitih fenolnih grupa, posebno kada proteini imaju visoki udjel prolina kao što je slučaj u kazeinu, želatini i proteinima slane. Međutim, dodatak mlijeka u čaj nema utjecaj na koncentraciju polifenola u plazmi. Flavonoidi čaja također imaju visoki afinitet za željezo i stvaraju netopljive komplekse koji smanjuju biodostupnost željeza koji ne potiče iz hema. Apsorpcija askorbinske kiseline inhibira formiranje ovog kompleksa. Ovo su bitna otkrića, posebice za vegetarijance (Dufresne i Fornworth, 2000).

2.3.1.4. Antibakterijska i antiviralna aktivnost

Katehini zelenog čaja pokazali su antibakterijsku aktivnost protiv gram pozitivnih i gram negativnih bakterija koje mogu biti štetne za čovjeka. Ekstrakti čaja inhibiraju enterobakterije, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *Plesiomonas shigelloides* (Toda i sur., 1989), *Salmonella typhi*, *S. tiphimurium*, *S. enteridis*, *Shigella flexneri*, *S. disenteriae* i *Vibrio cholerae*. *V. parahaemolyticus* (Mitscher i sur., 1997; Toda, i sur., 1991), *Campylobacter jujuni* i *C. coli* (Dikter i sur., 1991), ali ne djeluju na bakterije vrsta *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ili *Aeromonas hydrophila* (Toda i sur., 1989). Ekstrakti crnog i zelenog čaja također mogu djelovati na *Helicobacter pylori* koja se povezuje sa želučanim, peptičnim i duodenalnim čirevima (Diker i Hascelik, 1994). Međutim, koncentracije čaja korištene u ovim istraživanjima premašuju uobičajene koncentracije pri svakodnevnom konzumiranju čaja. Polifenoli čaja mogu selektivno inhibirati rast klostridija i pogodovati rastu bifidobakterija u ljudskom debelom crijevu. Ravnoteža bakterija u crijevnoj mikroflori može biti važna za sprječavanje raka debelog crijeva (Okubo i Juneja, 1997).

Dokazana je antimikrobna aktivnosti protiv kariogenih i parodontnih bakterija. Polifenoli čaja inhibiraju *Streptococcus mutans* (Sakanaka i sur., 1989), *S. sobrinus* (Sakanaka i sur., 1990) i *Porphyromonas gingivalis*, bakterije odgovorne za stvaranje karijesa (Kakuda i sur., 1994; Sakanaka i sur., 1996). Nerolidol iz hlapljivih frakcija zelenog čaja i fluoridi prisutni u zelenom čaju pridonose antibakterijskoj aktivnosti ekstrakata čaja protiv vrste *Streptococcus mutans* (Antony i Shankaranaryana, 1997). Polifenoli i seskveterpeni čaja imaju sinergistički učinak na antibakterijsku aktivnost i antikariogena svojstva čaja (Kakuda i sur., 1994). Bakterije koje uzrokuju karijes proizvode mliječnu kiselinu koja uništava zubnu caklinu, no čaj može povećati otpornost zuba na kiseline (Gutman i Ryu, 1996). Zaštita protiv karijesa čajevim polifenolima je potvrđena istraživanjima na štakorima (Antony i Shankaaranaryana, 1997).

Neki rezultati ukazuju na to da su katehini čaja potencijalni antivirusni agensi (Gutman i Ryu, 1996). EGCG aglutinira i inhibira viruse gripe A i B grupe u životinjskim staničnim kulturama. Antivirusna aktivnost dokazana je protiv enzima HIV virusa i

protiv rotavirusa i enterovirusa u staničnim kulturama majmuna koji su prethodni tretirani s EGCG (Mitscher i sur., 1997).

2.3.1.5. Drugi zaštitni učinci čaja

Istraživanjima na štakorima je pokazano da teanin, glavna amino kiselina u zelenom čaju može regulirati krvni tlak. Teanin ima ravnotežni utjecaj u središnjem živčanom sustavu i kontrolira povećanje razinu aktivnosti izazvanu kofeinom (Hara i sur., 1995f). Ova se aminokiselina ponaša kao neurotransmitter u mozgu i može potaknuti sintezu živčanog faktora rasta kao što je epinefrin kod štakora (Chu i sur., 1997). Ekstrakt zelenog čaja dan je štakorima 1 sat prije nego je unos etanola pokrenuo metabolizam alkohola. Rezultati su pokazali da kofein i EGCG djeluju zajedno, pri čemu kofein potiče alkoholni metabolizam, a EGCG detoksificira svojom antioksidativnom aktivnošću (Kakuda i sur., 1996). Ekstrakt čaja sadrži flavonole kvercetin, kampferol i mircetin znane po svojim antialergijskim svojstvima jer inhibiraju hialuronidaznu aktivnost i otpuštanje histamina (Toyoda i sur., 1997).

Čaj ima zaštitni učinak na nekoliko važnih životnih sustava u ljudskom tijelu i lako je zaključiti da ima pozitivni utjecaj na održavanje zdravlja, no i na odgodu procesa starenja. Istraživanja o mehanizmima koji stoje iza korisnih svojstava čaja na ljudsko zdravlje napreduju, no još uvijek nisu u potpunosti zadovoljavajuća (Weisburger, 1999).

2.4. KOMBUCHA: IZMEĐU LIJEKA I OPASNOG NAPITKA

Iako konzumacija *kombuche* obično ne izaziva nikakve nepovoljne sporedne učinke, postoje određena izvješća u kojima je ukazano na moguće zdravstvene poteškoće ako se napitak konzumira u velikim količinama. Želučane tegobe, neke alergijske reakcije, posebno za one predisponirane za osjetljivost na kiseline i insuficijencija bubrega su obično uklonjeni smanjenjem konzumacije (Frank, 1998). Četiri slučaja mogućih toksičnih reakcija i dva slučaja neobjašnjive ozbiljne metaboličke acidoze su povezana s

povećanom konzumacijom kombuche (Srinivasan i sur., 1997). Također, prijavljen je slučaj moguće hepatotoksičnosti i jedan slučaj kožne bolesti (Perron i sur., 1995).

Mehanizmi nepovoljnih utjecaja do sada još nisu razjašnjeni. Kada se konzumira *kombucha*, preporučeno je piti mnogo vode kako bi se omogućilo uklanjanje toksina. Osobe koje pate od bilo koje kronične bolesti trebaju biti svjesne mogućih nepovoljnih sporednih učinaka konzumacije kombuche.

Kada se *kombucha* pripravlja u domaćinstvu, moguća je kontaminacija s potencijalno patogenim bakterijama i kvascima. Za neupućene, kada je na površini fermentirajućeg napitka vidljiva vrlo neprivlačna smeđa spužvasta tvorevina kako pluta u mutnoj smeđoj tekućini, jasno je da se radi o kontaminaciji. Zbog fermentacije u ne aseptičnim uvjetima i zato što se kultura prenosi iz jedne kuće u drugu, mogućnost kontaminacije je povećana (Mayser i sur., 1995). *Penicillium* spp. i *Candida albicans* su identificirani u kućno uzgojenim čajnim gljivama, ali patogene bakterije nisu nađene (Srinivasan i sur., 1997). *Kombucha* mora biti pripremljena i odložena u staklenoj posudi da bi se izbjeglo izluživanje toksičnih spojeva iz pripremne ili skladišne posude u napitak, a jedan od elemenata je i olovo (Phan i sur., 1998; Srinivasan i sur., 1997).

Kombuchu često njezini entuzijastični pobornici nazivaju lijekom za sve i čudesnim eliksirom. Navodi su brojni i različiti. Popis uključuje smanjenje sijedih dlaka, povećanje seksualnog nagona, poboljšanje vida, pa do korištenja kao sredstvo za čišćenje kućanstva, dezodorans ili umirujuće sredstvo za umorna stopala (Ferguson i Estelle, 1998). Pregledom znanstvene literature jasno se uočava manjak dokaza kojima bi se potvrdile mnoge od ovih tvrdnji, ali i izaziva dvojbu za valjanost drugih. Potreban je znanstveniji pristup da bi odvojili prave i neizravne učinke od neopravdanih tvrdnji. Prvi korak je identificirati sve aktivne spojeve, one koji se nalaze u listićima čaja, kao i spojeve koji su posljedica metabolizma bakterija i kvasaca tijekom fermentacije kombuche, pogotovo one koji bi mogli biti potencijalno korisni. Također je potrebno prikupiti više informacija o mehanizmima koji se događaju u tijelu da bi se više cijenila vrijednost kombuche i saznala njezina ograničenja. Istraživanja o zdravstvenim beneficijama čaja i istraživanja o utjecaju organskih kiselina na metabolizam pružaju korisnu polaznu točku. Danas je za mnogo prehrambenih proizvoda dokazano da imaju pozitivan utjecaj na zdravlje: jogurt, vino, sir, fermentirano povrće, kefir (Fuller, 1992). Ovi proizvodi sadrže žive bakterije ili metabolite bakterija proizvedenih tijekom

fermentacije. Utjecaj koji ovi probiotički proizvodi imaju na metabolizam i zdravlje postaje sve jasniji. *Kombucha* može zaista imati mnogo poželjnih učinaka na zdravlje. Otkrića o poželjnim učincima čaja i fermentiranog čaja na zdravlje su značajna zbog popularnosti ovih napitaka diljem svijeta (Marteau i Rambaud, 1993).

2.5. BAKTERIJSKA CELULOZA – IZVOR ČISTE CELULOZE

Celuloza je najrašireniji, jeftin i lako dostupan ugljikohidratni polimer u svijetu, tradicionalno izoliran iz biljaka ili njihovog otpada. Ovaj polimer u čijoj su strukturi sastavni dijelovi hemiceluloza i lignin, mora se podvrgnuti kemijski procesima hidrolize s jakim lužinama i kiselinama da bi se dobio čisti proizvod (Sun, 2008). Zbog povećanja potražnje za derivatima biljne celuloze povećana je i potrošnja drva kao sirovine, što je rezultiralo krčenjem šuma i postalo globalni okolišni problem (Park i sur., 2003).

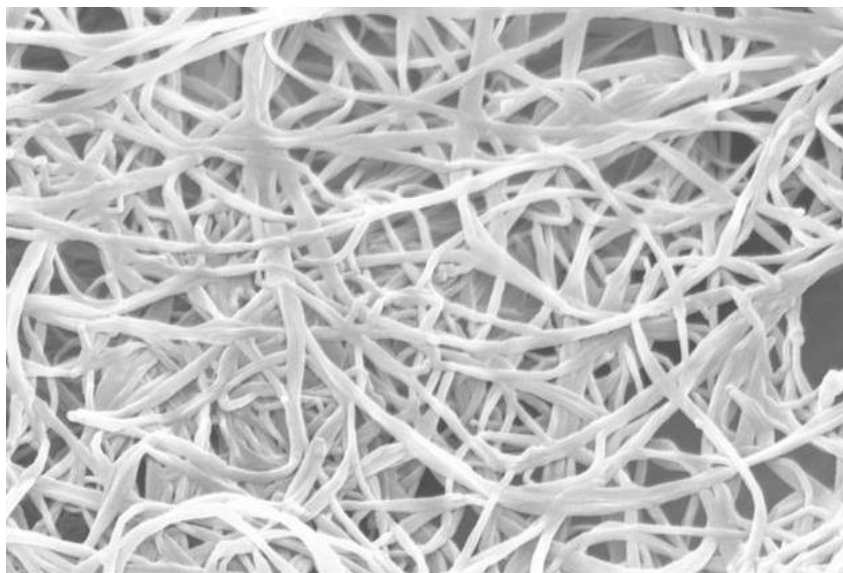
Iako su do sada biljke bile glavni izvor celuloze, razne bakterije proizvode celulozu koja može biti alternativa biljnoj celulozi. S obzirom na prirodu strukture koja se sastoji samo od monomera glukoze, bakterijska celuloza ima brojna izvrsna svojstva kao što su jedinstvena nanostruktura (Chen i sur.,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

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

Acetobacter xylinum je najviše proučavana bakterija octene kiseline jer je znanstveno dokazano da je najučinkovitiji producent bakterijske celuloze (El-Saied i sur., 2004), a može asimilirati različite šećere i sintetizirati velike količine celuloze u tekućoj podlozi (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 kontaminirajućih polisaharida i njezino izoliranje i pročišćavanje su relativno jednostavni, te ne zahtijevaju energetske ili kemijske intenzivni proces. Nadalje, ekološki problemi zbog nusproizvoda nakon dobivanja drvene celuloze daju dodatni poticaj za proučavanje neistraženih izvora celuloze (Colvin, 1980). Ne postoji niti jedan sustav koji je nastao kao idealni sustav za proučavanje biosinteze celuloze. Vrlo malo rodova bakterija može sintetizirati celulozu, ali gram-negativna bakterija *Gluconacetobacter xylinus* (prije poznata kao *Acetobacter xylinum*) izlučuje velike količine celuloze u obliku mikrovlakna iz reda sintetskih mjesta duž uzdužne osi stanice (Ross i sur., 1991; Tanaka i sur., 2000). Sintetizirana mikrovlakna se spajaju pri čemu nastaje struktura umreženih celuloznih vlakana (Slika 2).



Slika 2. 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 (Slika 3).

