Mikrostrukturna, biokemijska i antimikrobna karakterizacija bakterijske celuloze uzgojene u čaju crvenog grma

Hranić, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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:159:298855

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

MIKROSTRUKTURNA, BIOKEMIJSKA I ANTIMIKROBNA KARAKTERIZACIJA BAKTERIJSKE CELULOZE UZGOJENE U ČAJU CRVENOG GRMA

Ivana Hranić
6949/BT

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 2
Mentor: Izv. prof. dr. sc. *Sunčica Beluhan*

Zagreb, 2017.

Ovaj rad izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Sunčice Beluhan.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo,
Industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Bitehnologija

MIKROSTRUKTURNA, BIOKEMIJSKA I ANTIMIKROBNA KARAKTERIZACIJA BAKTERIJSKE CELULOZE UZGOJENE U ČAJU CRVENOG GRMA

Ivana Hranić, 6949/BT

Sažetak:*Kombucha* je tradicionalno osvježavajuće piće dobiveno fermentacijom zaslađenog čaja sa simbiotskim kulturama octenih bakterija i kvasaca. U ovom je radu proučavana proizvodnja organskih kiselina (octene i glukonske), etanola i bakterijske celuloze biotransformacijom*kombuche* u zaslađenom (60, 80 i 100 g/L) Rooibos čaju. Promjene pH vrijednosti su povezane sa simbiotskim metaboličkim aktivnostima kvasaca i bakterija octene kiseline, pri čemu se pH vrijednostsmanjivala s porastom proizvodnje octene kiseline. Analiziranjem uzoraka FT-IR spektroskopijom, XDR analizom i skenirajućom elektronskom mikroskopijom, određeno je da uzorak sadrži viši postotak amorfnih regije nego kristalnih regija, kao što je i očekivano. Debljina sloja i prinos bakterijske celuloze je rastao tijekom vremena fermentacije. Antimikrobna svojstva su opažena na testnim mikroorganizmima (*Salmonellatyphimurium, Escherichiacoli* i*Pseudomonassp.*), dok *Vibriocholerae* nije bio inhibiran uzorcima *kombuche*. Rezultati ovog istraživanja upućuju na to da prinos celuloze ovisi o mnogo čimbenika koje trebaju optimizirati kako bi se postigao maksimalni prinos.

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

Rad sadrži:48 stranica, 14slika, 4tablice, 114literaturna navoda
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: *Izv. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan*

Datum obrane: srpanj 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Biotechnology

Department of Biochemical engineering
Laboratory for Biochemical Engineering,
Industrial Microbiology, Malting and Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

MICROSTRUCTURAL, BIOCHEMICAL AND ANTIMICROBIAL CHARACTERIZATION OF BACTERIAL CELLULOSE OBTAINED BY ROOIBOS TEA FERMENTATION

Ivana Hranić, 6949/BT

Abstract: *Kombucha*is a traditional refreshing beverage obtained by the fermentation of sweetened tea with a powerful symbiosis of acetic bacteria and yeasts. In this work, the production of organic acids (acetic and gluconic), ethanol and bacterial cellulose by biotransformation of *kombucha* in Rooibos tea sweetened with sucrose (60, 80 and 100 g/L) was studied. Changes in pH were related to the symbiotic metabolic activities of yeasts and acetic acid bacteria, and it is decreased by the formation of organic acids. Analysing samples by FT-IR spectroscopy, XRD analysis and scanning electron microscopy, it was detected that the sample had higher percentage of amorphous regions, than crystalline regions, as it was expected. The thickness and yield of bacterial cellulose increased with fermentation time. Antimicrobial activities was observed in the fermented samples against the tested microorganisms (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas* sp.), but *Vibrio cholearae*was not inhibited by *kombucha*.Findings from this study suggest that the yield of cellulose depends on many factors that need to be optimized to achieve maximum yield.

Keywords: *kombucha,* bacterialcellulose, morphology, physicalproperties, antimicrobialproperties

Thesis contains: 48 pages, 14 figures, 4 tables, 114references
Original in: Croatian
Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: *Sunčica Beluhan, PhD, Associate Professor*

Defence date: July 2017

Sadržaj

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 2
2.1. Bakterijska celuloza 2
2.2. Sinteza bakterijske celuloze u različitim uvjetima uzgoja 3
2.3. Morfologija i struktura bakterijske celuloze 5
2.4. Stupanj kristaliničnosti bakterijske celuloze 8
2.5. Kapacitet zadržavanja vode 10
2.6. Biokompatibilnost bakterijske celuloze 11
3. EKSPERIMENTALNI DIO 13
3.1. Materijali i metode 13
3.1.1. Priprava kulture *kombuche* 13
3.2. Hranjiva podloga 13
3.2.1. Vrsta čaja 13
3.2.2. Priprava kompleksne podloge (fermentirani čaj) 13
3.3. Određivanje pH vrijednosti 13
3.4. Određivanje koncentracije octene kiseline 14
3.5. Određivanje koncentracije glukonske kiseline 14
3.6. Određivanje alkohola kemijskom metodom 14
3.7. FT-IR spektroskopija (*eng*. Fourier Transform Infrared Spestroscopy) 15
3.8. Difrakcija rendgrenskim zrakama (*eng.* X Ray Diffraction; XRD) 15
3.9. Pretražna elektronska mikroskopija (*eng*. Scaning Electron Microscopy;SEM) 15
3.10. Izračunavanje mase i prinosa bakterijske celuloze 15
3.11. Određivanje kapaciteta zadržavanja vode (*eng.* Water-Holding Capacity;WHC) 16
3.12. Određivanje brzine otpuštanja vode (*eng.* Water-Release Rate; WRR) 17
3.13. Određivanje antimikrobnih svojstava bakterijske celuloze 17
4. REZULTATI I RASPRAVA 18
4.1. Promjena pH vrijednosti 18
4.2. Organske kiseline i etanol 19
4.3. Sinteza bakterijske celuloze 22
4.4. Kapacitet zadržavanja i otpuštanja vode 22
4.5. FT-IR spektroskopska analiza 24
4.6. Difrakcija rentgenskih zraka 24
4.7. Pretražna elektronska mikroskopija 25

4.8. Antimikrobno djelovanje 27
5. ZAKLJUČCI 28
6. LITERATURA.....29

1. UVOD

Kombucha čaj je tradicionalni bezalkoholni fermentirani napitak, koji je osvježavajuće slatkast, blago kiseli, lagano pjenušav poput jabukovače, a zbog njegovih nutritivnih, bioloških i ekoloških vrijednosti, preporučuje se svakodnevna konzumacija u malim volumenima (0.5 dL dva puta na dan) (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. Tradicionalno se proizvodi sa crnim ili zelenim čajem zaslađenim saharozom u koji je, kao starter kultura, nacijepljena združena, odnosno simbiotička kultura bakterija octene kiseline i raznih vrsta osmofilnih kvasaca, a fermentacija se provodi tijekom 10-14 dana (Teoh i sur., 2004). 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, invertaza iz kvasca hidrolizira saharozu do glukoze i fruktoze. Glukozu koristi za proizvodnju etanola i CO_2, a bakterija *Acetobacter xylinum* oksidira etanol do acetaldehida i nakon toga do octene kiseline. Sekundarna biokemijska aktivnost bakterije *A. xylinum* je oksidacija glukoze do glukonske kiseline (Jayabalan i sur., 2007).

Jedan od najzanimljivijih proizvoda biotransformacije čaja nacijepljenog *kombuchom* je bakterijska celuloza koju sintetizira vrsta *A. xylinum* (prema novijoj taksonomiji *Gluconacetobacter xylinus*) (Yamada i sur., 1997). Bakterijska celuloza (BC) je višenamjenski biopolimer, koji posjeduje specifično visoki stupanj poroznosti, relativno visoku propusnost za tekućine i plinove, izrazito visoku sposobnost upijanja vode, čvrstoću strukture i ultrafinu mrežnu strukturu (Ullah i sur., 2016).

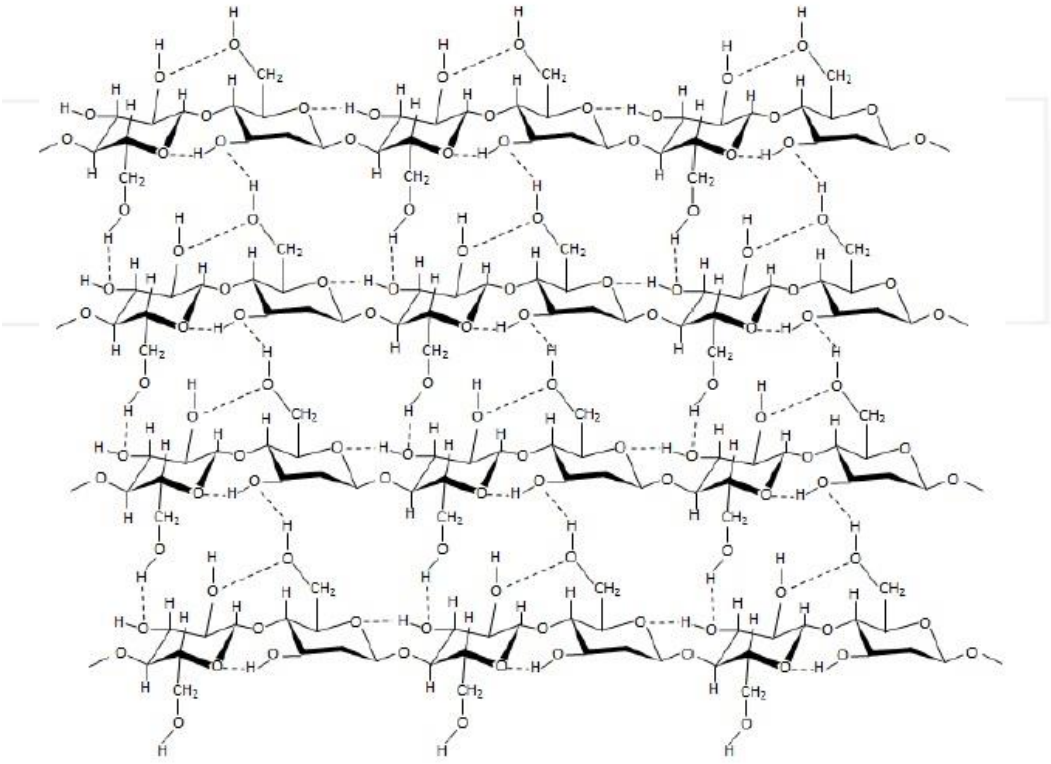
U ovom radu su praćeni i određivani sljedeći parametri:

- promjena pH vrijednosti i koncentracija octene i glukonske kiseline, te etanola tijekom 12 dana fermentacije *kombuche* u čaju crvenog grma,
- prinos sintetizirane bakterijske celuloze,
- kapacitet zadržavanja i otpuštanja vode,
- kristaliničnosti bakterijske celuloze,
- antimikrobno djelovanje *kombucha* fermentiranog čaja crvenog grma.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Bakterijska celuloza

Bakterijska celuloza (BC) je egzopolisaharid sastavljen od glukoznih monomera vezanih β-1,4 glikozidnim vezama, kemijske formule $(C_6H_{10}O_5)_n$ (Slika 1). Ovaj polimer je specifični proizvod primarnog metabolizma kojeg mogu proizvoditi ekstracelularno u obliku nanovlakana nekoliko rodova bakterija, kao što su *Gluconacetobater* (prije *Acetobacter*), *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Rhizobium* i *Sarcina* (Jonas i Farah, 1998).