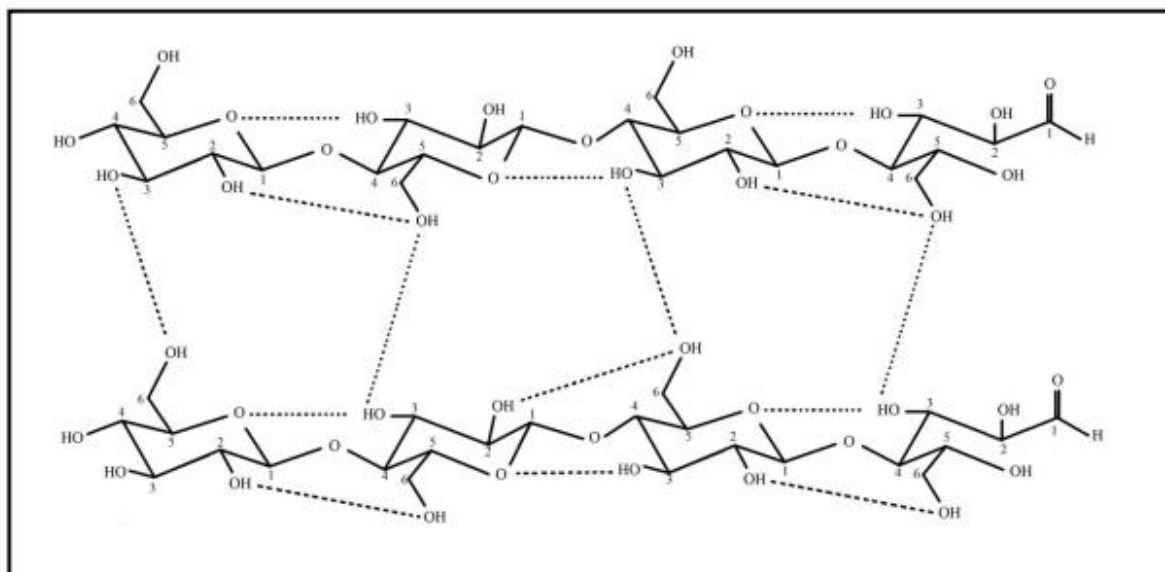


Slika 3. Bakterijska celuloza na kraju fermentacije. Pristupljeno 23. 07. 2016.

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

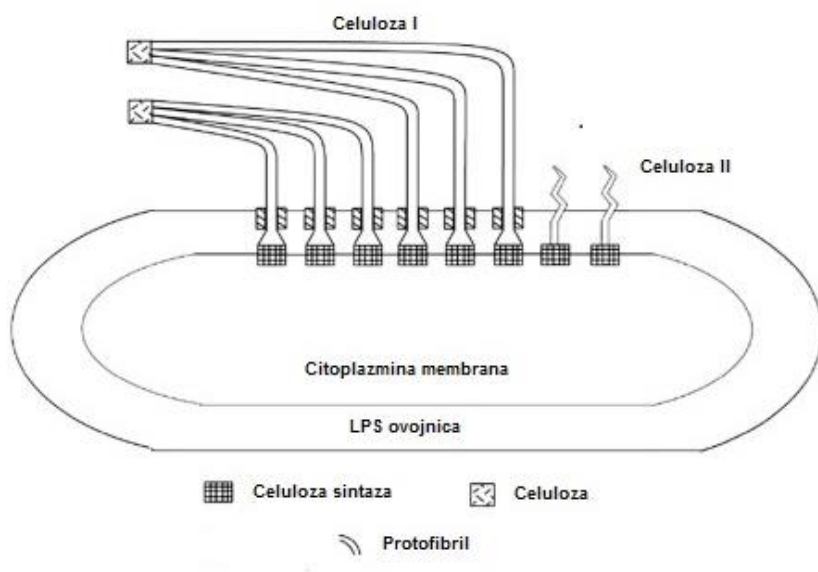
2.6. STRUKTURA BAKTERIJSKE CELULOZE

Struktura bakterijske celuloze sastoji od vlakana građenih od β -1 $\rightarrow$ 4 glukanskih lanaca, jedinstvene molekulske formule kao i celuloza biljnog podrijetla, $(C_6H_{10}O_5)_n$. Glukanski lanci povezani su vanjskim i unutarnjim vodikovim vezama (Sl. 4). 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 4. Vanjske i unutarnje vodikove veze u bakterijskoj celulozi (Ul-Islam i sur., 2012)

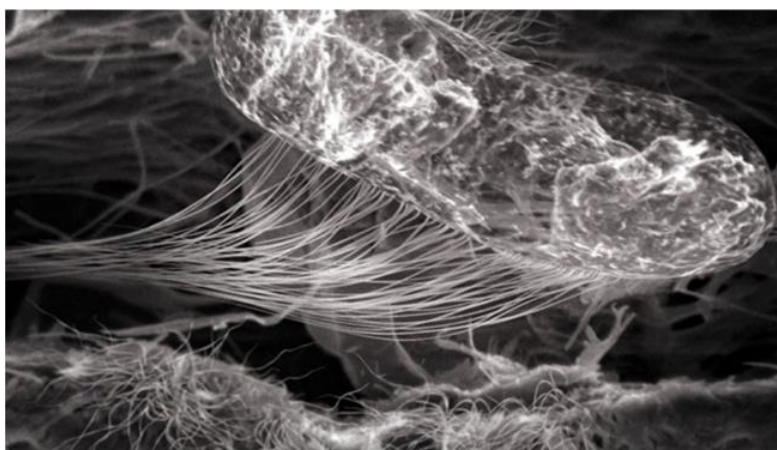
Vlaknasta mreža bakterijske celuloze se sastoji od trodimenzionalnih, strukturno vrlo uređenih nanovlakana, što rezultira stvaranjem hidrogela velike površine i poroznosti. *Acetobacter xylinum* proizvodi celulozu I (vrpcama sličan polimer) i celulozu II (termodinamički stabilan polimer) kao što je prikazano na Slici 5 (Chawla i sur., 2009). Tijekom procesa sinteze, protovlakna glukoznog lanca se izlučuju kroz bakterijsku staničnu stijenku i međusobno formiraju nano vlaknaste celulozne 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).



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

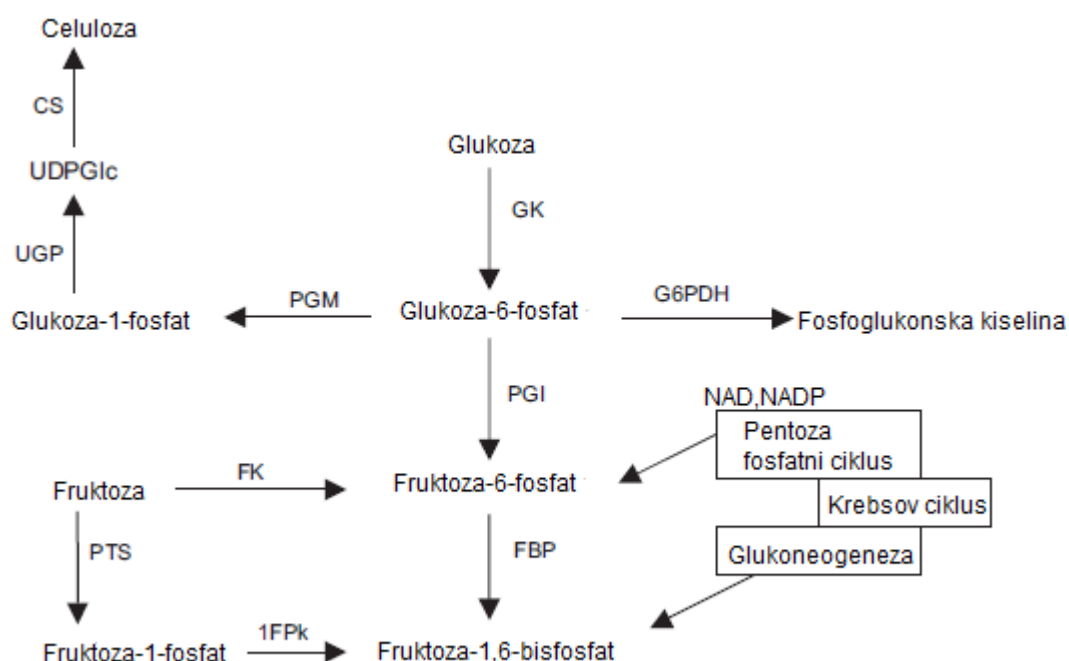
2.7. BIOSINTEZA BAKTERIJSKE CELULOZE

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 6).



Slika 6. Sinteza bakterijske celuloze na površini bakterijske stanice (Keshk, 2014)

Metabolički put konverzije izvora ugljika (glukoza) u celulozu odvija se u četiri koraka. Sve započinje konverzijom glukoze u glukoza-6-fosfat djelovanjem glukonaze, nakon čega slijedi izomerizacija fosfo-glukomutazom do glukoza-1-fosfata. Treći korak je konverzija glukoza-1-fosfata u uridin-difosfat glukoze (UDPG) pomoću UDPG-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 7.



Slika 7. Biokemijski put sinteze celuloze s *A. xylinum*. CS celuloza sintaza, GK glukokinaza, FBP fruktoza-1,6-bifosfat fosfataza, FK fruktokinaza, 1FPk fruktoza-1-fosfat kinaza, PGI fosfoglukoizomeraza, PMG fosfoglukomutaza, PTS sistem fosfotransferaze, UGP pirofosforilaza uridin difosfoglukoza, UDPGlc uridin difosfoglukoza, G6PDH glukoza-6-fosfat dehidrogenaza, NAD nikotinamid adenin dinukleotid, NADP nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (Tal i sur., 1998)

2.8. 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 dosiže 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 kristaličnost, mehaničku čvrstoću i stupanj polimerizacije u usporedbi s pelikulama iz statične kulture (Shi i sur., 2013. godine). Istraživanja Hu i sur. (2013) pokazala su da se broj sintetiziranih oblika celuloze smanjuje s povećanjem volumena inokuluma, a različite početne koncentracije glukoze utječu na prosječne promjere tih oblika celuloze, no, mehanizam formiranja različitih oblika celuloze uz trešnju još je uvijek nepoznat.

2.8.1. Biosinteza celuloze iz različitih izvora ugljika

Glukoza se obično koristi kao izvor ugljika za proizvodnju celuloze pomoću bakterije *A. xylinum*. Međutim, istraživanja su pokazala da je celuloza također sintetizirana iz drugih izvora ugljika, kao što su disaharidi, škrob, alkohol i organske kiseline (Hestrin i

Schramm, 1954). Prema Masaoka i sur. (1993), fruktoza i glicerol, kao izvori ugljika su dali gotovo isti prinos celuloze kao glukoza. Prinos celuloze, u odnosu na potrošnju glukoze, smanjuje se sa povećanjem početne koncentracije glukoze te se nagomilava glukonska kiselina kod visoke početne koncentracije glukoze. 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-arabitolu s *Gluconacetobacter xylinus* KU-1 (Oikawa i sur., 1995). Količina celuloze iz D-arabitolu 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 je čini se jedan od razloga za visoku produktivnost celuloze iz D-arabitolu. 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 manjin od onog iz glukoze, zbog niske aktivnosti saharaze u *A. xylinum*. Ako je saharoza učinkovito hidrolizirana, to će povećati produktivnost bakterijske celuloze. Tajima i sur. (1995) su uspjeli povećati produktivnost bakterijske celuloze pomoću ko-uzgoja dviju različitih sojeva *G. xylinus* (NCI 1051 ili ATCC 10245 i NCI 1005). Produktivnost bakterijske celuloze ko-kultivacijom veća je od produktivnosti monokultivacijom. To je čini se zbog formiranja glukoze i fruktoze nakon hidrolize saharoze sa saharazom 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. Celuluzni gel ili *nata* je sintetiziran sojem *G. xylinus* koji je uzgajan u kokosovoj vodi ili voćnim sokovm (ananas, rajčice, itd) s dodatkom saharoze (Embuscado i sur., 1994a; Embuscado 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 koje drugih izvora. Prisutnost glukoze u samom mediju ili u kombinaciji s drugim šećerima daje manje količine celuloze.

2.9. PRIMJENA BAKTERIJSKE CELULOZE

Bakterijska celuloza se zbog svoje visoke čistoće, hidrofilnosti, 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. Karakteristike zgušnjavanja i suspendiranja daju već sada nekoliko primjena bakterijske celuloze u humanoj i veterinarskoj medicini.

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. Kako bi se prevladala ta ograničenja, stvorene su modificirane bakterijske celuloze koje se sastoje od matrice, dakle prave bakterijske celuloze i neke druge supstancije kojom se ona pojačava, ovisno o uporabi. 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 sa česticama za pojačanje naknadno (Ul-Islam i sur., 2012). Kao što je prikazano u tablici 1, modifikacija bakterijske celuloze se može učiniti s bilo kojim organskim ili anorganskim materijalom, kao što su polimeri (Kim i sur., 2011), metali ili metalni oksidi (Maneerung i sur., 2007), kruti materijali i nanomaterijali (Yan i sur., 2008).

Tablica 1. Primjena modificirane bakterijske celuloze (Esa i sur., 2014)

Područje primjene	Pojačani materijali	Uloga
elektronika	grafitni nanodiskovi	električna vodljivost
elektronika	poli-4-stiren sulfonska kiseline	protočna redoks baterija
biomedicina/industrija	hitosan	nanofilm
biomedicina	hidroksiapatit	inženjerstvo koštanog tkiva
biomedicina	srebrne nanočestice	antimikrobno pokrivanje rana
biomedicina	parafin	koštani implantati
elektronika	poliuretan	svjetlo-emitirajuće diode

2.9.1. Biomedicina - terapija oštećene kože

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 8). Biofill® i Gengiflex® su 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 Biofillom® kao privremenim nadomjestkom za čovjekovu kožu (Fontana i sur., 1990). Autori su dokumentirali sljedeće prednosti za Biofill® u više od 300 tretmana: neposredno smanjivanje bolova, bliska adhezija s ranom, smanjene nelagode nakon operacije, smanjena stopa infekcija, lakoća pregleda rane (transparentnost), brže ozdravljenje i poboljšano zadržavanje izlučivanja, spontano odvajanje nakon kojeg slijedi rehospitalizacija i smanjenje vremena i troškova liječenja. Spominje se samo jedan nedostatak, a to je ograničena elastičnost u pregibima gdje je potrebna velika pokretljivost. Gengiflex® je razvijen za oporavak parodontnih tkiva. Kawecki i sur. (2004) su opisali primjenu bakterijske celuloze (Cellumed) u veterinarskoj medicini za liječenje svježih, velikih površinskih rana na konjima i psima.