Slika 1. Kemijska struktura bakterijske celuloze (Sheykhnazari i sur., 2011)

Povijesni podaci ukazuju da se bakterijska celuloza koristi već dugo vremena u proizvodnji tradicionalne slastice na Filipinima, poznate kao *Nata de Coco* (Lapuz i sur., 1967). U današnje vrijeme, iako je bakterijska celuloza u jednom dijelu svijeta sastavni dio tradicionalne gastronomske ponude, interes akademske zajednice i industrije je sve veći zbog jedinstvenih svojstava i širokim mogućnostima primjene.

Celulozu koju je proizvela bakterija *Acetobacter xylinum* je prvi put opisao Brown 1886. godine, koji ju je uzgojio na glukozi kao izvoru ugljika u prisutnosti kisika (Brown, 1886). Prema preporuci Yamada i suradnika 1997. godine, koja je naknadno valorizirana u *International Journal of Systematic Biology*, vrsta *A. xylinum* je reklasificirana i znanstveno

kategorizirana kao *G. xylinus*, na temelju karakteristične filogenije temeljene na analizi sekvence 16S ribosomske RNA (Yamada i sur., 1997).

Ova bakterijska vrsta pripada porodici *Acetobacteriaceae*, morfološki je klasificirana kao Gram negativna, obligatno aerobna, nepatogena, mikroskopski vidljiva i kao pojedinačne stanice, u parovima ili u kratkim lancima. Pripada obitelji koja može oksidirati različite izvore ugljika, od glukoze, fruktoze, galaktoze, saharoze, manitola, glicerola i inozitola (Sheykhnazari i sur., 2011; Ruka i sur., 2012) i etanola (Yamada i sur., 1997). Također može ekstracelularno proizvoditi bakterijsku celulozu na temperaturama od 25 do 35 ^{o}C i pH vrijednostima od 3 do 7.

Struktura bakterijske celuloze je višeslojevita zbog vodikovih veza i time tvori trodimenzionalnu mrežu. Morfologija membrane izravno ovisi o okolišu i o dodiru kulture s hranjivom podlogom, odnosno kisikom, pri čemu bakterijska celuloza tvori tanki film s kojim se lako rukuje, ovisno o veličini, odnosno promjeru posude u kojoj se vodio uzgoj (Ruka i sur., 2012).

Znanstvenici su otkrili nekoliko novih bakterijskih vrsta sposobnih za proizvodnju biopolimera s mogućom industrijskom primjenom (Ashtaputre i Shah, 1995). Iako mnogi organizmi mogu proizvesti celulozu, *G. xylinus* je jedina poznata vrsta koja može proizvesti celulozu u industrijskim mjerilima (Klemm i sur., 2005).

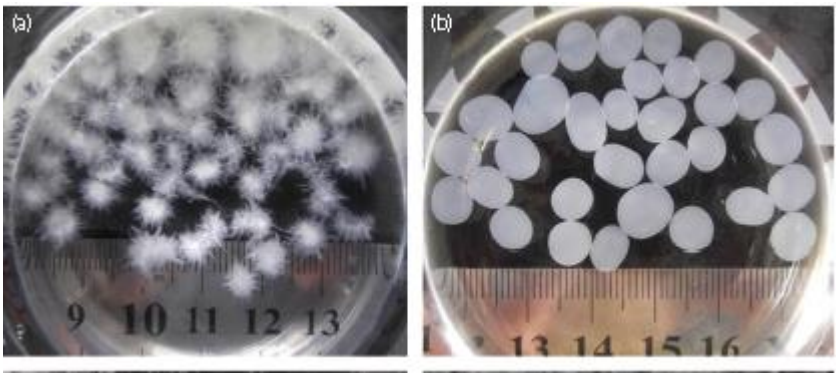
U prirodi su mikroorganizmi koji proizvode celulozu uobičajeno u simbiozi s nekim drugim mikroorganizmom. Kod fermentacije *kombuche*, kvasac *Zygosaccharomices* najčešće se koristi kao simbiotski mikroorganizam (Marsh i sur, 2014).

Kombucha poznata kao „čajna gljiva" ili *Haipao* (Lin i sur., 1996) proizvodi se u Kini više od 2000 godina s vrlo različitom populacijom kvasaca (Mayser i sur., 1995; Teoh i sur., 1994), čija je uloga konvertirati saharozu do organskih kiselina, CO_2 i etanola, koji kasnije koriste bakterije koje proizvode celulozu za proizvodnju acetaldehida i octene kiseline (Greenwalt i sur., 1998; Dufresne i Farnworth, 2000).

2.2. Sinteza bakterijske celuloze u različitim uvjetima uzgoja

Celuloza je najopsežniji polisaharid na zemlji i proizvode ju različiti organizmi, od biljaka do algi i prokariotskih organizama (Brown, 1886.; Ross i sur., 1991.; Nobles i sur., 2001). O sintezi izvanstaničnog želatinoznog sloja *Bacillus xylinum* prvi puta je izvijestio 1886. Brown. Bakterijska celuloza privukla je više pažnje u drugoj polovini 20. stoljeća. To je ekstracelularni mikrobni polimer koji pripada produktima primarnog metabolizma (Ruka i sur., 2013). Razlog zbog kojeg bakterija sintetizira celulozu još uvijek je nejasan, ali se

smatra da joj je to zaštitni sloj, koji štiti od ultraljubičastih zraka ili da djeluje kao barijera za razvoj gljiva, kvasaca i drugih organizama (Moon i sur., 2011). Neke bakterijske vrste uključujući *Komagataeibacter*, *Gluconacetobacter*, *Rhizobium, Agrobacterium*, *Rhodobacter* i *Sarcina* (Brown i Laborie, 2007.; Yamada, 2014) mogu sintetizirati bakterijsku celulozu. Neki od dobro poznatih vrsta u proizvodnji bakterijske celuloze klasificirani su u različite rodove. Na primjer, tri najstarije vrste opisane u proizvodnji bakterijske celuloze su inicijalno klasificirane kao rod *Acetobacter*, reklasificiran kao *Gluconoacetobacter* (Nishijima i sur., 2013), a nedavno ponovno prekvalificirano u *Komagateibacter*, (Mas i sur., 2014). Vrste specifične kao što su *G. xylinus*, *G. hansenii* i *G. europaeus* sada se pojavljuju u rodu *Komagataeibacter* (Mas i sur., 2014). Prednost celuloznih mikrofibrila dobivenih bakterijama jest mogućnost mijenjanja kristalizacije i oblika promjenom uvjeta uzgoja kulture (Astley i sur., 2003.; Harris i sur., 2012). Očekuje se da će bakterijska celuloza biti novi industrijski materijal zbog svojih jedinstvenih svojstava uključujući visoku mehaničku čvrstoću, visoku kristaliničnost, visoki kapacitet zadržavanja vode i visoku poroznost, čistoću i biorazgradivost (Laborie, 2007.; Shah i sur., 2013.; Yadav i sur., 2013.; Zheng i sur., 2013.; Zhu i sur., 2013.; Shi i sur., 2014). Bakterijska celuloza se može proizvesti dvjema metodama. U stacionarnoj kulturi, na granici zraka i tekućine formira se želatinozni celulozni film. U dinamičkim uvjetima, celuloza se sintetizira duboko u hranjivoj podlozi u obliku suspenzije vlaknastih peleta nepravilnih masa (Chao i sur., 2000., 2001) ili oblika nalik kuglicama (Gu i Catchmark, 2012).



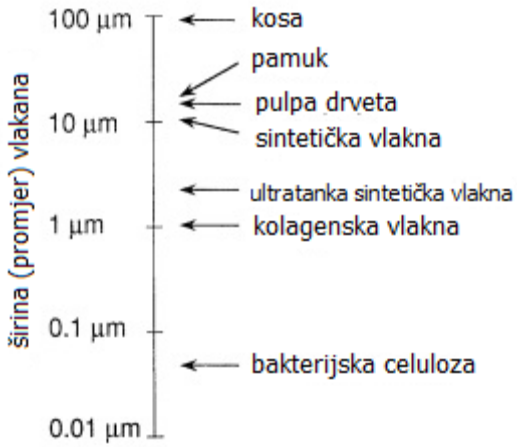
Slika 2. Izgled bakterijske celuloze uzgajane u različitim dinamičnim uvjetima (Gu i Catchmark, 2012)

Ispitivanja stanice humanog osteoblasta na kuglastoj bakterijskoj celulozi pokazali su dobre stanične životne sposobnosti, što čini bakterijsku celulozu kuglastog oblika korisnom u

razvoju: specifičnih biomedicinskih materijala, kao što su predlošci koštanog tkiva (Hu, 2011), adsorbenti za teške metalne ione i otpadne vode, bioseparacije, imobilizirane reakcije i suspenzije staničnih kultura (Zhu i sur., 2011). Czaja i sur. (2004.) su objavili kako *A. xylinum* NQ5 (ATCC 53582) uzgojena u tikvicama pri različitim brzinama rotacije (u rasponu od 90-250 okr/min) može proizvesti kuglastu celulozu bez pojave ne-celulozne mutacije. Yan i sur. (2008) koristili su *A. xylinum* 1.1842 pri brzini rotacije od 250 okr/min kako bi se sintetizirala bakterijska celuloza nalik pahuljama. Gu i Catchmark (2012) koristili su *G. xylinus* za proizvodnju sferične bakterijske celuloze u dinamičkim uvjetima uzgoja s dodatkom ksiloglukana, ksilana, arabinogalaktana i glukana. Nedavno su Shi i sur. (2014) objavili kako bakterijska celuloza proizvedena u dinamičkim uvjetima ima širok raspon oblika i teksture, kao što su filmovi, višeslojna pulpa, filamenti, kugle, čestice i dlake što omogućuje različitu primjenu bakterijske celuloze u hrani.

2.3. Morfologija i struktura bakterijske celuloze

Vlakna bakterijske celuloze općenito imaju promjer 0.1-10 mm, što je 100 puta manje nego vlakna biljne celuloze (Hirai i sur., 1998, 2002; Guhados i sur., 2005; Czaja i sur., 2007; Chawla i sur., 2009; Cherian i sur., 2013). Početni lanci celuloznog agregata tvore subfibrili koji imaju širinu približnu 1.5 nm i najtanja su prirodno stvorena vlakna, usporediva samo s podelementnim vlaknima celuloze pronađene u kambiju nekih biljaka (Kudlicka, 1989). Ovi subfibrili su kristalizirani u mikrofibrile ili protofibrile širine 2-6 nm. Mikrofibrili se skupljaju ili spajaju kako bi tvorili makroskopske vrpce (Yamanaka i sur. 1989; 2000; Jonas i Farah, 1998; Nakagaito i sur., 2005; Castro i sur., 2011; Torres i sur., 2013). Objavljene dimenzije ovih vrpci su bile u rasponu od 3-4 nm u debljini x 70-80 nm u širini po Zaaru (1977), 3.2 nm x 133 nm po Brownu i sur. (1976) ili 4.1nm x 117 nm po Yamanaka i sur. (2000). S druge strane, širina celuloznih vlakana proizvedenih u masivnoj brezi ili borovom drvu je za dva reda veličine veća (1.4-4.0 x 10^{-2} i 3.0 – 7.5 x 10^{-2} nm) (Bielecki i sur., 2002; El-Saied i sur., 2004).

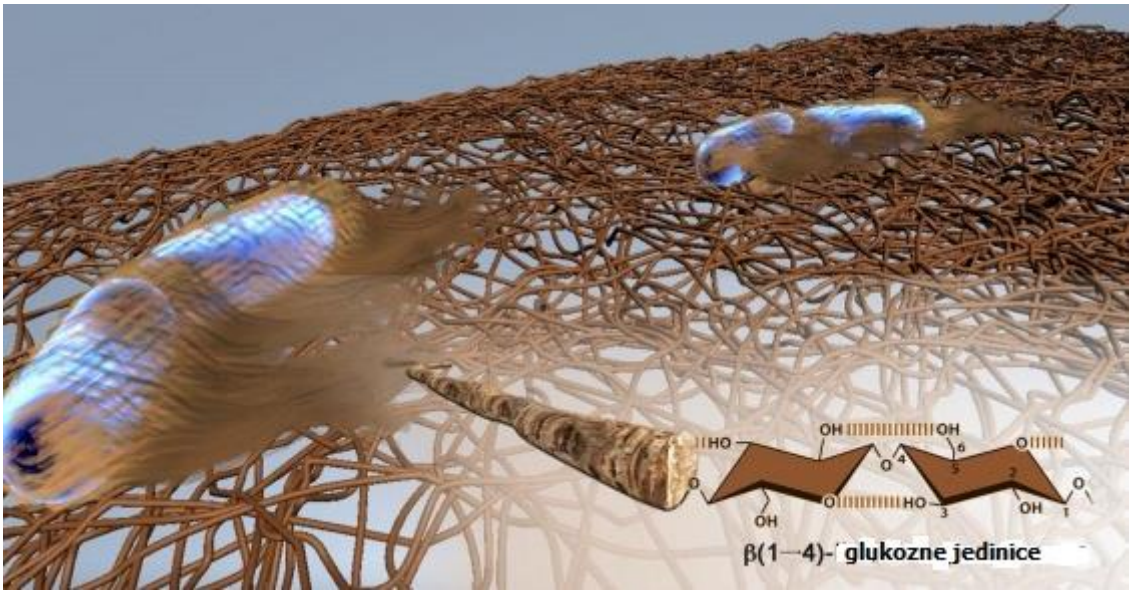


Slika 3. Usporedba promjera vlakana bakterijske celuloze s prirodnim i umjetnim vlaknima (Yoshinaga i sur., 1997)

Duljina ultrafinih vrpci bakterijske celuloze kreće se od 2 do 9 um. One formiraju gustu mrežastu strukturu, stabiliziranu opsežnim vodikovim vezama (Yamanaka i sur., 2000; Saxena i Brown, 2005; Czaja i sur., 2006; Oshima i sur., 2008). Yamanaka i sur. (2000.) navode da oblik stanica bakterija proizvođača celuloze utječe na formiranje vlakana jer se biosinteza ovih vlakana odvija u određenim mjestima na staničnoj površini. Izvijestili su kako nalidiksična kiselina i kloramfenikol induciraju produljenje bakterija što rezultira formiranjem širih celuloznih vrpci ili agregata vrpci. Formiranje celuloznih vrpci također ovisi i o rastu i povećanju temperature (Hirai i sur., 1997;1998). Pod standardnim uvjetima kulture na 28-30°C, *A. xylinum* proizvodi skup celuloze nalik normalnim vrpcama, koja je istisnuta paralelno s dužom osi stance i zaokrenuta na način desne ruke (Hirai i sur., 1998). Međutim, u istraživanju, Hiraii sur. (2002) navode kako na 4°C *A. xylinum* proizvodi dva traci nalik celulozna sklopa s grubim i gustim strukturama. Ti vrpčasti sklopovi se sastoje od lanaca nalik celuloznim molekulama koje su ekstrudirane okomito na dugu os bakterijske stanice.

S promjenom uvjeta uzgoja kulture razlikuje se i makroskopska morfologija bakterijske celuloze (Hestrin i Schramm, 1954.; Watanabe i sur., 1998.; Bielecki i sur., 2002). Dvije su tipične metode uzgoja primijenjene za proizvodnju mikrobiološke celuloze, statična kultura i tresena kultura (Watanabe i sur., 1998; Chao i sur., 2000; Bielecki i sur., 2002; Czaja i sur., 2004; Chawla i sur., 2009). U statičkim uvjetima uzgoja kulture, bakterije akumuliraju celulozu na površini tekuće hranjive podloge, a na granici tekućine i zraka bogatim kisikom stvara se želatinozna membrana (Watanabe i sur, 1998.; Dubey i sur, 2002.; Czaja i sur., 2007, Oshima i sur., 2008; Methafi i sur., 2010). Ovi celulozni subfibrili kontinuirano se istiskuju s linearno poredanih pora na površini bakterijske stanice, zatim se kristaliziraju u

mikrofibrile i guraju dublje u podlogu za rast. Dakle, tanki film nalik koži koji daje potporu bakterijskoj populaciji sastoji se od preklopljenih i isprepletenih celuloznih vrpci, stvarajući paralelne, ali neorganizirane ravnine (Hestrin i Schramm, 1954; Jonas i Farah, 1998; Bielecki i sur., 2002). Ova gusta želatinozna membrana formirana na granici zraka i tekućine okarakterizirana je trodimenzionalnom strukturom koja se sastoji od ultrafine mreže celuloznih nanofibrila koji su orijentirani jednoosno (Klemm i sur., 2001; Czaja i sur., 2006; Methafi i sur., 2010).



Slika 4. 3-D struktura bakterijske celuloze (Gomes de Oliveira Barud i sur., 2016)

U uvjetima tresene kulture, bakterijska celuloza je akumulirana u disperznom mediju kao nepravilne granule, zvjezdane i vlaknaste niti (Hestrin i Schramm, 1954; Vandamme i sur., 1998; Watanabe i sur., 1998; Czaja i sur., 2004; Gu i Catchmark, 2012). Niti isprepletene bakterijske celuloze proizvedene u uvjetima uzgoja kulture na tresilici, međusobno se povezuju kako bi oblikovale uzorak nalik rešetki i imaju otprilike okomite i približno paralelne orijentacije (Watanabe i sur., 1998.a). Bakterijska celuloza proizvedena u statičkim i dinamičnim uvjetima uzgoja kulture ima različite trodimenzionalne strukture kada se promatra skenirajućom elektronskom mikroskopijom (Johnson i Neogi, 1989; Czaja i sur, 2004). Bakterijsko-celulozni fibrili proizvedeni u statičnoj kulturi su duži i iskrižano nagomilani jedan iznad drugog dok su niti bakterijske celuloze proizvedene u dinamičkim zapetljane i zakrivljene (Johnson i Neogi, 1989). Osim toga, imaju veću širinu poprječnog presjeka (0.1 – 0.2 μm) nego celulozni fibrili proizvedeni u statičkoj kulturi (obično 0.05 - 0.10 μm). Czaja i sur. (2004) primijetili su kako se bakterijska celuloza iz tresene kulture

proizvodi u obliku kugle i kako su stanice složene u organizirane skupove oko vanjske površine ovih celuloznih kugla.

Morfologija celuloznih kugla proizvedenih u tresenim kulturama može se mijenjati promjenom brzine miješanja također i dodatkom određenih polimera (ksiloglukan, pektin, ksilan i arabinogalaktan) u proizvodnu podlogu (Hu i Catchmark, 2010; Gu i Catchmark, 2011, 2012). Hu i Catchmark (2010) primijetili su da se manje čestice slične kugli proizvode pri 150 okr/min. Bile su šuplje te je celulozna ljuska imala slojevitu strukturu. Međutim, pri 125 okr/min proizvedene su veće čestice koje su bile čvrste i imale su slojevitu vanjsku ljusku dok je centralnom području nedostajala ta slojevita struktura. Nedavno su, u istraživanu, Gu i Catchmark (2012) proučavali utjecaj hemiceluloze i pektina na kuglastu strukturu bakterijske celuloze. Primijetili su da celuloza stvorena u prisutnosti ksiloglukana i pektina pokazuje prisutnost gustih celuloznih slojeva i manje povezanih vlakana među slojevima.

2.4. Stupanj kristaliničnosti bakterijske celuloze

Bakterijska celuloza je jedinstvena po svojoj kristaliničnoj strukturi. Ima viši indeks kristalnosti (iznad 60-80%) nego biljna celuloza (El-Saied i sur., 2004; Klemm i sur.; 2005; Methafi i sur., 2010; Vitta i Thiruvengadam, 2012). Ranije, Yoshinaga i sur. (1997) su uočili da je kristaliničnost bakterijske celuloze viša nego biljne celuloze i niža od kristaliničnosti celuloze iz algi. Celuloza se u svom prirodnom obliku može pronaći u dva kristalna oblika, celuloza I i celuloza II (Atalla i Vanderhart, 1984; Brown, 2004; Saxena i Brown, 2005). Ova dva oblika celuloze se raspoznaju pri difrakciji rendgenskih zraka, nuklearnom magnetskom rezonancijom (NMR), Ramanovom spektroskopijom i infracrvenom analizom (Johnson i Neogi, 1989; Bielecki i sur., 2002; El-Saied i sur, 2004). Poznato je da se u metastabilnoj celulozi I, koju sintetizira većina biljaka, također i bakterija *A. xylinum*, postoje paralelni lanci β-1,4-glukana koji su raspoređeni neaksijalno. S druge strane, lanci β-1,4-glukana celuloze II raspoređeni su slučajnim putem. Uglavnom su antiparalelni i povezani većim brojem vodikovih veza što rezultira većom termodinamičkom stabilnošću celuloze II (Brown, 2003). Nativna celuloza I sastoji se od dvije različite kristalne strukture, celuloza Iα i Iβ (Atalla i Vanderhart, 1984; Brown, 2003; Saxena i Brown, 2005). Sadržaj celuloze Iα u bakterijskoj celulozi iznosi približno do 60% što je suprotno biljnoj celulozi (višim biljkama, pamuku i ramiji) gdje je približni udio 30%, a glavni sastavni dio je Iβ celuloza (Atalla i Vanderhart, 1984; Sugiyama i sur., 1991; Yoshinaga i sur., 1997). Prisutnost ovih dviju različitih oblika

celuloze (celuloza Iα i Iβ) u bakterijskoj celulozi može se otkriti korištenjem CP/MAS 13C-NMR (Watanabe i sur., 1998a). Kristaliničnost se općenito smatra glavnom odrednicom svojstava bakterijske celuloze (El-Saied i sur., 2004). Neki znanstvenici objavili su da se kristaliničnost proizvedene bakterijske celuloze razlikuje s promjenom uvjeta uzgoja kultura i sastavom hranjive podloge. Razlika u morfologiji celuloze proizvedene različitim metodama doprinosi razlici u stupnju kristaliničnosti, veličinom kristala i udjelom celuloze Iα (Johnson i Neogi, 1989; Czaja i sur., 2004). Bakterijska celuloza proizvedena u dinamičkim uvjetima kulture ima niži stupanj kristaliničnosti i manju veličinu kristalita nego celuloza proizvedena u statičnim kulturama (Watanabe i sur., 1994,1998a). Također su izvijestili o značajnom udjelu celuloze II koji se pojavio u celulozi sintetiziranoj u tresenoj kulturi. Prema Cazaji i sur. (2004), smanjenje udjela celuloze I u bakterijskoj celulozi proizvedenoj u tresenoj kulturi je u korelaciji s manjim veličinama kristalitamikrofibrila proizvedenim u ovim uvjetima kulture. U prirodi, samo nekoliko organizama (neke alge, plijesni i bakterije, poput *Sarcina ventriculi*) sintetiziraju celulozu II (Jonas i Farah, 1998). U istraživanju, Yu i Atalla (1996) proizveli su celulozu II s *A. xylinum* u prisutnosti 2,6-diklorbenzonitrila. Primijetili su da *A. xylinum* proizvodi celulozu II kao i celulozu I.