Slika 8. Membrana bakterijske celuloze koja se nikad ne suši i pokazuje nevjerojatnu podatnost na različite oblike tijela, održava vlagu tkiva i značajno olakšava bol nakon zadobivanja opekline (Czaja i sur., 2006)

2.9.2. Prehrambena industrija

Desert, *Nata de Coco*, jedan je od tradicionalnih narodnih proizvoda posljednjih sedamdeset godina na Filipinima (Keshk i Sameshima, 2006). Izvoz *Nata* iz Filipina u Japan imao je veliki utjecaj na globalni pogled za širenje proizvodnje mikrobne celuloze. Kao rezultat proizvodnje *Nata de Coco* pomoću *G. xylinus*, David (1996) je pokazao da *Nata de Coco* ima snižavajući efekt 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 pigmenata. 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 mekušaca, kao što su lignje. Mehanizam je imobilizacija vode želatinozne celuloze s viskoznim ili gel-formirajućim materijalima, 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 zbog sve veće zabrinutosti javnosti zbog utjecaja nerazgradive ambalaže na okoliš. Bakterijska celuloza se smatra jednom od prikladnih sirovina za proizvodnju biorazgradivih materijala (Tang i sur., 2012.). Strukturno se sastoji od fino umreženih mikrovlakana vrlo otpornih na vodu, no nema antibakterijska i antioksidativna svojstva kojima bi se spriječilo onečišćenje hrane. Primjena bakterijske celuloze u prehrambenoj industriji sažeto je prikazana u Tablici 2.

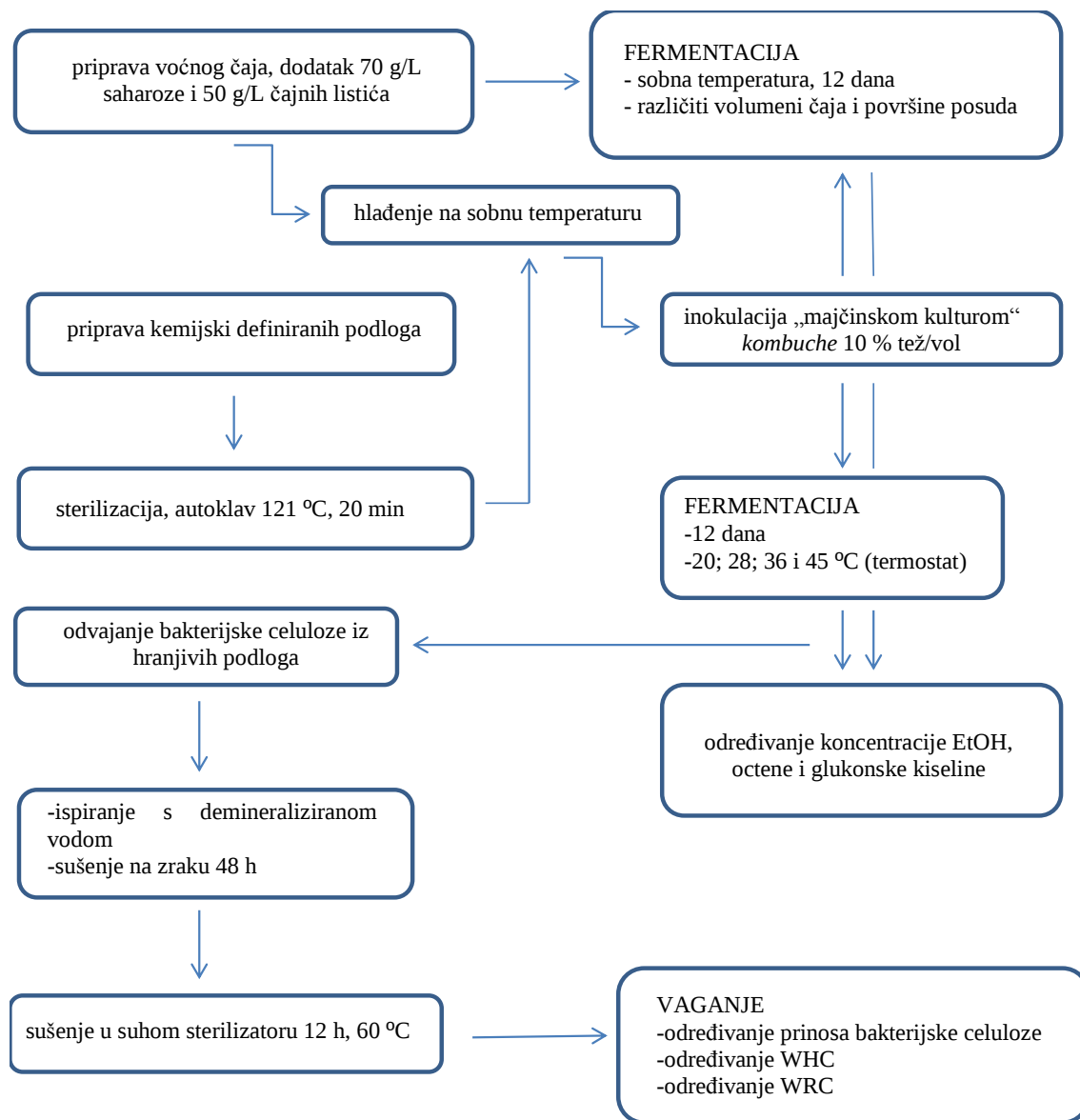
Tablica 2. Primjena mješavina modificirane bakterijske celuloze u prehrambenoj industriji (Esa i sur., 2014)

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

*BC – bakterijska celuloza

3. MATERIJALI I METODE RADA

3.1. TIJEK ISTRAŽIVANJA



Slika 9. Shematski dijagram tijeka cjelokupnog istraživanja

3.2. MATERIJALI I METODE RADA

3.2.1. Priprava kulture *kombuche*

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

3.2.2. Vrsta čaja

Uzgojena *kombucha* nacijepljena je na biljni čaj s okusom divlje trešnje, „Opojna češnja“, 1001 CVET, Slovenija.

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

3.2.3. Priprava kompleksne podloge (fermentirani čaj)

Infuzija biljnog čaja je pripravljena dodatkom 50 g listića čaja u 1 L kipuće vode u koju je dodano 70 g/L saharoze (bijeli konzumni šećer). Nakon ekstrakcije koja je trajala 8 minuta (prema napatku proizvođača), čaj je ohlađen na sobnu temperaturu i filtrirani su čajni listići. Bistri filtrat je prelišen u sterilne Erlenmeyer tikvice od 300 i 500 mL korisnog volumena, kao i staklene posudice za kućnu uporabu (1500, 720 i 370 mL), nakon čega su uzorci inokulirani sa svježe uzgojenom *kombucha* kulturom (10 % tež/vol). Nacijepljeni uzorci su inkubirani pri 25 °C (sobna temperatura), te 28, 37 i 45 °C u termostatu tijekom 12 dana, nakon čega je prevrela tekućina centrifugirana pri 2500 okr/min tijekom 10 minuta, a supernatant je uporabljen za daljnja određivanja. Kontrolni uzorak je bila neprevrela infuzija biljnog čaja s okusom divlje trešnje.

3.2.4. Kemijski definirane podloge

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

- glukoza 20
- pepton 5
- kvašćev ekstrakt 5
- dinatrijev fosfat 2,7
- limunska kiselina 1,15

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

1. podloga: 5 tikvica s dodatkom glukoze (1; 2; 3; 4; 5 % tež/vol);

2. podloga: 5 tikvica (bez glukoze) s dodatkom etanola (1 – 5 % vol/vol);

3. podloga: 5 tikvica (bez glukoze) s dodatkom glicerola (1 – 5 % vol/vol);

4. podloga: 5 tikvica s osnovnom podlogom, uz različiti pH (2; 3; 4; 5; 7).

Podloge su inokulirane s 10 % inokuluma (10 g/100 mL), nakon toga je proveden uzgoj 12 dana pri 25 °C (sobna temperatura), te 28, 37 i 45 °C. Prevrele podloge su centrifugirane pri 2500 okr/min tijekom 10 minuta, a supernatanti su uporabljeni za daljnja određivanja.

3.2.4. 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 Hanna Industrial model HI 98103.

3.2.5. 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:

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

gdje je:

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

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

V_{uzorka} = volumen uzorka (1 mL)

3.2.6. 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 (mg/mL) izračunata je prema jednadžbi:

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

gdje je:

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

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

V_{uzorka} = volumen uzorka (mL)

3.2.7. Određivanje alkohola kemijskom metodom

Udjel alkohola u fermentiranim uzorcima čaja tijekom previranja šećera do etanola i biooksidacije etanola do octene kiseline je određivan kemijskom metodom

koja se zasniva na oksidaciji alkohola s kalijevim bikromatom ($K_2Cr_2O_7$) u kiselom okolišu.

Postupak:

U odmjernu tikvicu od 50 mL je stavljeno 5 mL uzorka čaja koji je razrijeđen s demineraliziranom vodom do 50 mL (odnos čaja i vode je 1:10). Uzorak je prebačen u tikvicu kruškastog oblika od 50 mL i neutraliziran s 0.1 M NaOH.

U Erlenmeyer tikvicu od 100 mL, u koju će se hvatati destilat, stavljeno je 10 mL otopine kalijevog bikromata i 5 mL koncentrirane H_2SO_4 . Destilat se preko hladila i lule uvodi u otopinu kalijevog bikromata u Erlenmeyer tikvicu od 100 mL, koja mora biti u rashlađenoj vodi. Destilacija mora biti polagana i postupna i trajala je dok se sadržaj u tikvici za destilaciju nije smanjio na približno 3 mL (za to vrijeme je alkohol predestilirao). Po završetku destilacije lula je isprana s nekoliko mlazova destilirane vode u istu Erlenmeyer tikvicu u koju je uzorak predestilirao. Sadržaj tikvice je promućkan, začepljen gumenim čepom i ostavljen stajati 5 minuta radi potpune oksidacije alkohola. Tijekom oksidacije alkohola utrošen je jedan dio bikromata, dok je drugi dio ostao u suvišku. Zatim je sadržaj kvantitativno prebačen u Erlenmeyer tikvicu od 500 mL uz ispiranje, dodano mu je oko 200 mL destilirane vode radi razrjeđenja i 10 mL 20%-tne otopine KI (radi određivanja preostale količine kalijevog bikromata) i ostavljeno začepljeno 5 minuta.

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

Nakon 5 minuta, uzorci su titrirani s 0,1 M otopinom natrijevog tiosulfata ($Na_2S_2O_3$), pri čemu dolazi do oksidoredukcije između joda i natrijevog tiosulfata, u kojoj se jod reducira, a tiosulfat oksidira. Kad je boja postala svjetlija, dodano je 5 mL 1%-tne otopine škroba i titrirano do pojave tirkizno-zelene boje.

Koncentracija (vol %) alkohola je izračunata prema jednadžbi:

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

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

3.2.8. Izračunavanje mase i prinosa celulozne biomase *kombuche*

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:

$$m_{cb} (g) = m_{bt} - m_i$$

gdje je:

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

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

m_i = masa inokuluma (g)

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

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

3.2.9. Određivanje utjecaja površine i dubine hranjive podloge na kinetiku

sinteze bakterijske celuloze

Svi istraživani uzorci pripremljeni su u staklenim posudama sljedećih dimenzija:

a) Kemijski definirana podloga

- Erlenmeyer tikvica volumena 300 mL ($d = 8,7$ cm; $h = 15,6$ cm; $a = 59,4$ cm²).

b) Kompleksna podloga (čaj)

- Erlenmeyer tikvica volumena 500 mL ($d = 10,5 \text{ cm}$; $h = 18 \text{ cm}$; $a = 86,6 \text{ cm}^2$).
- Staklena posuda volumena 370 mL ($d = 7 \text{ cm}$; $h = 5,5 \text{ cm}$; $a = 38,5 \text{ cm}^2$).
- Staklena posuda volumena 720 mL ($d = 6 \text{ cm}$; $h = 20 \text{ cm}$; $a = 28,3 \text{ cm}^2$).
- Staklena posuda volumena 1500 mL ($d = 12 \text{ cm}$; $h = 18 \text{ cm}$; $a = 113,1 \text{ cm}^2$).

3.2.10. 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 $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ u suhom sterilizatoru, kako bi se u potpunosti uklonila vezana voda. Kapacitet zadržavanja vode (WHC) je izračunat prema formuli (Shezad i sur., 2010):

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

3.2.11. 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.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Kombucha je napitak koji se tradicionalno konzumira u zemljama Azije, no posljednjih se desetljeća konzumira diljem svijeta, a dobiva se fermentacijom zaslađenog čaja pomoću združene kulture bakterija octene kiseline i kvasaca (Teoh i sur., 2004). Tijekom fermentacije okus *kombucha* napitka se mijenja od ugodno kiselog i blago pjenušavog, do izrazito kiselog, octenog okusa, koji je posljedica produžene fermentacije (Blanc, 1996).

Napitak je složenog sastava, a glavni proizvodi koji nastaju metabolizmom izvora ugljika u hranjivoj podlozi na koju je nacijepljena kultura *kombuche* su monosaharidi, supstancije ekstrahirane iz čaja, različite organske kiseline i vitamini (Malbaša i sur., 2008). Tijekom fermentacije, već nakon 24 h, vidljiva je plutajuća opna (pelikula) koja se stvara na površini hranjive podloge, a tijekom fermentacije se svakodnevno udvostručava.

Bakterijska celuloza ima vrlo široku primjenu u područjima prehrane i biofarmaceutike i biomedicine zbog svoje čistoće i jedinstvenih fizikalno-kemijskih svojstava. Također, bakterijska je celuloza našla brojne primjene kao zamjena za biljnu celulozu. U prehrambenoj se industriji bakterijska celuloza koristi kao izvor vlakana, zgušnjivač, stabilizator, te kao vezivo u različitim proizvodima koji se odnose na slabo masne ili potpuno nemasne proizvode (Okiyama i sur., 1993).

Cilj ovog rada bio je istražiti biokemijske promjene koje se zbivaju tijekom biotransformacije simbiotski združene kulture bakterija octene kiseline i kvasaca (*kombucha*). Tijekom istraživanja su određivane koncentracije metabolizmom proizvedenih organskih kiselina (octene i glukonske), kao i koncentracije EtOH.

Nadalje, praćena je sinteza bakterijske celuloze tijekom statične fermentacije biljnog čaja s okusom divlje trešnje i tri kemijski definirane podloge s različitim izvorima ugljika. Fermentacija je praćena tijekom 12 dana, pri čemu su uzorci izuzimani svakih 24 sata. Tijekom istraživanja, praćen je utjecaj važnih varijabli, kao što su utjecaj pH vrijednosti hranjivih podloga i izvor ugljika na koncentraciju sintetiziranih organskih kiselina i prinos bakterijske celuloze, te utjecaj površine posude za uzgoj, volumen i visinu sintetizirane bakterijske celuloze.

4.1. ORGANSKE KISELINE I ETANOL

4.1.1. Kompleksna podloga - čaj

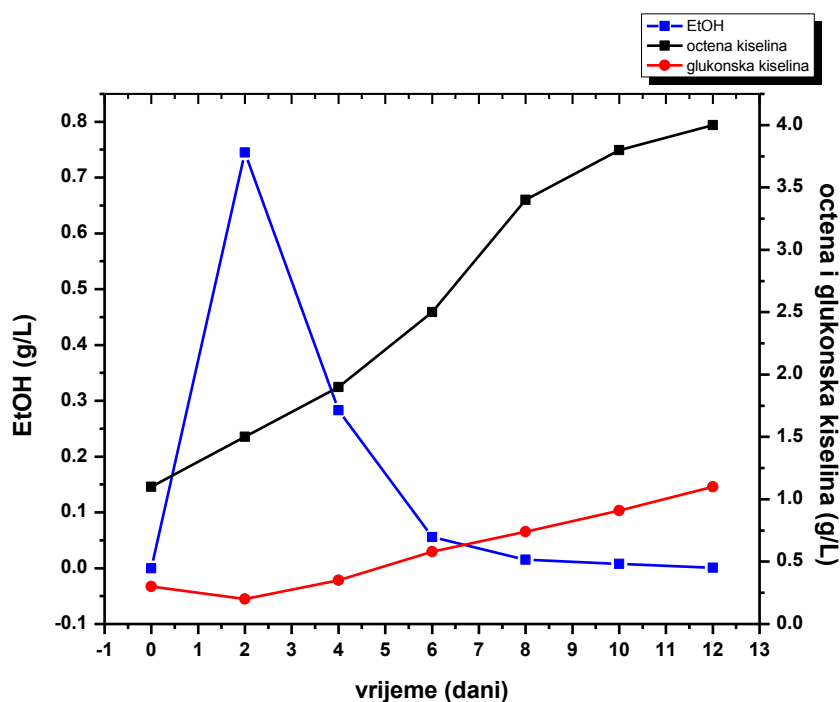
Biljka čajevac se uzgaja u oko 30 zemalja, a čaj dobiven infuzijom listića čajevca je najčešće, uz vodu, konzumirano piće na svijetu. *Kombucha* čaj je nutritivno vrijedni napitak dobiven biotransformacijom saharozom zaslađenog čaja sa simbiotskim, odnosno združenim kulturama bakterija octene kiseline 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, pri čemu preferiraju fruktozu kao supstrat. Bakterije octene kiseline koriste glukozu za proizvodnju glukonske kiseline i etanola za proizvodnju octene kiseline.

Sinteza organskih kiselina mijenjala se tijekom fermentacije što je prikazano na Slici 10. Koncentracija octene kiseline se tijekom 12 dana fermentacije linearno povećavala od 1,1 g/L na početku istraživanja do 4,0 g/L na kraju. Uz sposobnost sinteze relativno visokih koncentracija octene kiseline, bakterije octene kiseline pokazuju i toleranciju na kiselost, koja je rijetka među aerobnim homo 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, koncentracija glukonske kiseline bila je manja 4 puta od koncentracije octene kiseline, no zabilježen je linearni rast tijekom cijelog vremena fermentacije, od 0,3 g/L na početku, do 1,1 g/L na kraju istraživanja.

Prema većini autora, koncentracija EtOH u *kombucha* napitcima nije veća od 1% (vol/vol) (Teoh i sur., 2004). Sievers i sur. (1995) su nakon 10 dana fermentacije izmjerili 0,36% EtOH, uz početnih 7 % saharoze u hranjivoj podlozi. Reiss (1995) je ispitivao utjecaje različitih izvora ugljika (saharoza, laktoza, glukoza i fruktoza) na

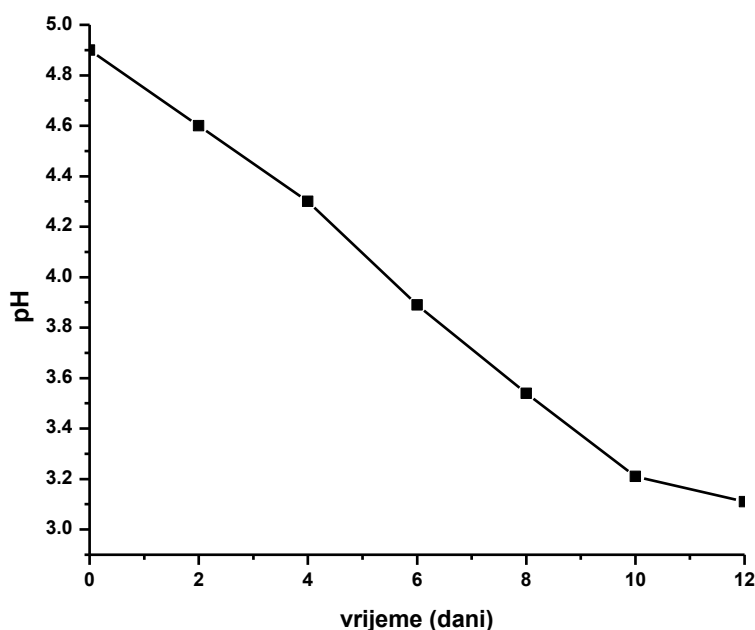
metabolizam *kombuche*, te uočio da koncentracija proizvedenog EtOH ovisi o vrsti i količini dodanog šećera. U ovom radu je u čaj dodano 70 g/L saharoze (konzumni bijeli šećer) i već nakon 2. dana fermentacije, izmjerena je maksimalna koncentracija EtOH, 0,74 g/L, koja se u 4. danu smanjila na 0,26 g/L, a nakon toga je pala na manje od 0,05 g/L i nije se značajnije mijenjala do kraja fermentacije (Slika 10).



Slika 10. Kinetika nastajanja EtOH, octene i glukonske kiseline tijekom 12 dana fermentacije *kombucha* čaja od divlje trešnje

Kao rezultat porasta koncentracije organskih kiselina, pH vrijednost pada, tako da je u ovom radu pH vrijednost s početnih 4,9 do kraja istraživanja postupno pala na 3.11 (Slika 11). 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 odvija i pri nižim pH vrijednostima, od 4,0 do 4,5, a minimalni rast je zabilježen pri pH 7,0 do 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 11).



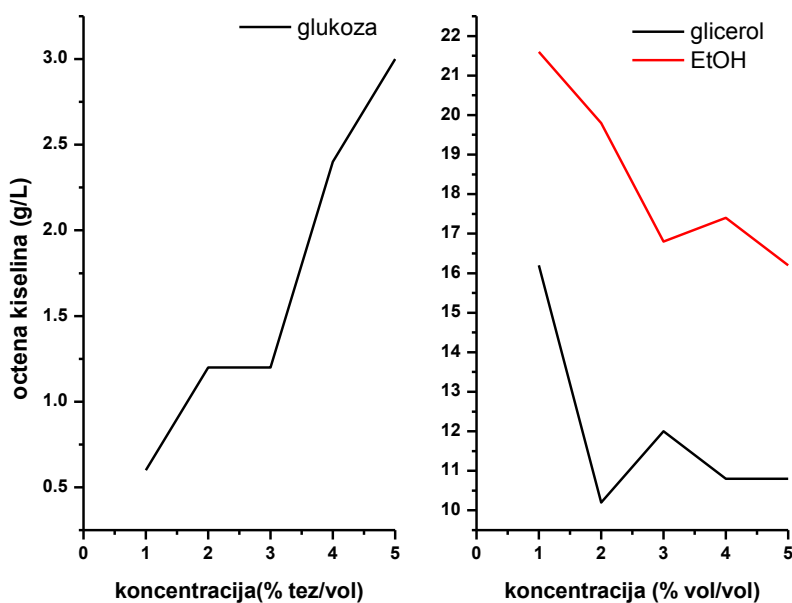
Slika 11. Promjena pH vrijednosti čaja tijekom 12 dana fermentacije

Ovaj raskorak između dobivenih rezultata u ovom radu i objavljenih u literaturi može biti posljedica različitosti mikroflore koja je sastavni dio ekološkog izvorišta *kombuche*. Važno je napomenuti da nije moguće jamčiti uvijek isti mikrobiološki sastav čajne gljive koja je nabavljena „predajom iz ruke u ruku“. Mayster i sur. (1995) su objavili rezultate svojih istraživanja provedenih na 41 uzorku *kombuche* u Njemačkoj, prema kojima niti jedan nije imao mikrobiološki jednak sastav. Njihov je zaključak da je ekologija *kombuche* puno kompleksnija od simbioze pojedinačnog kvasca s bakterijama octene kiseline, tako da odstupanja u pH vrijednostima mogu biti vrlo široka (Teoh i sur., 2004).

4.1.2. Kemijski definirane podloge

Svaka hranjiva podloga, kompleksna (prirodna) ili kemijski definirana, mora sadržavati izvore ugljika, dušika, te mikro i makronutrijente potrebne za rast mikroorganizama. Promjene u sastavu hranjive podloge imaju utjecaj na rast radnog mikroorganizma, ali i neizravno ili izravno na nastajanje proizvoda metabolizma. Za uzgoj *kombuche* se najčešće kao izvor ugljika koriste saharoza ili glukoza, no u posljednje se vrijeme mogu u literaturi pronaći i drugi izvori ugljika, kao što su fruktoza, maltoza, ksiloza i šećerni alkoholi (Chawla i sur., 2009). Ponekad kemijski definirane podloge u svom sastavu sadrže amino kiseline i vitamine za poboljšanje staničnog rasta i proizvodnju metabolita (Matsuoka i sur., 1996).

U ovom radu su istraživani utjecaji različitih koncentracija glukoze, etanola i glicerola na nastajanje octene i glukonske kiseline, glavnih organskih kiselina koje nastaju tijekom fermentacije *kombuche* (Slike 12 i 13). Na Slici 12 je vidljivo da se s povećanjem koncentracije glukoze u podlozi povećava koncentracija octene kiseline, za razliku od etanola i glicerola, čija prisutnost u podlozi u većim koncentracijama inhibira proizvodnju octene kiseline, a poboljšava sintezu bakterijske celuloze (Park i sur., 2003).

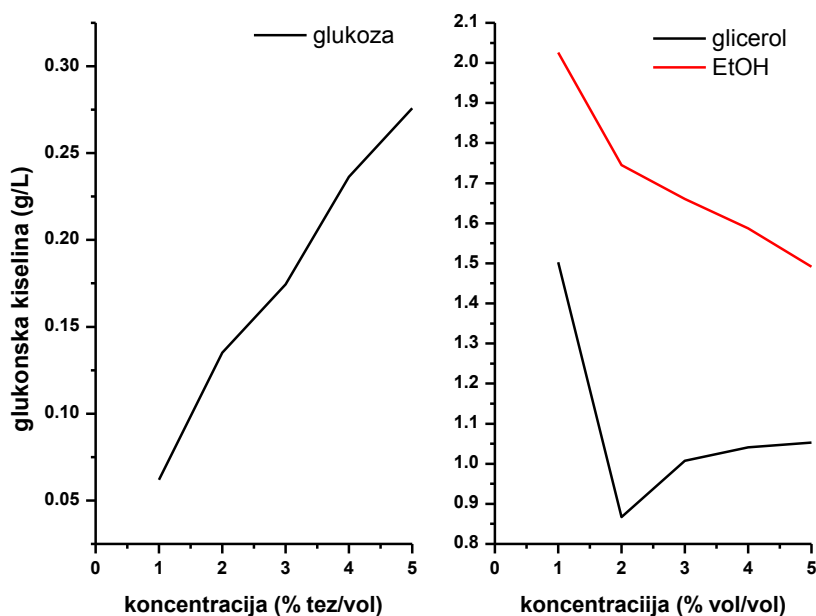


Slika 12. Utjecaj koncentracije izvora ugljika u kemijski definiranim podlogama na nastajanje octene kiseline

Iako je s povećanjem koncentracije glukoze vidljivo povećanje koncentracije octene kiseline, rezultati su pokazali da je dodatkom najniže koncentracije (1 % vol/vol) etanola i glicerola u podloge izmjerena skoro 7 puta veća koncentracija octene kiseline (18,2 g/L i 21,5 g/L), nego u podlozi s najvećom koncentracijom glukoze (3 g/L) (Slika 13).

Octena kiselina nastala je u 10 puta većim koncentracijama od glukonske kiseline, no učinak glukoze, etanola i glicerola na nastajanje glukonske kiseline bio je potpuno isti (Slika 13). Ovisno o tome što se želi proizvoditi, fermentirani *kombucha* napitak ili bakterijska celuloza, upravo učinak početne koncentracije glukoze u podlozi je izrazito važan jer nastajanje glukonske kiseline kao sporednog proizvoda, snižava pH hranjive podloge, a samim tim smanjuje brzinu i produktivnost sinteze bakterijske celuloze (Masaoka i sur., 1993).