Postotak celuloze Iα i Iβ također varira ovisno o sastavu podloge i uvjetima kulture. Celuloza proizvedena u statičkim uvjetima sadrži više celuloze Iα nego celuloza proizvedena u dinamičkim uvjetima (Czaja i sur., 2004). Polimorfni omjer Iα:Iβ iznosi 60:40 za dinamički uzgojene kulture i 70:30 u statičkim kulturama (Sugiyama i sur., 1991). Objavljeno je da razlika u udjelu celuloze Iα u sastavu bakterijske celuloze uzgojene u statičkim i dinamičkim kulturama premašuje stupanj kristaliničnosti (Watanabe i sur., 1998a) i da je maseni udjel celuloze Iα usko povezan s veličinom kristalita.

Nekoliko je istraživača također objavilo kako se kristaliničnost i kristalna struktura bakterijske celuloze može mijenjati dodatkom određenih spojeva u hranjivu podlogu za uzgoj kulture. Hirai i sur. (1998), opažaju da se u Hestrin-Schramm podlozi sintetiziraju zarotirane celulozne vrpce na 28°C bogate celulozom Iα, a kada je karboksil metil celuloza (CMC) dodana u medij, proizvedeni su mikrofibrili bogati Iβ celulozom (Hirai i sur., 1998). U drugom istraživanju, primijetili su da kada se bakterije inkubiraju na 4°C, dvije se vrste nakupina nalik traka ekstrudira okomito na dužu os bakterijskih stanica izgušnjavaju. Ove dvije nakupine se razlikuju u broju celuloznih lanaca, guste nakupine pokazuju strukture nalik celulozi II (Hirai i sur. 2002). Slično tome, Keshk i Sameshima (2005) primijetili su da dodatak 1.0% v/v lignosulfonata rezultira proizvodnjom bakterijske celuloze bogatom Iα celulozom i višim stupnjem krsitaliničnosti. Istraživanje Chenga i sur. (2009) pokazuje da dodatak 1.0% karboksil metil celuloze (CMC) hranjivoj podlozi za uzgoj kulture snižava

kristaliničnost i veličinu kristalitaža bakterijske celuloze. Slično tome, Kim i sur. (2011) navode kako se kristaliničnost bakterijske celuloze proizvedene u prisutnosti hitozana teži smanjenju s 82%(nativna celuloza) na 61%. U nedavnim istraživanjima, Gu i Catchmark (2012) primijetili su pad kristaliničnosti i veličine kristalita te povećani udio Iβ celuloze kod celuloze proizvedene u prisutnosti ksilana i ksiloglukana, što je uobičajeno kod viših biljaka.

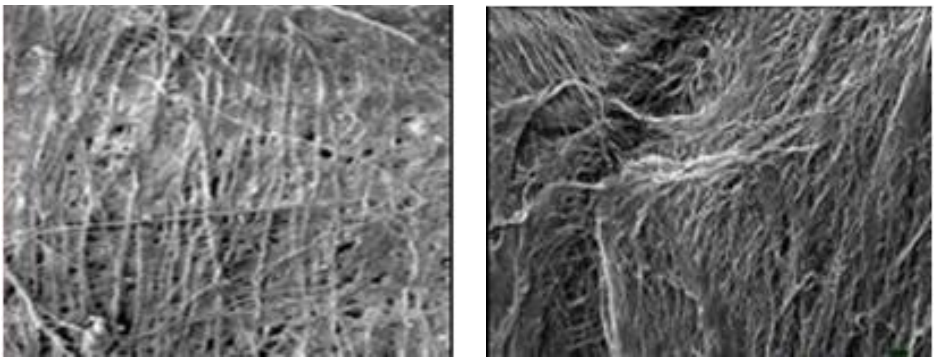
2.5. Kapacitet zadržavanja vode

Bakterijska celuloza ima veći kapacitet zadržavanja vode u odnosu na biljnu celulozu, zadržava ju približno 100 puta više svoje vlastite mase(Gelin i sur., 2007; Chawla i sur., 2009; Cherian i sur., 2013). Prema Dahmanu (2009) „prozračniji" raspored fibrila, velika površina po jedinici mase i hidrofilna priroda bakterijske celuloze rezultira visokim kapacitetom zadržavanja vode. Bakterijska celuloza je membrana koja se nikad ne suši i sadržava 99.1% vode, od čega je 0.3% vezana, a 98.9% slobodna voda (Thompson i Hamilton, 2001). Međutim, prema Gelinu i sur. (2007) većina molekula vode je čvrsto vezana za bakterijsku celulozu, dok se samo 10% od 99.0% vode ponaša kao slobodna voda. Gelovi bakterijske celuloze se ne mogu lako rehidrirati jednom kad izgube vodu. Zbog svoje nepopravljive prirode, gelovi nativne celuloze prozvani su „nikad osušene membrane" (Torres i sur., 2012). Kapacitet zadržavanja vode različitih uzoraka bakterijske celuloze je teško usporediti jer su korištene različite metode određivanja. Sušenje u vakuumu (10 mm H_2O ili 98 Pa) je utvrđeno kao metoda stabilizacije prije određivanja vlažne mase uzorka što je smanjilo standardnu devijaciju mjerenja za 50.0% (Schrecker i Gostomski, 2005). Kapacitet zadržavanja vode bakterijske celuloze, kao i druga svojstva, također variraju s uvjetima uzgoja kulture. Viši je za celulozu proizvedenu u dinamičkim uvjetima u usporedbi s celulozom proizvedenom u statičkim uvjetima (Watanabe i sur., 1998; Krystynowicz i sur., 2002). Izvješteno je kako kapacitet se zadržavanja vode bakterijske celuloze može kontrolirati dodatkom u vodi topljivih polimera u hranjivu podlogu (Brown, 1990; Seifert i sur., 2004). Sadržaj vode u bakterijskoj celulozi (BC) proizvedenoj u prisutnosti karboksimetil celuloze (CMC) i metil celuloze (MC) primjetno je veći u odnosu na standardnu bakterijsku celulozu. Seifert i sur. (2004) su izvijestili da liofilizirana bakterijska celuloza s karboksimetil celulozom (2.0%) sadrži 96% vode, dok standardna liofilizirana bakterijska celuloza sadrži samo 73%. Slično tome, mokra bakterijska celuloza sadržavala je 97,3% vode u prisutnosti 2,0% CMC-a u usporedbi s standardnom bakterijskom celulozom koja je pokazivala

udjelvode od 87,2%. U istraživanju, Ul-Islam i sur. (2011) navode kako dodatak hitozana može poboljšati kapacitet zadržavanja vode bakterijske celuloze. U drugom su istraživanju izvijestili kako se kapacitet zadržavanja vode bakterijske celuloze može kontrolirati modifikacijom i kontrolom poroznosti bakterijske celuloze (Ul-Islam, 2012). Sva dosad navedena svojstva bakterijske celuloze, osim što su ovisna o sastavu medija kulture i uvjetima kulture, također ovise i o mikroorganizmu. U istraživanju, Watanabe i sur. (1998) razvili su mutanta *A. xylinum* BPR 2001 (BPR 3001A) tretiranjem stanica s N-metil N-nitro N-nitrozogvanidinom (NTG) te je primijećeno kako bakterijska celuloza proizvedena ovim mutantom ima uređeniju strukturu, viši stupanj polimerizacije i kristalinizacije i veće kristalite. Također, ima i viši Youngov modul nego roditeljski soj. Slično tome, u istraživanju koji su proveli Toda i sur. (1997) navodi se kako je kapacitet zadržavanja vode celuloze koju je proizvela *A. xylinum* DA dva puta veći nego od celuloze proizvedene od *A. pasteurianus*.

2.6. Biokompatibilnost bakterijske celuloze

Bakterijske celuloza je idealni i obećavajući kandidat za širok raspon medicinskih primjena budući da ima dobru biokompatibilnost (Brown, 1999; Beilecki i sur., 2002; Czaja i sur., 2006; 2007.; Grande i sur., 2009; Wang i sur., 2011; Torres i sur., 2012; Cherian i sur.; 2013). Biokompatibilnost je sposobnost primjene materijala s odgovarajućim odgovorom domaćina u posebnim primjenama (Williams, 1999). Petersen i Gatenholm (2011) su predložili da se biokompatibilnost bakterijske celuloze u primjeni u tkivnom inženjerstvu može povezati s činjenicom da struktura bakterijske celuloze pokazuje sličnosti s izvanstaničnom komponentom matriksa, kolagenom (Slika 5).



kolagen iz ljudske kože bakterijska celuloza

Slika 5. Usporedba vlakana bakterijske celuloze i kolagena (Petersen i Gatenholm, 2011)