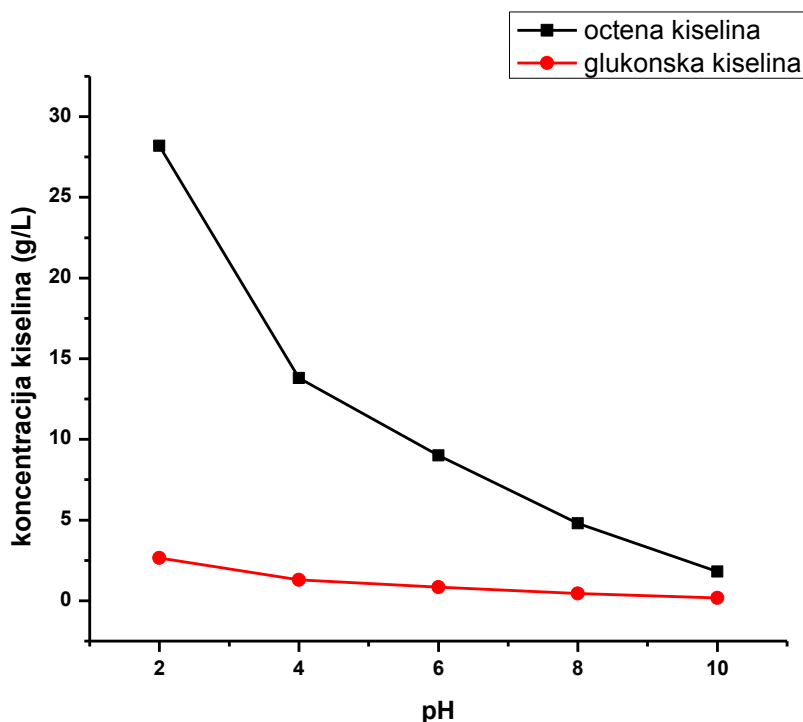
Etanol i glicerol, kao i kod nastajanja octene kiseline, izazivaju u većim koncentracijama smanjenje koncentracije nastale glukonske kiseline jer inhibiraju rast proizvodne kulture *kombuche*. No, na Slici 13 je vidljivo da je pri najnižoj koncentraciji od 1 % (vol/vol), dodatkom etanola nastalo 1,6 g/L, a glicerola 2,04 g/L glukonske kiseline.



Slika 13. Utjecaj koncentracije izvora ugljika u kemijski definiranim podlogama na nastajanje glukonske kiseline

Tijekom fermentacije *kombuche* pH vrijednost bilo koje podloge se snižava zbog nastajanja organskih kiselina (Mikkelsen i sur., 2009). Kao posljedica povećanja koncentracije octene i glukonske kiseline u fermentacijskoj podlozi, pH vrijednost se najčešće snižava s početne vrijednosti 5 na 3 tijekom 12 do 14 dana fermentacije (Chen i Liu, 2000; Sreeramulu i sur., 2000).

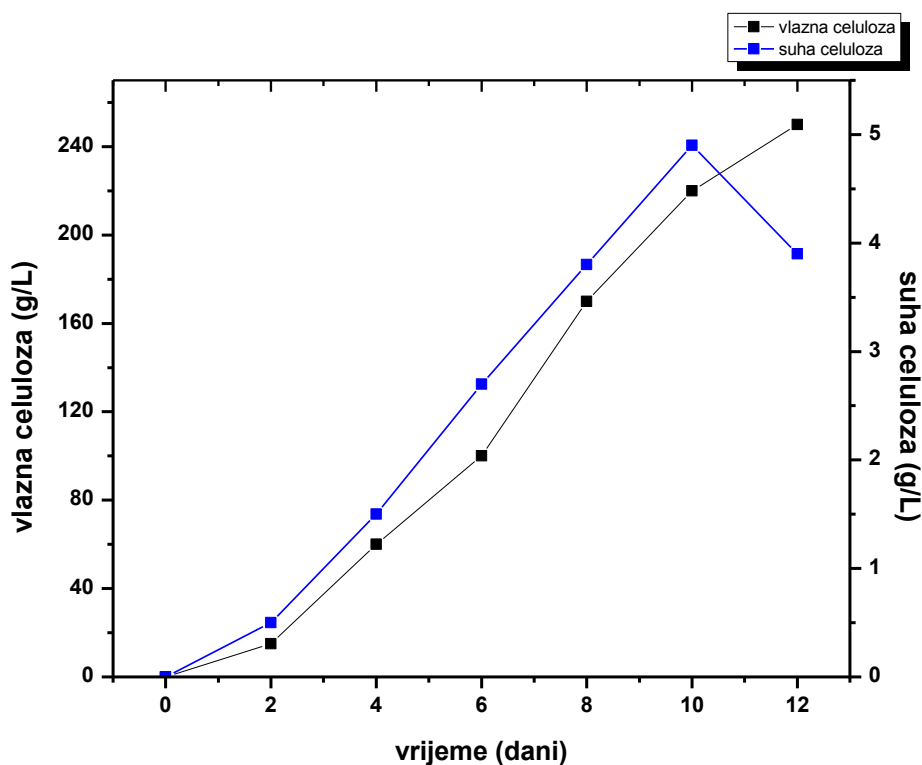
U ovom radu je provedena fermentacija s *kombuchom* u Hestrin-Schramm tekućoj podlozi s različitim pH vrijednostima da bi se istražio utjecaj na nastajanje organskih kiselina. Uzgoj je proveden 12 dana na sobnoj temperaturi i nakon toga je izmjerena koncentracija nastalih organskih kiselina. Na Slici 14 je vidljivo da je najveća koncentracija octene kiseline (27 g/L) izmjerena pri niskoj pH vrijednost podloge, u pola manja koncentracija (14 g/L) dobivena je fermentacijom na pH 4 i nakon toga je linearno padala sve do 2 g/L na pH 10. Koncentracija glukonske kiseline pri pH 2 je bila 2,6 g/L, pri pH 4, 1,8 g/L, a kod pH 8 nije izmjerena njena prisutnost u hranjivoj podlozi.



Slika 14. Utjecaj pH vrijednosti kemijski definirane podloge na nastajanje octene i glukonske kiseline

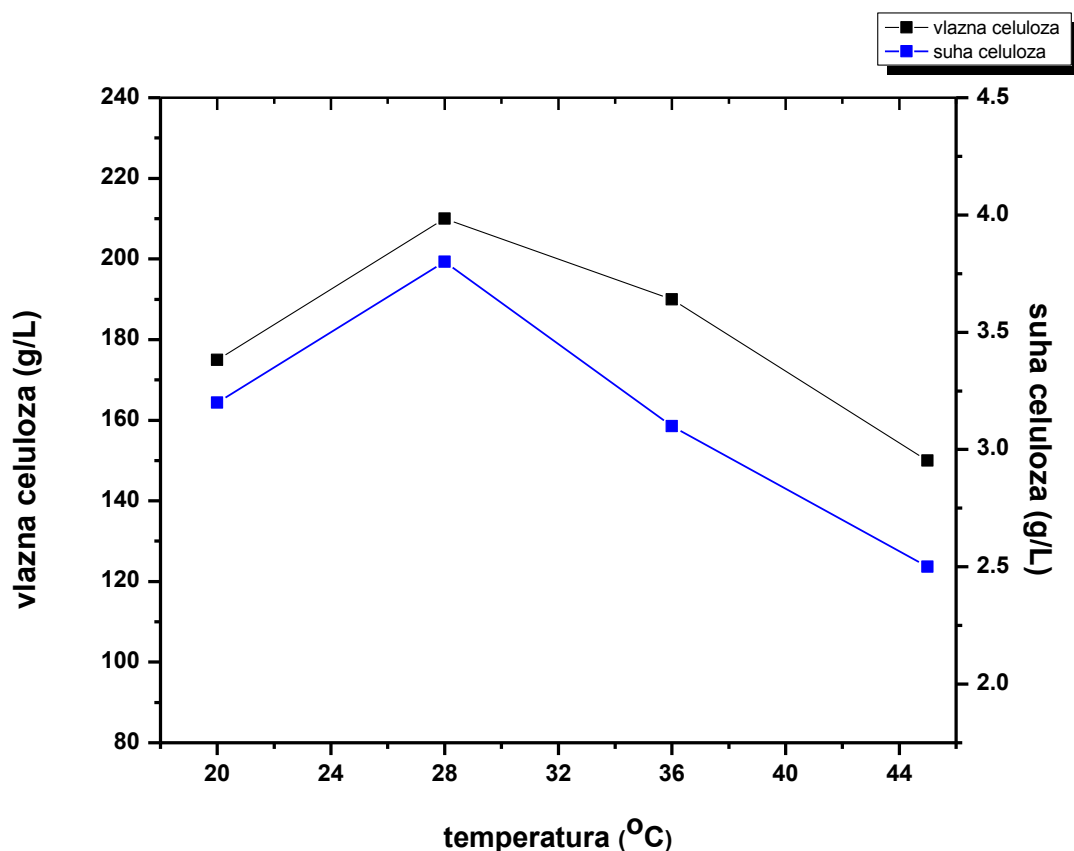
4. 2. SINTEZA BAKTERIJSKE CELULOZE

Jedna od prvih i vidljivih proizvoda biotransformacije zaslađenog čaja je celulozna opna koja se u obliku tankog sloja oblikuje po površini tekućine. Celuloznu opnu na površini održava CO₂ koji nastaje kao posljedica fermentative aktivnosti kvasaca (Sievers i sur., 1995). Mikroskopskom analizom celulozne opne dokazano je da se na njenoj površini nalazi veliki broj bakterija octene kiseline, striktnih aeroba, kojima je za rast i razmnožavanje nužan atmosferski kisik. S donje strane opne su nakupine kvasaca, koji pripadaju fakultativno anaerobnim mikroorganizmima (Malbaša i sur., 2008). Na Slici 15 prikazana je kinetika nastajanja bakterijske celuloze iz koje je vidljivo linearno povećanje mase celuloze tijekom 12 dana uzgoja. Prinos biomase tijekom fermentacije je usko povezan s izvorom ugljika, odnosno supstratom. Prema dobivenim rezultatima, saharoza (70 g/L) je izvršni supstrat jer je nakon 12 dana fermentacije izmjereno 247 g/L vlažne bakterijske celuloze.



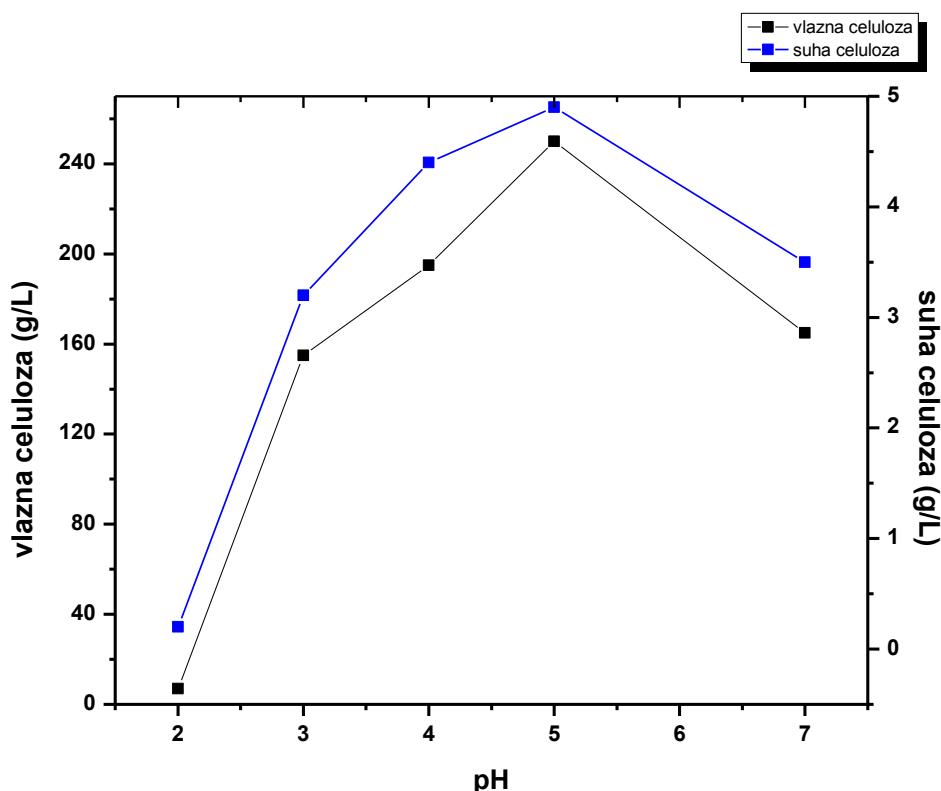
Slika 15. Utjecaj trajanja fermentacije na sintezu bakterijske celuloze u čaju od divlje trešnje

Utjecaj temperature (od 20 do 45 °C) na prinos bakterijske celuloze je prikazan na Slici 16. Vidljivo je da je najveći prinos postignut pri 28 °C (210 g/L vlažne celuloze), a najmanji pri 45 °C (100 g/L vlažne celuloze). Uzgojem pri 20 °C i 36 °C uočeno je podjednako smanjenje prinosa bakterijske celuloze za 17, odnosno 10 %. Rezultati se mogu usporediti s rezultatima Son i suradnika (2001), koji su uočili da je optimalna temperatura pri kojoj je postignut najveći prinos bakterijske celuloze bila 30 °C. Kao i u ovom radu, Son i sur. (2001) su zabilježili da povećanje temperature izaziva smanjenje prinosa bakterijske celuloze, što je posljedica promjene morfologije i kristalne strukture celulozne mrežne strukture.



Slika 16. Utjecaj temperature na nastajanje bakterijske celuloze nakon 12 dana fermentacije u čaju od divlje trešnje

Dokazano je da optimalna pH vrijednost za rast bakterija i proizvodnju bakterijske celuloze ovisi o vrsti bakterija octene kiseline, a te se vrijednosti kreću između 4 i 7. Prema Son i suradnicima (2001), najbolji rezultati su dobiveni pri pH 6,5. U ovom radu se pH vrijednost 5,0 pokazala najboljom za uzgoj i proizvodnju bakterijske celuloze (Slika 17). Iz slike je vidljivo da su podjednaki rezultati postignuti pri pH 3 i pH 7, dakle i pri kiselom i neutralnom pH okruženju, bakterijska je celuloza sintetizirana podjednako. No, pri industrijskoj proizvodnji bakterijske celuloze za biomedicinske primjene (Biofill i Gengiflex), pH mora biti održavan na niskim vrijednostima, između 4 i 4,5, kako bi se izbjegle moguće kontaminacije podloge tijekom uzgoja (Jonas i Farah, 1998). Također je važno napomenuti da se pH vrijednost tijekom uzgoja može sniziti zbog nakupljanja sekundarnih metabolita, uglavnom organskih kiselina (octena, glukonska, mliječna), koje nastaju kao rezultat potrošnje izvora ugljika ili dušika. Zbog toga je u industrijskoj proizvodnji bakterijske celuloze izrazito važno održavanje pH podloge na vrijednosti na kojoj se postiže maksimalni prinos bakterijske celuloze, uz minimalnu mogućnost kontaminacije.

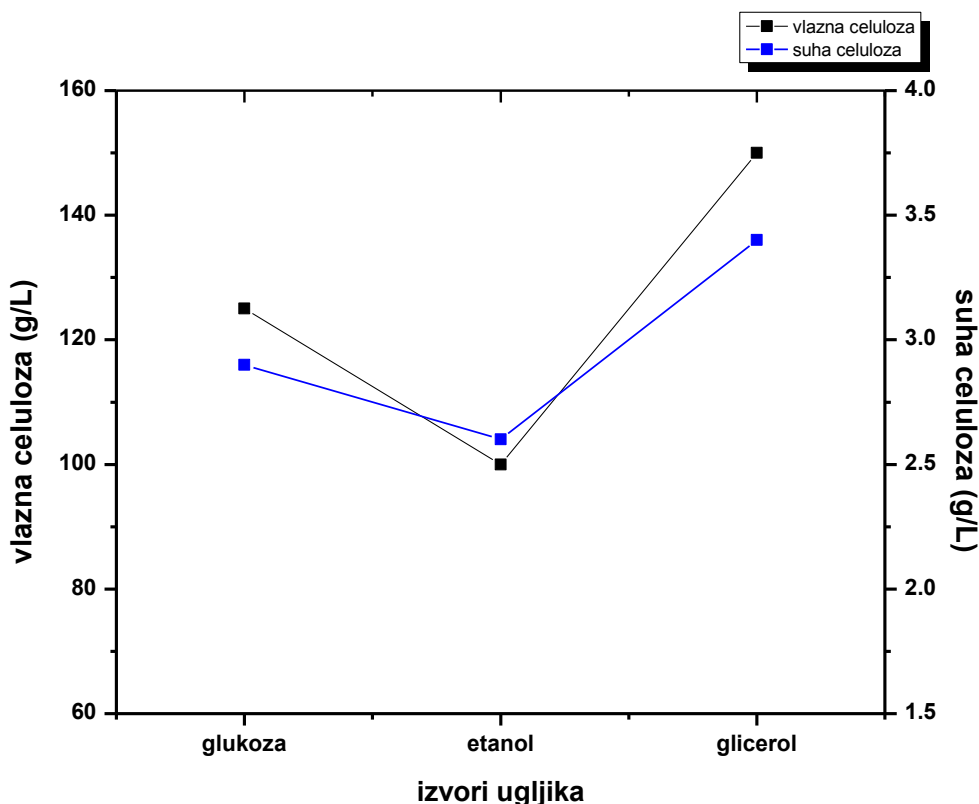


Slika 17. Utjecaj pH na nastajanje bakterijske celuloze nakon 12 dana fermentacije u osnovnoj kemijski definiranoj podlozi

Posljednjih je godina intenzivno istraživani sastav hranjivih podloga za dobivanje maksimalnog prinosa bakterijske celuloze pomoću različitih sojeva bakterije *G. xylinus*, a koji se odnosi na dodane izvore ugljika, koji mogu biti monosaharidi, disaharidi, oligosaharidi, alkoholi, šećerni alkoholi i organske kiseline (Masaoka i sur., 1993, 1996; Ishikara i sur., 2002; Keshk i Sameshima, 2005).

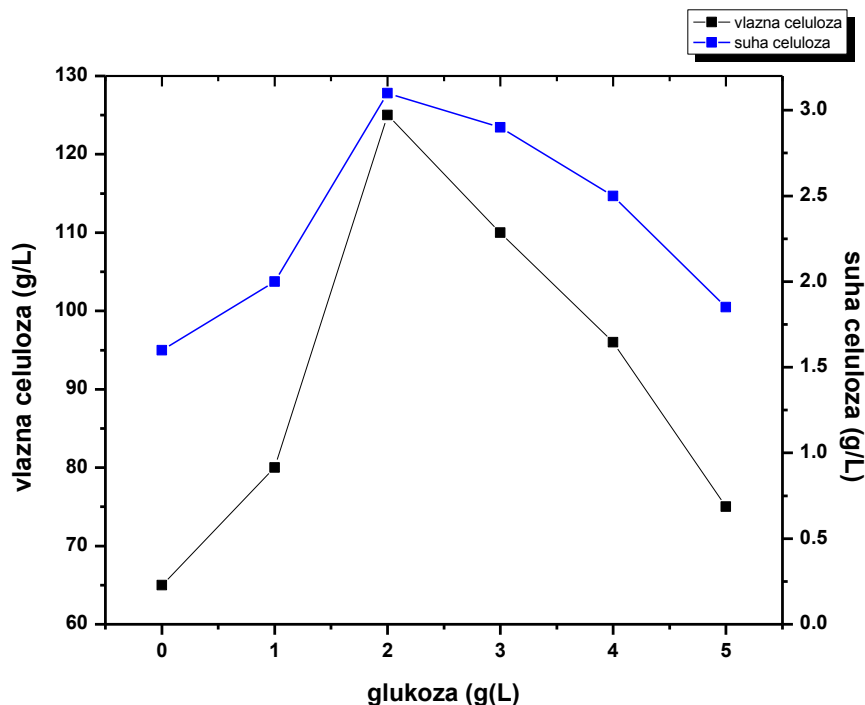
Zadovoljavajuća proizvodnja bakterijske celuloze rezultat je sposobnosti bakterija octene kiseline da apsorbiraju glukozu iz različitih supstrata s ugljikom, nakon čega polimeriziraju glukozu do celuloze. Bakterije octene kiseline posjeduju dva glavna operativna amfibolička puta: pentoza fosfatni put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

Na Slici 18 prikazani su rezultati prinosa bakterijske celuloze ovisno o izvorima ugljika u hranjivim podlogama. Prema dobivenim rezultatima, glicerol se pokazao kao najbolji izvor ugljika jer je izmjereno i najveći prinos vlažne biomase (151 g/L). Nakon njega slijedi glukoza sa 126 g/L i na kraju etanol (100 g/L).



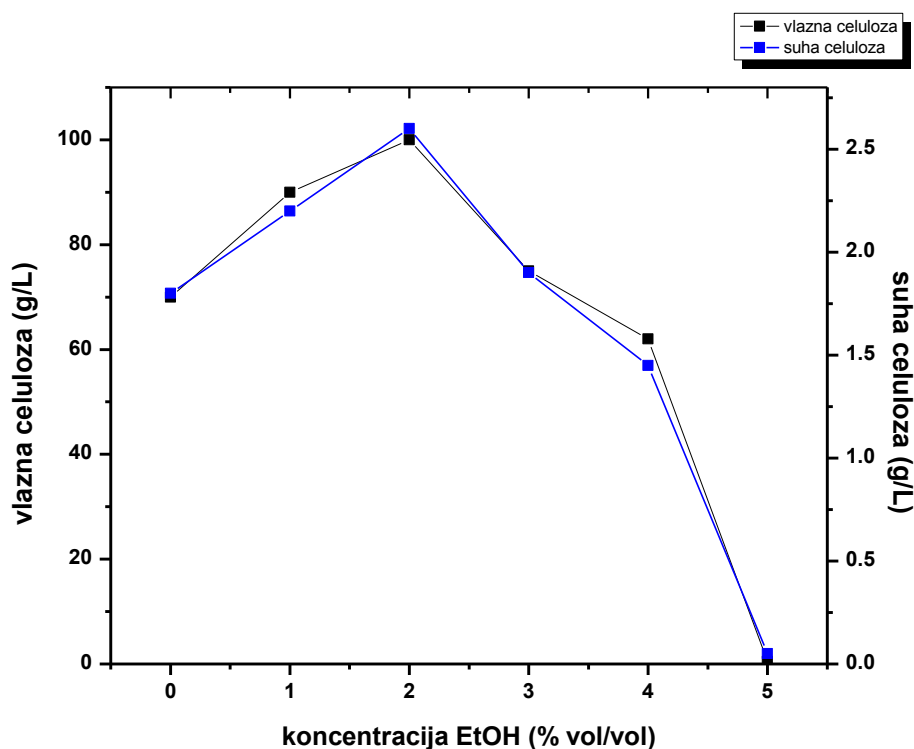
Slika 18. Utjecaj različitih izvora ugljika u podlozi; glukoza (20 g/L), glicerol i etanol (2 % vol/vol) na nastajanje bakterijske celuloze

Još od sredine prošlog stoljeće, glukoza se smatrala jednim od najboljih izvora ugljika za proizvodnju bakterijske celuloze, no i drugi izvori ugljika, pentoze i heksoze, oligosaharidi, škrob, alkohol ili organske kiseline mogu zamijeniti glukozu u podlozi (Hestrin i Schramm, 1954). Na Slici 19 prikazan je utjecaj različitih koncentracija glukoze dodane u podloge na koncentraciju nastale bakterijske celuloze. Prinos bakterijske celuloze se povećavao s povećanjem koncentracije dodane glukoze, no samo do koncentracije od 20 g/L, gdje je izmjereno 126 g/L vlažne biomase, odnosno 3,2 g/L suhe bakterijske celuloze, nakon čega se taj prinos smanjivao. Tako je pri koncentraciji glukoze u podlozi od 50 g/L izmjerena vlažna masa celuloze bila samo 75 g/L, manje nego ona koja je izmjerena pri 1 g/L glukoze (80 g/L). Povećanje koncentracije glukoze može dovesti do nastajanja glukonske kiseline kao nusproizvoda tijekom proizvodnje bakterijske celuloze, što rezultira smanjenjem pH vrijednosti podloge i manjim prinosima celuloze. Kad se bakterija *A. xylinum* uzgaja na glukoznom supstratu ili ugljikohidratnom u čijoj je strukturi glukoza, može doći do 26 %-tne konverzije glukoze u glukonsku i 2-keto-glukonsku kiselinu, čime se smanjuje brzina i prinos sintetizirane bakterijske celuloze (Keshk, 2014).



Slika 19. Utjecaj koncentracije glukoze (g/L) u kemijski definiranoj podlozi na nastajanje bakterijske celuloze

Količina sintetizirane biomase razmjerna je povećanju biomase, a prinos se određuje prema izvoru ugljika. Kada je etanol jedini izvor ugljika, dolazi do višestupanjskih oksidacija tog supstrata, a rezultat je nastajanje octene kiseline. Na Slici 20 prikazani su rezultati istraživanja u kojem je etanol bio jedini izvor ugljika u hranjivoj podlozi. Iz slike je vidljivo da je pri 2 % (vol/vol) etanola u podlozi postignut najveći prinos vlažne bakterijske celuloze (100 g/L), što je za 20 % manji prinos sego kada je glukoza jedini izvor ugljika (Slika 19).

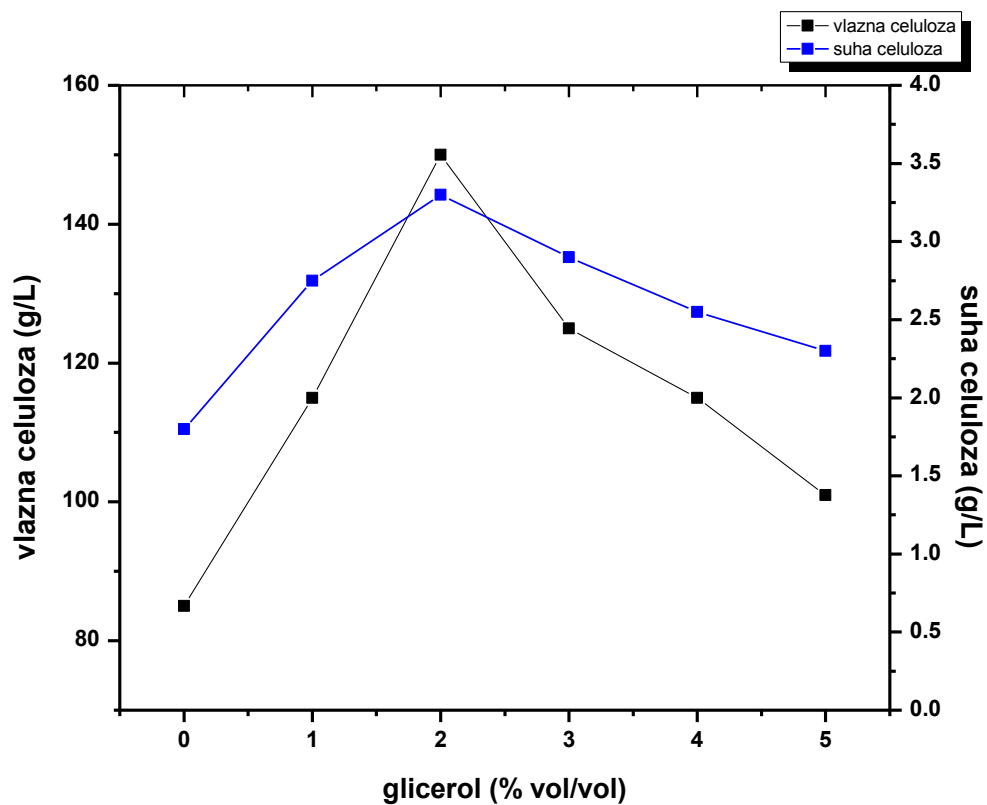


Slika 20. Utjecaj koncentracije etanola (% vol/vol) u podlozi na nastajanje bakterijske celuloze

Kad je glicerol jedini izvor ugljika, uglavnom neće doći do nastajanja glukonske kiseline ili će nastati vrlo male koncentracije kao rezultat metabolizma glicerola (Jonas i Farah, 1998).