Zapravo, nanofibirili kolagena i bakterijske celuloze imaju slične promjere (oko 100 nm) i izvanstanično su sastavljeni iz prekursora molekula u polimerne lance. Bakterijska celuloza je povoljan materijal za tkivno inženjerstvo. Međutim, samo neka istraživanja su dostupna s temom potencijalne toksičnosti bakterijske celuloze. U istraživanju, Helenius i sur. (2006) ugradili su dijelove bakterijske celuloze u štakore ispitujućibiokompatibilnost bakterijske celuloze. Primijetili su da nema histoloških znakova upalnih procesa i prisutnosti divovskih stanica. Promatrano je i stvaranje novih krvnih žila unutar i izvan ugrađene bakterijske celuloze. Slično tome, Mendes i sur. (2009) proučavali su reakciju tkiva nakon subkutalne implantacije membrane bakterijske celuloze kod miševe i nisu pronašli nikakve dokaze reakcije na strano tijelo tijekom perioda proučavanja. Poslije 60-90 dana nakon operacije, nije opažen nijedan upalni infiltrat. Nekolicina istraživača je također promatrala biokompatibilno ponašanje bakterijske celuloze (Klemm i sur., 2001; Schumann i sur., 2009). Ova biokompatibilnost bakterijske celuloze može se povećati imobilizacijom s nekim izvanstaničnim matricama (kolagen, elastin, hijaluron), polipeptidi (želatin), faktori rasta (fibroblasti, ljudski epidermalni faktor rasta, keratinocit), rekombinantni proteini i plazma s dušikom (Luo i sur., 2008.; Andrade i sur., 2012.; Pertile i sur., 2010.; 2012.; Cai i sur., 2011.; Lin i sur., 2011.; Wang i sur., 2012.). Drugi biomaterijali koji se koriste za poboljšanje biokompatibilnostibakterijske celuloze uključuju hitozan (Kim i sur., 2011), škrob (Torres i sur., 2009; Wan i sur., 2009), hidroksiapatit (Wan i sur., 2006; Grande i sur., 2009;Yin i sur., 2011), polivinil alkohol (Millon i sur., 2008), polimetilmetakrilat (Olsson i sur., 2010) i poliakrilamid (Hagiwara i sur., 2010). Biokompatibilnost bakterijske celuloze također se može poboljšati kontroliranjem poroznosti bakterijske celuloze. U istraživanju, porozne molekule poput škroba i parafina su koristili Backdahl i sur. (2008) kako bi kontrolirali veličinu pora i međusobnu povezanost pora u mrežnoj strukturi bakterijske celuloze. Opazili su da su se mišićne stanice inkorporirale unutar pora mrežne strukture bakterijske celuloze.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i metode

3.1.1. Priprava kulture *kombuche*

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

3.2. Hranjiva podloga

3.2.1. Vrsta čaja

Uzgojena *kombucha* (3 % tež/vol) nacijepljena je na Rooibos crveni grm čaj proizvođača AGRISTAR d.o.o., Višnjevac, Hrvatska. Zemlja podrijetla: JAR
Sastojci: 100 % list crvenog grma

3.2.2. Priprava kompleksne podloge (fermentirani čaj)

Infuzije biljnog čaja su pripravljene dodatkom 40 g listića čaja u 1 L kipuće vode u koju je dodano 60, 80 ili 100 g/L saharoze (bijeli konzumni šećer). Nakon ekstrakcije koja je trajala 8 minuta (prema naputku proizvođača), čaj je ohlađen na sobnu temperaturu i filtrirani su čajni listići. Bistri filtrati su preliveni u sterilne Erlenmeyer tikvice od 500 mL korisnog volumena. Nacijepljeni uzorci svježe uzgojenom *kombucha* kulturom su inkubirani pri 25 ^{o}C (sobna temperatura) tijekom 12dana i supernatant je uporabljen za daljnja određivanja.

3.3. Određivanje pH vrijednosti

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

3.4. 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:

$$\rho(CH_3COOH) = V(NaOH) \cdot f(NaOH) \cdot V(podloge) \cdot 6 \quad (1)$$

gdje je:
V(NaOH) = utrošeni volumen 0,1 M NaOH (mL)
f(NaOH) = faktor 0,1 M NaOH (1,000)
Vuzorka = volumen uzorka (1 mL)

3.5. Određivanje koncentracije glukonske kiseline

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

$$\rho(C_6H_{12}O_7) = (V(NaOH) \cdot M(NaOH) \cdot 1,97) / V\text{uzorka} \quad (2)$$

gdje je:
V(NaOH) = utrošeni volumen 0,1 M NaOH (mL)
M(NaOH) = molaritetNaOH (0,1 M)
Vuzorka = volumen uzorka (mL)

3.6. Određivanje alkohola kemijskom metodom

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

Koncentracija (vol %) alkohola je izračunata prema jednadžbi:

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

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

3.7. FT-IR spektroskopija (*eng*. Fourier Transform Infrared Spestroscopy)

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

3.8. Difrakcija rendgrenskim zrakama (*eng.* X RayDiffraction; XRD)

Rendgenska difrakcijska analiza provedena je korištenjem difraktometra Shimadzu XRD 6000 sa CuKα zračenjem. Uzorci su snimljeni u području 2θ 5°–40° s korakom od 0.02°. Veličina kristalita određena je Schrrererovom jednadžbom:

$\cdot(2\Theta) = K \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cos \cdot \Theta$ ...

3.9. Pretražna elektronska mikroskopija (*eng*. Scaning Electron Microscopy; SEM)

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

3.10. Izračunavanje mase i prinosa bakterijske celuloze

Nakon 12 dana fermentacije, plutajući gelovi celulozne biomase, koji su formirani na površini hranjivih podloga su pažljivo izvađeni iz staklenih posuda, oprani demineraliziranom vodom i ostavljeni preko noći u 1M NaOH na sobnoj temperaturi kako bi se uklonile stanice mikroorganizama i sastojci podloga. Nakon toga su gelovi bakterijske celuloze ispirani demineraliziranom vodom sve dok pH vode za ispiranje nije dostigao početnu vrijednost

vode (Toda i sur., 1997). Oprani gelovi su uronjeni u 96 %-tniEtOH tijekom 2 sata, izvagani da bi se izmjerila masa vlažne celulozne biomase, i nakon toga stavljeni na sušenje u suhi sterilizator pri 50 ºC/4 sata. Izmjerena je masa celulozne biomase (g) prema slijedećoj formuli:

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

gdje je:
m_{cb} = masa (vlažne) celulozne biomase (g)
m_{bt} = masa (vlažne) biomase na kraju fermentacije (g)
m_i = masa inokuluma (g)

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

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

3.11. 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 filtar papirom suši na sobnoj temperaturi 48 h (uklanjanje slobodne vode), nakon čega je sušena 12 h pri 105°C u suhom sterilizatoru, kako bi se u potpunosti uklonila vezana voda. Kapacitet zadržavanja vode (WHC) je izračunat prema formuli:

WHC = (masa vode uklonjena tijekom sušenja (g)/suha tvar bakterijske celuloze (g)) (7)

3.12. 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 filtar papirom (Shezad i sur., 2010). Rezultati su prikazani grafički kao odnos mase otpuštene vode u određenom vremenskom periodu.

3.13. Određivanje antimikrobnih svojstava bakterijske celuloze

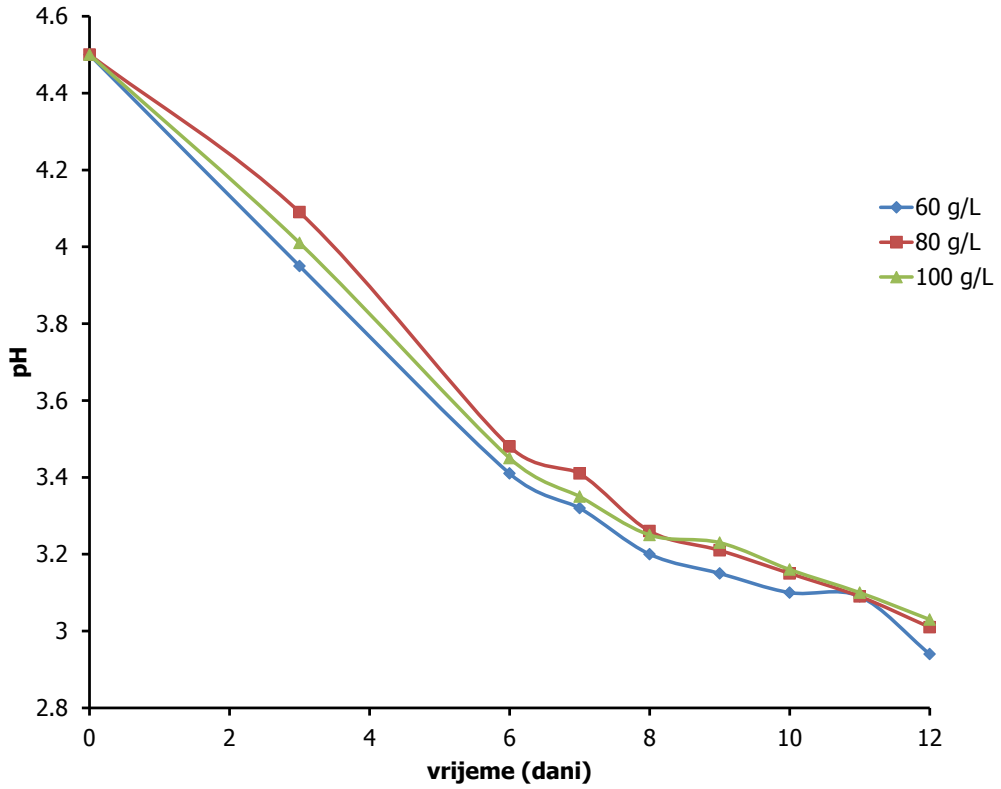
Antimikrobna aktivnost inhibicija rasta odabranih test mikroorganizama *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas* sp. i *Vibrio cholerae* određivana je disk-difuzijskom metodom. Kao test mikroorganizmi korišteni su sojevi bakterijskih kultura iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za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

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

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Promjena pH vrijednosti

Tijekom fermentacije *kombucha* čaja događaju se brojne biokemijske reakcije, a jedna od njih je nastajanje organskih kiselina. Kao rezultat porasta koncentracije organskih kiselina, pH vrijednost pada, tako da je u ovom radu pH vrijednost s početnih 4,5 do kraja istraživanja postupno pala na na vrijednosti između 2.9 i 3.1 (Slika 6). Prema Hwang i sur. (1999), konverzija glukoze u glukonsku kiselinu rezultira značajnim smanjenjem pH vrijednosti tijekom fermentacije. Nadalje, inokulacija majčinske kulture *kombuche*, s niskom pH vrijednošću 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).



Slika 6. Promjena pH vrijednosti tijekom 12 dana uzgoja *kombuche* u čaju crvenog grma.