Dodatak glicerola u kemijski definiranu podlogu rezultirao je najvećim prinosom bakterijske celuloze (152 g/L vlažne celuloze). Ugljik se iz glicerola metabolizira putem dva metabolička ciklusa na razini trioza fosfata (Ross i sur., 1991). Oksidacija trioza

fosfata je prva reakcija u ovom organizmu za transport ugljika iz šećera (pentoza fosfatni ciklus) u Krebsov ciklus.



Slika 21. Utjecaj koncentracije glicerola (% vol/vol) u podlozi na nastajanje bakterijske celuloze

4.3. UTJECAJ POVRŠINE I DUBINE HRANJIVE PODLOGE NA PROIZVODNJU BAKTERIJSKE CELULOZE

Prema Iguchi i sur. (2000), tijekom statične fermentacije *kombuche*, bakterijska celulozna opna se formira na međufazi zraka i tekućine, odnosno vidljiva je na površini fermentirane tekućine. Zbog toga su provedena istraživanja u kojoj mjeri površina posude za uzgoj i dubina hranjive podloge utječu na kinetiku nastajanja bakterijske celuloze.

Fermentacija *kombuche* u biljnom čaju s okusom divlje trešnje je provedena u tri staklene posude koje su se razlikovale po svom volumenu, visini i promjeru (Tablica 3).

Tablica 3. Utjecaj površine posude i dubine hranjive podloge na sintezu bakterijske celuloze nakon 12 dana fermentacije u čaju od divlje trešnje

Posuda	Volumen (mL) V	Promjer (cm) d	Dubina (cm) h	Površina (cm ²) a	Odnos a/h	Vlažna bakterijska celuloza (g/L)
boca	620	6,5	20	33,18	1,66	32,26
teglica	370	8	5,5	50,27	9,14	216,22
tegla	1500	12	18	113,10	6,28	133,33

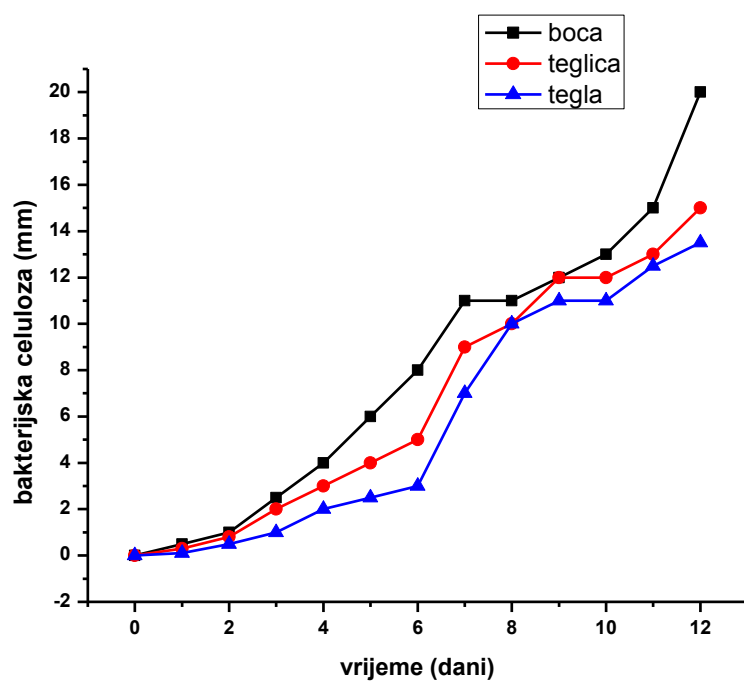
Iz Tablice 3 je vidljivo da je najmanji prinos bakterijske celuloze (20 g ili 32,26 g/L) postignut u visokoj i uskoj staklenoj posudi sa širokim otvorom (grlom), četiri puta veći u visokoj i širokoj staklenoj tegli (133,33 g/L), a najveći, skoro sedam puta veći u niskoj i širokoj staklenoj teglici (216,22 g/L). Dakle, prema dobivenim rezultatima, može se zaključiti da dubina hranjive podloge nema glavnu ulogu u sintezi bakterijske celuloze, kao što se to do sada moglo pročitati u znanstvenoj literaturi (Goh i sur., 2012), nego je važnija površina posude u kojoj se odvija fermentacija. Dobiveni rezultati mogu se usporediti s rezultatima Masaoka i sur. (1993), koji su također uočili da volumen hranjive podloge, odnosno visina u posudi, ne utječu na masu novonastale bakterijske celuloze, ali su uočili da je izostalo kontinuirano nastajanje slojeva celuloze u posudi s

konusnim stijenkama (konusnim tikvicama), što ukazuje na važnost oblika posude u kojoj se fermentacija odvija.

Goh i sur. (2012) su istraživali utjecaj dubine hranjive podloge na sintezu bakterijske celuloze u posudama s različitim volumenima i visinama. Uočili su da, kad dubina, odnosno visina posude nije značajno različita, proizvodnja bakterijske celuloze ovisi uglavnom o volumenu hranjive podloge. Prema njima, kulture s većim volumenom hranjive podloge donose veći prinos bakterijske celuloze. Kao što je vidljivo iz Tablice 3, u posudi dubine 20 cm, prinos bakterijske celuloze je bio značajnije manji čak i kad se radilo o volumenu od 620 mL. Ovi su rezultati u suglasju s rezultatima koje su dobili Okiyama i sur. (1992), koji su uočili da se u dubokom cjevastom spremniku sintetizirala relativno mala masa bakterijske celuloze. Ovi se rezultati mogu objasniti time da stanice kvasca uz etanol proizvode i određene koncentracije CO₂, koji se inkorporira u mrežastu strukturu bakterijske celuloze, čime smanjuje ili onemogućava dotok kisika koji je nužan za rast i razmnožavanje bakterija octene kiseline. Samim time što je posuda uža, manja je aktivna površina opskrbljena kisikom i, posljedično, sinteza bakterijske celuloze je usporena ili potpuno inhibirana.

Dobiveni rezultati pokazuju da površinski dio (odnos površina/dubina) hranjive podloge ima važnu ulogu u prinosu bakterijske celuloze. Zbog toga je važno, ako se želi poboljšati sinteza celuloze, fermentaciju voditi u plitkim posudama sa širokim otvorima, zbog što boljeg pristupa kisiku bakterija octene kiseline, koje su odgovorne za sintezu bakterijske celuloze.

Iako je nakon 12 dana fermentacije najveća koncentracija sintetizirane bakterijske celuloze izmjerena u maloj teglici sa širokim otvorom, mjerenjem visina novonastale celuloze svakih 24 sata, uočena je najbrža sinteza u visokoj staklenoj boci (Slika 22). Već nakon 24 sata fermentacije, u svim je uzorcima bilo vidljivo nastajanje tanke, prozirne opne na površini čaja. Ta se opna stvarala po sredini posuda, bez obzira na površinu, a do kraja 1. dana fermentacije širila se prema stijenkama staklenih posuda, sve dok nije u potpunosti popunila prostor i prekrila površinu čaja. Svakih 24 sata fermentacije su mjerene visine sintetiziranih bakterijskih celuloza jer se svakog dana sintetizira novi sloj.



Slika 22. Kinetika sinteze bakterijske celuloze u čaju od divlje trešnje u posudama različitih dubina i volumena

4.4. UTJECAJ POVRŠINE BAKTERIJSKE CELULOZE NA KAPACITET ZADRŽAVANJA I BRZINU OTPUŠTANJA VODE

Posljednji dio istraživanja odnosio se na sposobnost bakterijske celuloze da apsorbira ili otpusti velike količine vode. Zbog toga su provedeni testovi kojima je mjeran kapacitet zadržavanja vode (WHC) i brzina otpuštanja vode (WRR).

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

U Tablici 4 prikazani su rezultati mjerenja kapaciteta zadržavanja vode u uzorcima bakterijskih celuloza (BC) dobivenih uzgojem u različitim staklenim posudama, u biljnom čaju s okusom divlje trešnje.

Tablica 4. Kapacitet zadržavanja vode bakterijske celuloze ovisno o specifičnoj površini

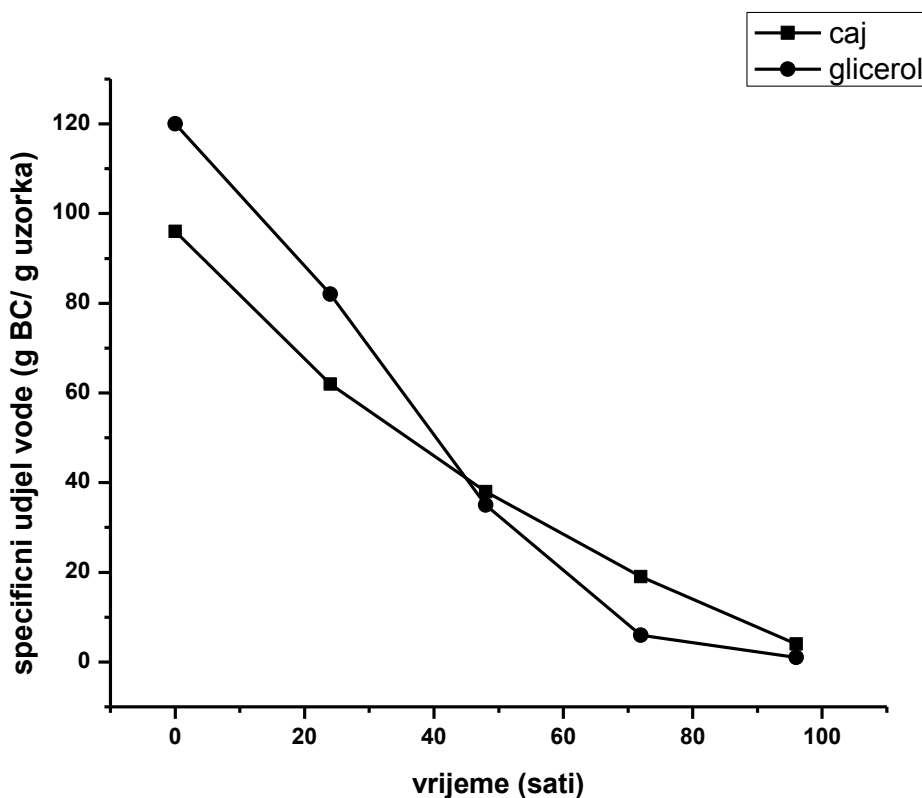
Uzorak	Masa vlažne BC (g)	Specifična površina BC (cm ² /g)	WHC (g vode/ g uzorka)
boca	20	1,659	116,43
teglica	80	0,628	100,49
tegla	200	0,566	89,55

Iz Tablice 4 je vidljivo da se, ovisno o specifičnoj površini sintetizirane bakterijske celuloze, rezultati razlikuju. Varijacije u kapacitetu 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 ispreplitanih 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). Rezultati dobiveni u

ovom radu pokazali su da se s povećanjem specifične površine bakterijske celuloze povećavao i kapacitet zadržavanja vode (Tablica 4).

Istraživanja sposobnosti otpuštanja vode provedena su na uzorku bakterijske celuloze uzgojenom u čaju (teglica) i u kemijski definiranoj podlozi s dodatkom glicerola (Erlenmeyer tikvica od 300 mL). Razlog tome je što su specifične površine sintetiziranih bakterijskih celuloza imale sličnu, odnosno usporedivu specifičnu površinu.

Na Slici 23 prikazana je kinetika otpuštanja vode iz ova dva izabrana uzorka bakterijske celuloze tijekom 96 sati pokusa. Iz slike je vidljivo da je izmjereni specifični udjel vode u početku bio veći u uzorku s glicerolom, no nakon 48 sati se izjednačio s uzorkom iz čaja. Apsorbirana voda je za 96 sati iz uzorka s glicerolom potpuno evaporirala (ishlapila), dok je u uzorku bakterijske celuloze iz biljnog čaja ostalo 3 % vode vezane u matriksu.



Slika 23. Kinetika otpuštanja vode (WRR) tijekom 96 sati iz uzoraka bakterijske celuloze (BC) nakon 12 dana fermentacije u biljnom čaju s okusom divlje trešnje i u kemijski definiranoj podlozi s dodatkom 2 % (vol/vol) glicerola

Izlazak molekula vode iz matriksa bakterijske celuloze uglavnom ovisi o rasporedu mikrovlakana (Shezad i sur., 2010). Gusto pakirana mikrovlakna vežu molekule vode puno učinkovitije zbog jačih interakcija među vodikovim vezama u strukturi celuloznog matriksa (Shah i sur., 2010).

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

5. ZAKLJUČCI

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. *Kombucha* napitak je vrlo složenog sastava, a glavni proizvodi koji nastaju kao posljedica biotransformacije su organske kiseline i mali udjel etanola, te bakterijska celuloza, koja se u obliku tanke opne oblikuje na površini napitka.

2. Uzgoj *kombuche* proveden je u kompleksnoj podlozi s dodatkom 70 g/L saharoze kao izvorom ugljika (biljni čaj) i kemijski definiranim podlogama s različitim izvorima i koncentracijama ugljika (glukoza, etanol i glicerol).

3. Povećanjem koncentracije glukoze u kemijski definiranoj podlozi povećala se koncentracija octene kiseline, za razliku od etanola i glicerola čija je prisutnost u podlozi inhibirala nastajanje octene kiseline, a pospješivala sintezu bakterijske celuloze. Etanol i glicerol su, u većim koncentracijama, izazvali smanjenje koncentracije glukonske kiseline.

4. Površina posude za uzgoj značajno utječe na prinos bakterijske celuloze. Najmanji prinos (32,26 g/L) postignut je u visokoj i uskoj posudi sa širokim grlom, četiri puta veći u visokoj i širokoj posudi (133,33 g/L), a čak 7 puta veći u plitkoj i širokoj staklenoj posudi (216,22 g/L). Rezultatima je dokazano da površina posude za uzgoj i dubina hranjive podloge ima važnu ulogu u prinosu bakterijske celuloze. Fermentacija se treba odvijati u plitkim posudama sa širokim tvorima, zbog što boljeg pristupa kisiku bakterija octene kiseline, koje su odgovorne za sintezu bakterijske celuloze.

5. Sposobnost bakterijske celuloze da apsorbira ili otpusti velike količine vode izričito je ovisna o strukturnim značajkama same biomase, posebice o veličini i ukupnom volumenu same biomase, te poroznosti strukture.

6. LITERATURNI NAVODI

Anon (1997) The benefits of green tea. *Food Ingredients and Analysis International*, February 16-17,

Antony, J.I.X., Shankaranaryana, M.L. (1997) Polyphenols of green tea. *International Food Ingredients*, 5, 47-50.

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

Bergey, D.H., Holt, J.G. (1994) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9. izd., Williams i Wilkins, USA.

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

Blot, W.J., McLaughlin, J.K., Chow, W.-H. (1997) Cancer rates among drinkers of black tea. *Crit. Rev. Food. Sci.* **37**, 739-760.

Borzani, W., DeSouza, S.J. (1995) Mechanism of The Film Thickness Increasing During The Bacterial Production of Cellulose on Non-agitated Liquid Media. *Biotech. Lett.* **17**, 1271–1272.

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.

Bushman, J.L. (1998) Green tea and cancer: a review of the literature. *Nutr. Cancer* **31**, 151-159.

Çakar, 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.

- Castro, C., Zuluaga, R., Putaux, J.L., Caro, G., Mondragon, I., Gañán, P. (2011) Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from colombian agroindustrial wastes. *Carbohydr. Polym.* **84**, 96–102.
- Chawla, P.R., Bajaj, I.B., Survase, S.A., Singhal, R.S. (2009) Microbial cellulose: Fermentative production and applications. *Food Technol. Biotechnol.* **47**, 107-124.
- Chen, C., Liu, B.Y. (2000) Changes in major components of tea fungus metanolites during prolonged fermentation. *J. Appl. Microbiol.* **89**, 834-839.
- Chen, P., Cho, S.Y., Jin, H.J. (2010) Modification and applications of bacterial celluloses in polymer science. *Macromol. Res.* **18**, 309–320.
- Chu, D.-C., Kobayashi, K., Juneja, L.R., Yamamoto, T. (1997) Theanine – its synthesis, isolation, and physiological activity. U: T. Juneja, L. R. Juneja, D.-C. Chu, M. Kim, *Chemistry and applications of green tea* (str. 129-135). Salem: CRC Press LLC.
- Colvin, J. R. (1980) The biosynthesis of cellulose: Plant biochemistry, Academic Press Inc., New York, 543-570.
- Czaja, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S., Brown, R.M. Jr (2006) Microbial cellulose—the natural power to heal wounds. *Biomaterials* **27**, 145–151.
- Dahman, Y. (2009) Nanostructured biomaterials and biocomposites from bacterial cellulose nanofibers. *J. Nanoscience Nanotechnology* **9**, 5105–5122.
- Dahman, Y., Jayasuriya, K.E., Kalis, M. (2010) Potential of biocellulose nanofibers production from agricultural renewable resources: Preliminary study. *Appl. Biochem. Biotech.* **162**, 1647–1659.

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

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

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

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

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

Embuscado, M., Marks, J., Bemiller, J. (1994a) Bacterial cellulose. I. Factors affecting the production of cellulose by *Acetobacter xylinum*. *Food Hydro.* **8**, 407-418.

Embuscado, M., Marks, J., Bemiller, J. (1994b) Bacterial cellulose. II. Optimization of cellulose production by *Acetobacter xylinum* through response surface methodology. *Food Hydro.* **8**, 419-430.

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

Ferguson, B., Estelle, A. (1998) Benefits of Kombucha. <http://bawue.de/~kombucha/benefits.htm>. Pristupljeno 15. 07. 2016.

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.

Frank, G.W. (1998) Does Kombucha have any side effects? <http://bawue.de/~kombucha/side-eff.htm>. Pristupljeno 16. 07. 2016.

Fuller, R. (1992) History and development of probiotics. In R. Fuller, *Probiotics The scientific basis* (str. 1-9). London: Chapman & Hall.

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

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

Greenwalt, C.J., Steinkraus, K.H., Ledford, R. A. (2000) Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects. *J. Food Protect.* **63**, 976-981.

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

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

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

Hara, Y., Luo, S.-J., Wickremashinghe, R.L., Yamanishi, T. (1995b) IV. Processing tea. *Food Rev. Int.* **11**, 409-434.

Hara, Y., Luo, S.-J., Wickremashinghe, R.L., Yamanishi, T. (1995c) Chemical composition of tea. *Food Rev. Int.* **11**, 527-542.

Hara, Y., Luo, S.-J., Wickremashinghe, R.L., Yamanishi, T. (1995d) VI. Biochemistry of processing black tea. *Food Rev. Int.* **11**, 457-471.

Hara, Y., Luo, S.-J., Wickremashinghe, R.L., Yamanishi, T. (1995e). VIII. Flavor of tea. *Food Rev. Int.* **11**, 477-525.

Hara, Y., Luo, S.-J., Wickremashinghe, R.L., Yamanishi, T. (1995f) IX. Uses and benefits of tea. *Food Rev. Int.* **11**, 527-542.

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

Hollman, P.C.H., Tijburg, L.B.M., Yang, C.S. (1997) Bioavailability of flavonoids from tea. *Crit. Rev. Food. Sci.* **37**, 719-738.

Hu, Y., Catchmark, J.M., Vogler, E.A. (2013) Factors impacting the formation of sphere-like bacterial cellulose particles and their biocompatibility for human osteoblast growth. *Biomacromolecules* **14**, 3444–3452.

Hwang, J.W., Yang, Y.K., Hwang, J.K., Pynu, Y.R., Kim, Y.S. (1999) Effect of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* RBC5 in agitated culture. *J. Sci. Bioeng.* **88**, 183-188.

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

Imai, K., Suga, K., Nakachi K. (1997) Lead article. Cancer-preventive effects of drinking green tea among a Japanese population, *Prev. Med.* **26**, 769-775.

Ishikara, M., Matsunaga, M., Hayashi, N., Tišler, V. (2002) Utilization of D-xylose as carbon source for production of bacterial cellulose. *Enzyme Microb. Tech.* **31**, 986-991.

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

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

Kakuda, T., Sakane, I., Takihara, T., Tsukamoto, S., Kanegae, T., Nagoya, T. (1996) Effects of tea (*Camellia sinensis*) chemical compounds on ethanol metabolism in ICR mice. *Biosci. Biotech. Bioch.* **60**, 1450-1454.

Kakuda, T., Takihara, T., Sakane, I., Mortelmans, K. (1994) Antimicrobial activity of tea extracts against periodontopathic bacteria. *Nippon Nogei. Kaishi (Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan)* **68**, 241-243.

Katiyar, S.K., Mukhtar, H. (1996) Tea in chemoprevention of cancer: epidemiologic and experimental studies (review). *Int. J. Oncol.* **8**, 221-238.

Kawecki, M., Krystynowicz, A., Wysota, K., Czaja, W., Sakiel, S. (2004) Bacterial cellulose biosynthesis, properties and applications. *International Review Conference Biotechnology*, Vienna, Austria, 14–18.

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

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

Kim, J., Cai, Z., Lee, H.S., Choi, G.S., Lee, D.H., Jo, C. (2011) Preparation and characterization of a bacterial cellulose/chitosan composite for potential biomedical application. *J. Polymer Res.* **18**, 739-744.

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

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

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.

Maneerung, T., Tokura, S., Rujiravanit, R. (2007) Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. *Carbohydr. Polym.* **2**, 43–51.

Marteau, P., Rambaud, J.-C. (1993) Potential of using lactic bacteria for therapy and immunomodulation in man. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**, 207-220.

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

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

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

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

Mitscher, L.A., Jung, M., Shankel, D., Dou, J.-H., Steele, L., Pillai, S. (1997) Chemoprotection: a review of the potential therapeutic antioxidant properties of green tea (*Cemellia sinensis*) and certain of its constituents. *Med. Res. Rev.* **17**, 327-365.

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

Muangman, P., Opananon, S., Suwanchot, S., Thangthed, O. (2011) Efficiency of microbial cellulose dressing in partial-thickness burn wounds. *The Journal of the American College of Certified Wound Specialists* **3**, 16-19.

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

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

Okiyama, A., Shirae, H., Kano, H., Yamanaka, S. (1992) Bacterial cellulose. Two-stage fermentation process for cellulose production by *Acetobacter aceti*. *Food Hydrocoll.* **6**, 471-477.

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

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

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.

Perron, A.O., Patterson, J.A., Yanofsky, N.N. (1995) Kombucha „mushroom“ hepatotoxicity. *Ann. Emerg. Med.* **26**, 660-661.

Phan, T.G., Estell, J., Duggin, G., Beer I., Smith, D., Ferson, M.J. (1998) Lead poisoning from drinking Kombucha tea brewed in a ceramic pot. *Med. J. Australia* **169**, 644-646.

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

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

Roche, J. (1998) The history and spread of Kombucha.
<http://w3.trib.com~kombu/roche.html>. Pristupljeno 29. 07. 2016.

Roedig-Penman, A., Gordon, M.H. (1997) Antioxidant properties of catechins and green tea extracts in model food emulsions. *J. Agr. Food Chem.* **45**, 4267-4270.

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

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

Sakanaka, S., Kim, M., Taniguchi, M., Yamamoto, T. (1989) Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. *Agr. Biol. Chem. Tokyo*, **53**, 2307-2311.

Sakanaka, S., Sato, T., Kim, M., Yamamoto (1990). Inhibitory effects of green tea polyphenols on glucan synthesis and cellular adherence of cariogenic *Streptococci*. *Agr. Biol. Chem. Tokyo*, **54**, 2925-2929.

Sakanaka, S., Aizawa, M., Kim, M., Yamamoto, T. (1996) Inhibitory effects of green tea polyphenols on growth and cellular adherence of an oral bacterium, *Porphyromonas gingivalis*, *Biosci. Biotech. Bioch.* **60**, 745-749.

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

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.*

Sawai, Y., Sakata, K. (1998) NMR analytical approach to clarify the antioxidative molecular mechanism of catechins using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J. Agr. Food Chem.* **46**, 111-114.

Shah, N., Ha, J. H., Park, J. K. (2010) Effect of reactor surface on production of bacterial cellulose and water soluble oligosaccharides by *Gluconacetobacter hansenii* PJK. *Biotechnol. Bioproc. E.* **15**, 110–118.

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

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

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.

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

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

Sievers, M., Lanini, C., Weber, A., Schuler-Schmid, U., Teuber, M. (1995). Microbiology and fermentation balance in kombucha beverage obtained from a tea fungus fermentation. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**, 590-594.

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

- Sreeramulu, G., Zhu, Y., Knool, W. (2000) Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2589-2594.
- Srinivasan R., Smolinske, S., Greenbaum, D. (1997) Probable gastrointestinal toxicity of kombucha tea. *J. Gen Intern. Med.* **12**, 643-644.
- 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.
- Tajima, K., Fujiwara, M., Takai, M. (1995) Biological control of cellulose. *Macromol. Symp.* **99**, 149-155.
- Tal, R., Wong, H. C., Calhoon, R. (1998). Three cdg operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J. Bacteriol.* **180**, 4416–4425.
- Tanaka, M., Murakami, S., Shinke, R., Aoki, K. (2000) Genetic characteristics of cellulose-forming acetic acid bacteria identified phenotypically as *Gluconacetobacter xylinus*. *Biosci. Biotechnol. Bioch.* **64**, 757-60.
- Tang, X., Kumar, P., Alavi, S., Sandeep, K. (2012) Recent advances in biopolymers and biopolymer-based nanocomposites for food packaging materials. *Crc Cr. Rev. Food Sci.* **52**, 426–442.
- Tanskul, S., 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.
- Teoh, A.L., Heard, G., Cox, J. (2004) Yeast ecology of Kombucha fermentation. *Int. J. Food Microb.* **95**, 119-126.

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

Toda, M., Okubo, S., Hiyoshi, R., Tadakatsu, S. (1989) The bactericidal activity of tea and coffee. *Lett. Appl. Microbiol.* **8**, 123-125.

Toda, M., Okubo, S., Ikigai, H., Suzuki, T., Suzuki Y., Shimamura, T. (1991). The protective activity of tea against infection by *Vibrio cholerae* 01. *J. Appl. Bacteriol.* **70**, 109-112.

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

Toyoda, M., Tanaka, K., Hoshino, K., Akiyama, H., Tanimura, A., Saito, Y. (1997) Profiles of potentially antiallergic flavonoids in 27 kinds of health tea and green tea infusions. *J. Agr. Food Chem.* **45**, 2561-2564.

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.

Vinson, J.A., Dabbagh, Y.A., Serry, M.M., Jang, J. (1995) Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *J. Agr. Food Chem.* **43**, 2800-2802.

Vinson, J.A., Jang, J., Dabbagh, Y.A., Serry, M. M., Cai, S. (1995) Plant polyphenols exhibit lipoprotein-bound antioxidant activity using an in vitro oxidation model for heart disease. *J. Agr. Food Chem.* **43**, 2798-2799.

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

Weisburger, J.H. (1999) Tea and health: the underlying mechanisms. *P. Soc. Exp. Biol. Med.*, **220**, 271-275.

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.

Wiseman, S.A., Balentine, D.A., Frei, B. (1997) Antioxidants in tea. *Crit. Rev. Food. Sci.* **37**, 705-718.

Wu, S.C., Lia, Y. K. (2008) Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **54**, 103–108.

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

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

Yen, G.-C., Chen, H.-Y., & Peng, H.-H. (1997) Antioxidant and prooxidant effects of various tea extracts. *J. Agr. Food Chem.* **45**, 30-34.

Yokozawa, T., Dong, E., Nakagawa, T., Kashiwagi, H., Nakagawa, H., Takeuchi, S., Chung, H. Y. (1998) In vitro and in vivo studies on the radical-scavenging activity of tea. *J. Agr. Food Chem.* **46**, 2143-2150.

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

Yurkevich, D.I., Kutysenko, V.P. (1998) Study of glucose utilisation during the growth of tea fungus by ^1H NMR spectroscopy. *Biofizika* **43**, 319-322.

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.