4.2. Organske kiseline i etanol

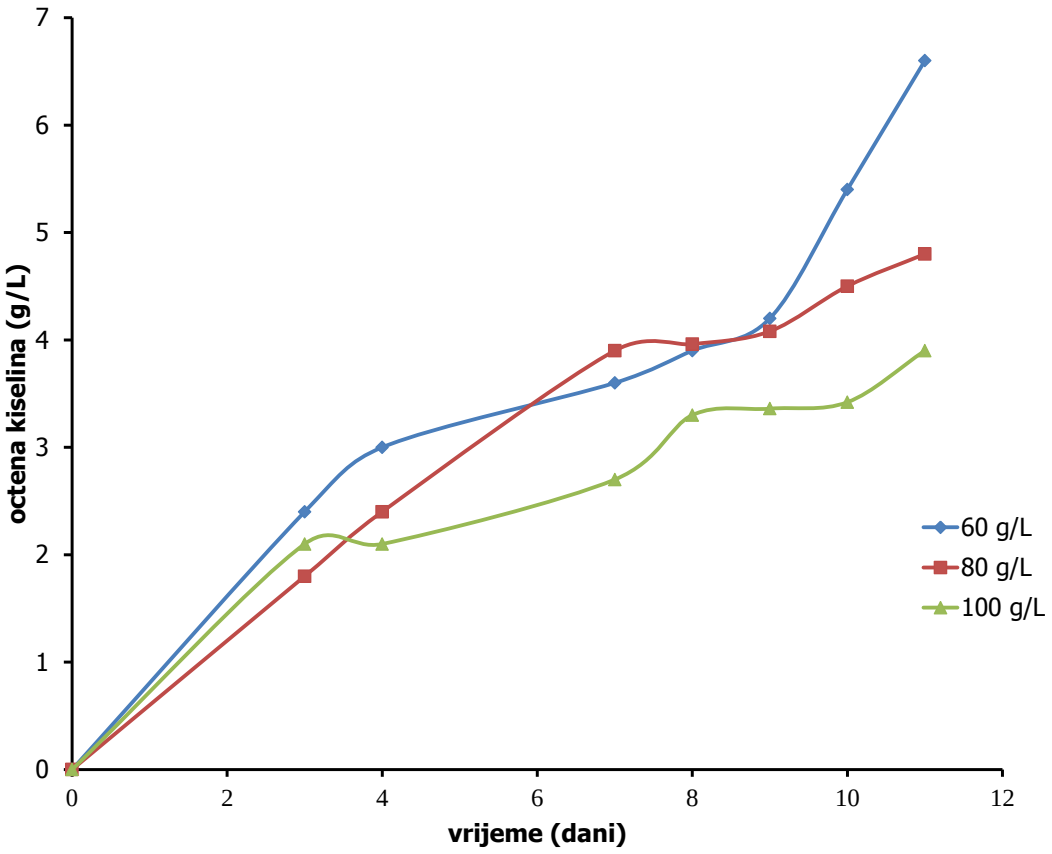
Tijekom fermentacije, bakterije i kvasci metaboliziraju saharozu ili neki drugi izvor ugljika do različitih organskih kiselina, uglavnom octene i glukonske kiseline u većim koncentracijama, te glukuronske, mliječne i limunske, čije koncentracije ne prelaze 1 g/L (Jayabalan i sur., 2007). Kvaščeve stanice 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.

Kinetika nastajanja organskih kiselina tijekom 12 dana fermentacije u čaju crvenog grma prikazana je na Slikama 7 i 8. Najveća koncentracija octene kiseline postignuta je pri 60 g/L dodanog šećera (6.5 g/L). Pri višim koncentracijama šećera u istoj podlozi (80 i 100 g/L), koncentracija octene kiseline je iznosila 5 i 3.5 g/L (Slika 7). Uz sposobnost sinteze relativno visokih koncentracija octene kiseline, bakterije octene kiseline pokazuju i toleranciju na kiselost, koja je rijetka među aerobnim homotrofima i heterotrofima. Ovo im svojstvo omogućava rast na hranjivoj podlozi koja već na početku uzgoja ima pH vrijednost nižu od 4.5 (Malbaša i sur., 2008).

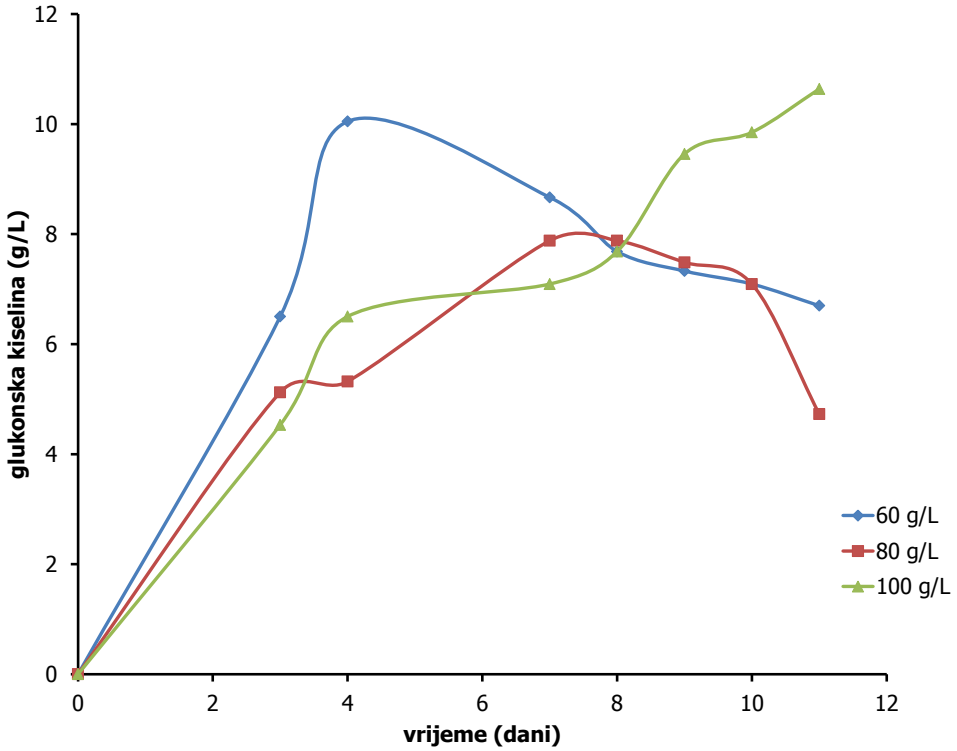
Glukozu bakterije octene kiseline oksidiraju u glukonsku kiselinu. Glukonska kiselina je druga glavna organska kiselina koja nastaje kao posljedica metabolizma *kombuche*. Kao što je vidljivo na Slici 8, koncentracija glukonske kiseline tijekom fermentacije čaja crvenog grma bila je viša od koncentracije octene kiseline, no samo pri koncentraciji od 100 g/L je zabilježen blagi linearni rast tijekom cijelog vremena fermentacije, od 4.2 g/L na početku, do 11,4 g/L na kraju istraživanja (Slika 8). Kod koncentracije šećera od 80 g/L, nakon linearnog rasta koncentracije glukonske kiseline do 9. dana, uslijedio je pad vrijednosti, što je u konačnici rezultiralo najnižom izmjerenom koncentracijom, koja je iznosila 4.2 g/L. I kod koncentracije od 60 g/L uočen je nagli rast koncentracije glukonske kiseline do 5. dana uzgoja (10 g/L), nakon čega je uslijedio pad vrijednosti sve do 6.4 g/L (Slika 8).

Prema većini autora, koncentracija etanola u *kombucha* napitcima nije veća od 1% (vol/vol) (Teoh i sur., 2004). Sievers i sur. (1995) su nakon 10 dana fermentacije izmjerili 0,36 g/L EtOH, uz početnih 70 g/L saharoze u hranjivoj podlozi. Reiss (1995) je ispitivao utjecaje različitih izvora ugljika (saharoza, laktoza, glukoza i fruktoza) na metabolizam *kombuche*, te uočio da koncentracija proizvedenog etanola ovisi o vrsti i količini dodanog šećera. U ovom radu je u čaj crvenog grma dodano 60, 80 i 100 g/L saharoze (konzumni bijeli šećer) i već nakon drugog dana fermentacije, izmjerena je maksimalna koncentracija etanola, 0,95 g/L (80 g/ L šećera), koja se u 5. danu smanjila na 0,6 g/L, a nakon toga je u 7. danu pala na

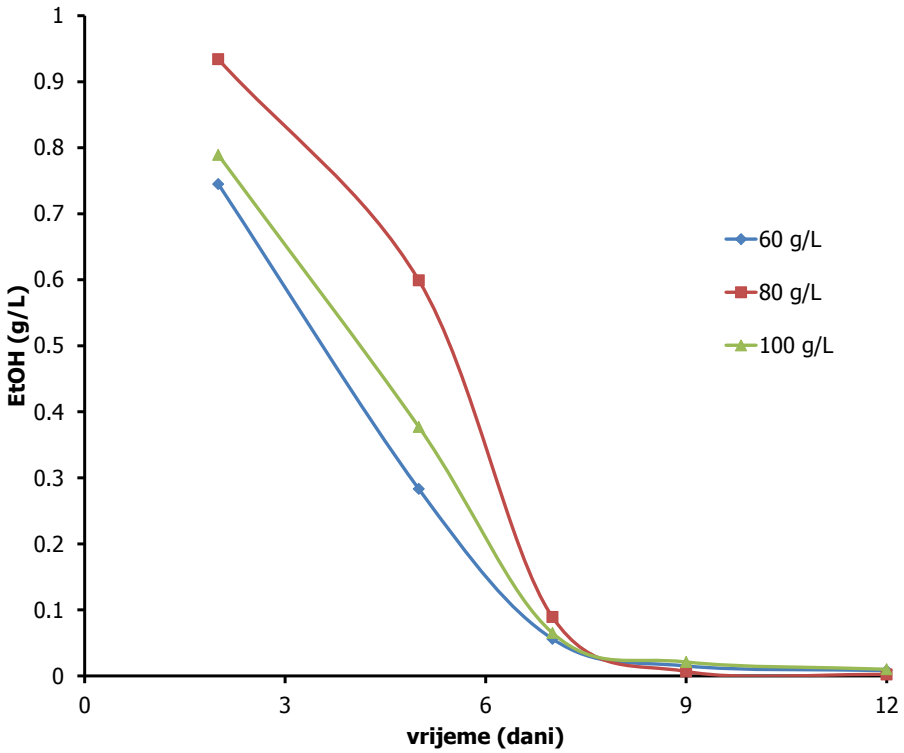
manje od 0,1 g/L, a u 9. danu na manje od 0.01 g/L i nije se mijenjala do kraja fermentacije (Slika 9). Pri koncentracijama od šećera od 60 i 100 g/L uočen je ujednačen usporedni pad vrijednosti etanola od početnih vrijednosti 0.75 i 0.78 g/L do 0.05 g/L u 7. danu, nakon čega su se vrijednosti u potpunosti izjednačile s vrijednostima postignutim pri koncentraciji šećera od 80 g/L (Slika 9).



Slika 7. Kinetika nastajanja octene kiseline tijekom 12 dana uzgoja *kombuche* u čaju crvenog grma.



Slika 8. Kinetika nastajanja glukonske kiseline tijekom 12 dana uzgoja *kombuche* u čaju crvenog grma.



Slika 9. Kinetika potrošnje etanola tijekom 12 dana uzgoja *kombuche* u čaju crvenog grma.

4.3. Sinteza bakterijske celuloze

Jedan od prvih okom vidljivih proizvoda biotransformacije zaslađenog čaja je celulozna opna koja se, svakodnevno, u obliku tankog sloja oblikuje po površini tekućine. Prinos biomase povezan je s izvorom ugljika i koncentracijom tog supstrata u hranjivoj podlozi. U ovom je radu, tijekom fermentacije čaja već nakon 24 h bilo vidljivo stvaranje prozirne opne na površini tekućine, koja je s vremenom fermentacije postala deblja i želatinoznija. Istraživanja Goh i sur. (2012), koji su pratili prinos biomase *kombuche* ovisno o koncentraciji šećera (od 50 do 250 g/L), pokazala su da se prinos biomase povećavao u uzorcima kojima je dodano do 90 g/L šećera (66.7 %), a nakon toga se naglo smanjivao te je pri najvećoj koncentraciji od 250 g/L bio samo 9.9 %. U ovom radu, u čaju kojem je dodano 100 g/L saharoze postignut je najbolji prinos celulozne biomase (120.27 %), no važno je naglasiti da ni pri nižim koncentracijama šećera prinosi nisu bili značajno manji (104.02 i 113.68 %) (Tablica 1).

Tablica 1. Prinos bakterijske celuloze nakon 12 dana uzgoja u čaju crvenog grma.

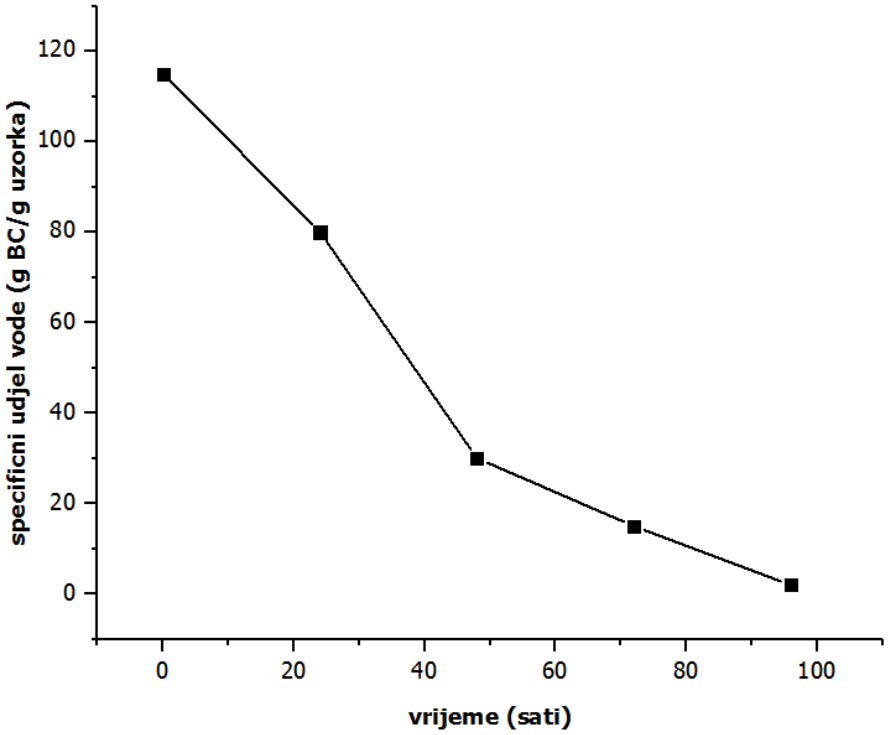
Koncentracija šećera	**··inokuluma (g/L)**	**· celulozne biomase (g/L)**	**Prinos (%)**
60 g/L	12.14	74.55	104.02
80 g/L	12.04	102.98	113.68
100 g/L	11.94	132.21	120.27

4.4. Kapacitet zadržavanja i otpuštanja vode

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).
Varijacije u sposobnosti zadržavanja vode u uzorcima rezultat su njihove razlike u površini i poroznosti strukture. Molekule vode su „zarobljene" fizički i na površini i u unutrašnjosti matriksa bakterijske celuloze koji se sastoji od isprepletenih vlakana (Watanabe i sur., 1998). Što je više slobodnog prostora između vlakana, to će više molekula vode moći ući i

adsorbirati se u matriksu. Dakle, što je veća specifična površina, više vode će se moći zadržati u matriksu bakterijske celuloze (Gu i Catchmark, 2012).

Rezultati istraživanja kapaciteta otpuštanja i zadržavanja vode provedenim u ovom radu prikazani su na Slici 10 i Tablici 2. Na Slici 10 vidljivo je da se specifični udjel vode linearno smanjuje tijekom 96 sati istraživanja, kao i da bakterijska celuloza zadržava skoro 30 % vode u svojoj strukturi nakon 48 sati.



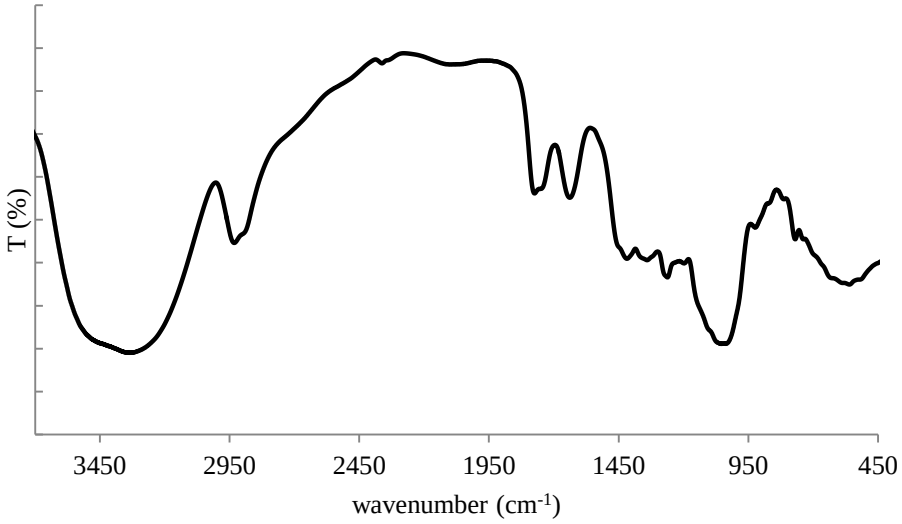
Slika 10. Kinetika otpuštanja vode (WRR) tijekom 96 sati iz uzoraka bakterijske celuloze nakon 12 dana fermentacije u čaju crvenog grma (100 g/L).

Tablica 2. Kapacitet zadržavanja vode bakterijske celuloze.

Uzorak	**Masa vlažne BC (g)**	**Specifična površina BC (cm^2/g)**	**WHC (g vode/g uzorka)**
Crveni grm	205	1,659	116,43

4.5. FT-IR spektroskopska analiza

Kemijska struktura bakterijske celuloze sintetizirane u čaju od crvenog grma je određivana u infracrvenom spektru (IR). Na Slici 11 je vidljivo karakteristično područje istezanja (960 – 730 cm^{-1}), pri čemu pikovi kod 862,54 cm^{-1} mogu potvrditi prisutnost β-1,4-glukozidnih veza.



Slika 11. FT-IR spektar bakterijske celuloze sintetizirane u čaju od crvenog grma (100 g/L).

4.6. Difrakcija rentgenskih zraka

Analiza difrakcijom rendgenskim zrakama napravljena je sa ciljem usporedbe mikrostrukturnih promjena u uzorcima bakterijske celuloze fermentiranim u čaju od crvenog grma s koncentracijom šećera 100 g/L. Cilj je bio provjeriti udjel amorfne i kristalinične strukturu uzorka (Tablica 3, Slika 12).

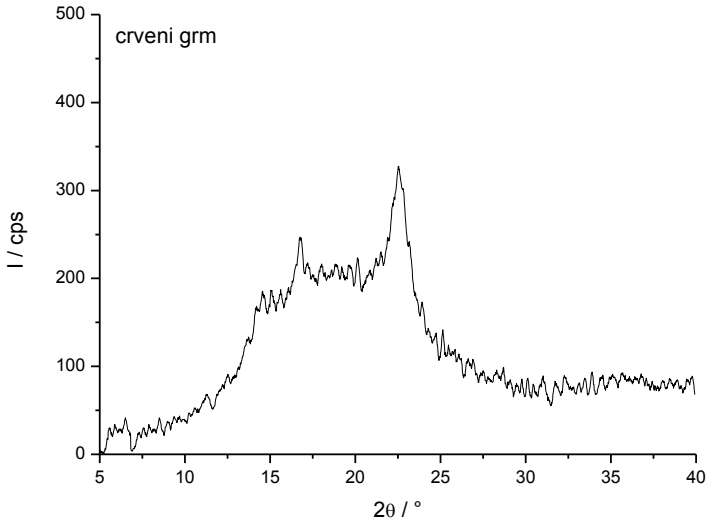
Difrakcija rendgenskim zrakama pokazala je da uzorak bakterijske celuloze iz čaja crvenog grma pokazuje manje ili više izražene difrakcijske maksimume karakteristične za celulozu, te amorfni halo (odstupanje od ravne bazne linije), što pokazuje da je celuloza razmjerno slabo kristalna. Razlike u međuplošnim razmacima pripisuju se promjenama u omjeru I_α i I_β celuloze (Czaja i sur., 2004), no u ovom radu dolazi do primjetne promjene samo u položaju prvog maksimuma. Veličina kristalita određena Scherrerovom formulom je 7 – 9 nm, s iznimkom veličine određene iz srednjeg, najmanjeg maksimuma, kod kojega je i najveća pogreška određivanja zbog djelomičnog preklapanja s prvim maksimumom.

Tablica 3. Kristaliničnost uzoraka bakterijske celuloze uzgojene u čaju od crvenog grma s dodanih 100 g/L šećera

Uzorak	d_1/ Å	d_2/ Å	d_3 / Å	$2\theta_2 - 2\theta_1$ / °	t_1 / nm	t_2 / nm	t_3 / nm
crveni grm	6,03	5,25	3,92	2,20	--	--	8,9

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

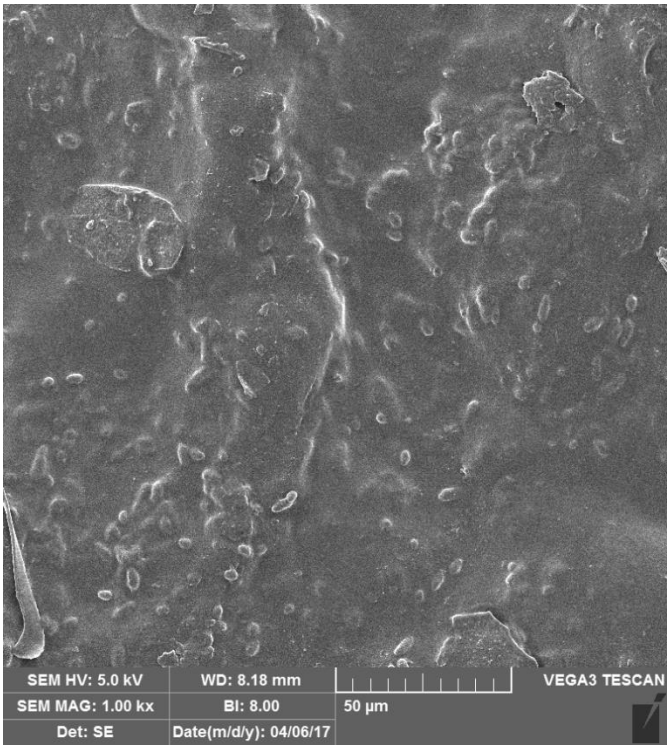
t – veličina kristalita određena Scherrerovom jednadžbom



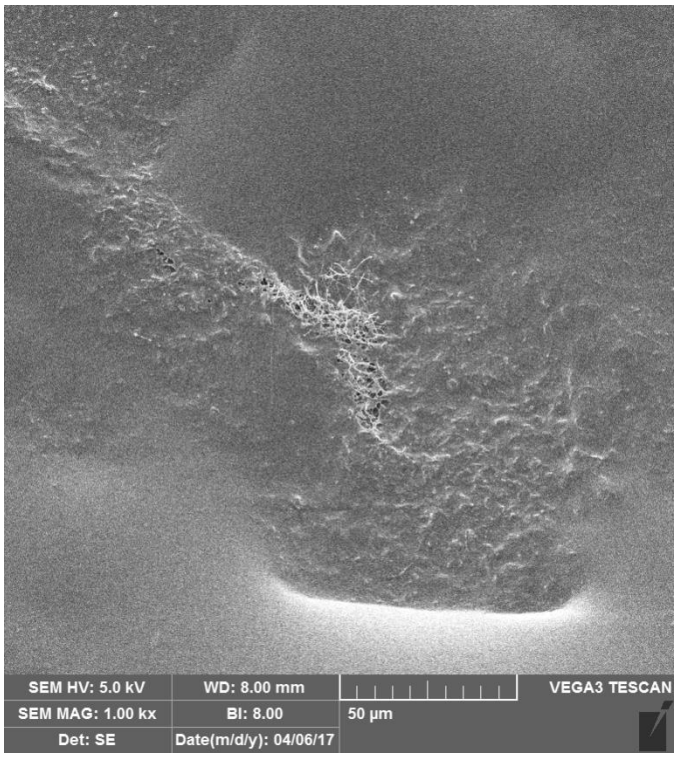
Slika 12. Difraktogram rentgenskih zraka bakterijske celuloze nakon 12 dana uzgoja u čaju od crvenog grma (100 g/L šećera).

4.7. Pretražna elektronska mikroskopija

Površina i struktura mikrovlakana bakterijske celuloze snimane su pretražnim elektronskim mikroskopom (Slike 13 i 14). Na Slici 13 vidljive stanice bakterija i kvasaca na površini pelikule bakterijske celuloze, a na Slici 14 isprepletenost mikrovlakana sintetizirane celuloze.



Slika 13. SEM snimka površine bakterijske celuloze nakon 12 dana uzgoja u čaju od crvenog grma (konc. šećera 100 g/L).



Slika 14. SEM snimka mreže mikrovlakana bakterijske celuloze nakon 12 dana uzgoja u čaju od crvenog grma (konc. šećera 100 g/L).

4.8. Antimikrobno djelovanje

U ovom radu je antimikrobna aktivnost fermentiranih čaja *kombuche* ispitivana sa četiri testna mikroorganizma; bakterije vrsta *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp. i *Vibrio cholerae*. Rezultati prikazani u Tablici 4 ukazuju na izvrsno antimikrobno djelovanje na bakteriju *E. coli* i vrlo dobro djelovanje na *S. typhimurium* i *Pseudomonas* sp., dok su u prisutnosti *V. cholerae* uočene izrazito male i zamućene zone inhibicije. Također je uočeno da je fermentirani čaj od crvenog grma, pripravljen uz dodatak 80 g/L saharoze imao najveće antimikrobno djelovanje (Tablica 4).

Tablica 4. Antimikrobno djelovanje *kombucha* čaja crvenog grma fermentiranog s različitim koncentracijama šećera.

Koncentracija šećera (g/L)	*S. typhimurium*	*E. coli*	*Pseudomonas* sp.	*V. cholerae*
		zone inhibicije (mm)		
60	13	22	14	0*
80	16	30	18	0*
100	13	12	9	0*

*zamućena zona

5. ZAKLJUČCI

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. *Kombucha* je napitak vrlo složenog sastava i visoke nutritivne vrijednosti. 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 (čaj crvenog grma) s dodatkom 60, 80 i 100g/L saharoze kao izvora ugljika.

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

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

5. FT-IR spektroskopskom analizom je dokazana pretežito amorfna struktura bakterijske celuloze uzgojene u čaju crvenog grma pri svim koncentracijama dodanog šećera.

6. Antimikrobna aktivnost ispitivana je mjerenjem zona inhibicije rasta bakterija *S. typhimurium*, *E.coli*, *V. cholerae* i *Pseudomonas* sp. Fermentirani čaj crvenog grma je pokazao izvrsnu antimikrobnu aktivnost prema tri bakterijske kulture, osim *V. cholerae* čiji rast nije bio inhibiran.

6. LITERATURA

Andrade, F.K., Alexandre, N., Amorim, I., Gartner, F., Mauricio, A.C., Luis, A.L. and Gama, M. (2012) Studies on the biocompatibility of bacterial cellulose. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **28**:97–112.

Ashtaputre, A.A., Shah, A.K. (1995) Studies on a viscous, gel-forming exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis* GS1. *Applied and Environmental Microbiology* **61**:1159-1162.

Astley, O.M., Chanliaud, E., Donald, A.M. and Gidley, M.J. (2003) Tensile deformation of bacterial cellulose composites. *International Journal of Biological Macromolecules* **32**:28–35.

Atalla, R.H. and Vanderhart, D.L.(1984) Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms. *Science* **223**:283–285.

Backdahl, H., Esguerra, M., Delbro, D., Risberg, B. and Gatenholm, P.(2008) Engineering microporosity in bacterial cellulose scaffolds. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **2**:320–330.

Bielecki, S., Krystynowicz, A., Turkiewicz, M., Kalinowska, H.(2002) Bacterial cellulose. U: Biopolymers (Polysaccharides I: Polysaccharides from Prokaryotes), 5.izd., Vandamme, J., Baets, S.D., Steinbüchel, A., ur., Wiley-VCH, Verlag, Weinheim, str. 37–90.

Blanc, P.J. (1996) Characterization of the tea fungus metabolites. *Biotechnology Letters* **18**: 139-142.

Brown Jr., R.M.(1999) Cellulose structure and biosynthesis. *Pure and Applied Chemistry* **71**:767–775.

Brown Jr., R.M.(2004) Cellulose Structure and Biosynthesis: What is in Store for the 21st Century*. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **42**:487–494.

Brown Jr., R.M., Willison, J.H.M., Richardson, C.L.(1976) Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: Visualization of the site of synthesis and direct measurement of the *in vivo* process, *Proceedings of National Academy of Sciences USA,* **73***:*4565–4569.

Brown, A.J. (1886) XLIII.—On an acetic ferment which forms cellulose. *Journal of the Chemical Society, Transactions* **49**:432–439.

Brown, E.E. and Laborie, M.P. (2007) Bioengineering bacterial cellulose/poly(ethylene oxide) nanocomposites. *Biomacromolecules* **8**:3074–3081.

Brown, R. M. Jr., Willison, J. H. M. and Richardson, C. L. (1976) Cellulose biosynthesis in Acetobacter xylinum: Visualization of the site of synthesis and direct measurement of the *in vivo* process. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **73**, 4565-4569.

Cai, Z. and Yang, G.(2011) Bacterial cellulose/collagen composite: Characterization and first evaluation of cytocompatibility. *Journal of Applied Polymer Science* **120**: 2938–2944.

Castro, C., Zuluaga, R., Putaux, J-L., Caro, G., Mondragon. I. and Gan´nP˜a. (2011) Structural characterization of bacterial cellulose produced by Gluconacetobacter swingsii sp. from Colombian agroindustrial wastes. *Carbohydrate Polymers* **84**: 96–102.

Chao, Y., Ishida, T., Sugano, Y. and Shoda, M. (2000) Bacterial cellulose production by Acetobacter xylinum in a 50-L internal-loop airlift reactor. *Biotechnology and Bioengineering* **68**:345–352.

Chao, Y., Sugano, Y. and Shoda, M. (2001) Bacterial cellulose production under oxygen-enriched air at different fructose concentrations in a 50-liter, internal-loop airlift reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* **55**:673–679.

Chawla, P.R., Bajaj, I.B., Survase, S.A. and Singhal, R.S.(2009) Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. *Food Technolology and Biotechnology* **47**: 107–124.

Cheng, K.C., Catchmark, J. M. and Demirci, A.(2009) Enhanced production of bacterial cellulose by using a biofilm reactor and its material property analysis. *Journal of Biological Engineering* **3**:12.

Czaja, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S. and Brown Jr., R.J.(2006) Microbial cellulose the natural power to heal wounds. *Biomaterials* **27(2)**: 145–151.

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

Czaja, W.K., Young, D.J., Kawecki, M. and Brown, R.M. (2007) The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules* **8(1)**: 1–12.

Dahman, Y.(2009) Nanostructured biomaterials and biocomposites from bacterial cellulose nanofibers. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **9(9)**:5105–5122.

Dubey, V., Saxena, C., Singh, L., Ramana, K.V. and Chauhan, R.S.(2002) Pervaporation of binary water-ethanol mixtures through bacterial cellulose membrane. *Separation and Purification Technology* **27**:163–171.

Dudman, W.F.(1960) Cellulose production by Acetobacter strains in submerged culture. *Journal of General Microbiology* **22**: 25-39.

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

El-Saied, H., Basta, A.H. and Gobran, R.H.(2004) Research progress in friendly environmental technology for the production of cellulose products (bacterial cellulose and its application). *Polymer-Plastics Technology and Engineering* **43**: 797–820.

Gelin, K., Bodin, A., Gatenholm, P., Mihranyan, A., Edwards, K. and Stromme, M.(2007) Characterization of water in bacterial cellulose. *Polymer* **48(26)**:7623–7631.

de Oliveira Barud, H.G., da Silva, R.R., da Silva Barud, H., Tercjak, A., Gutierrez, J., Lustri, W.R., de Oliveira, O.B., Ribeiro, S.J.L. (2016) A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers* **153**: 406-420.

Goh, W.N., Rosmaa, A., Kaur., B., Fazilah., A., Karim, A.A., Bhat, R. (2012) Fermentationofblackteabroth (Kombucha): I. Effectsofsucroseconcentrationandfermentation time on theyieldofmicrobialcellulose. *InternationalFoodResearchJournal* **19**, 109-117.

Grande, C.J., Torres, F.G. and Gomez, C.M. (2009) Development of Self-Assembled Bacterial Cellulose-Starch Nanocomposites. *Materials Science and Engineering: C* **29(4)**:1098-1104.

Greenwalt, C.J., Ledford, R.A., Steinkraus, K.H. (1998) Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea kombucha. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* **31**:291-296.

Gu, J. and Catchmark, J.M.(2012) Impact of hemicelluloses and pectin on sphere-like bacterial cellulose assembly. *Carbohydrate Polymers* **88**: 547–557.

Gu, J., Catchmark, J.M. (2012) Surface area and porosity of acid hydrolyzed cellulose nanowhickers and cellulose production by *Gluconobacter xylinus. Carbohydrate Polymers* **87**: 1026-1037.

Guhados, G., Wan, W. and Hutter, J.L**.** (2005) Measurement of the elastic modulus of single bacterial cellulose fibers using atomic force microscopy. *Langmuir* **21**: 6642–6646.

Hagiwara, Y., Putra, A., Kakugo, A., Furukawa, H. and Gong, J.P.(2010) Ligament-like tough double-network hydrogel based on bacterial cellulose. *Cellulose* **17**:93–101.

Harris, D.M., Corbin, K., Wang, T., Gutierrez, R., Bertolo, A.L., Petti, C., Smilgies, D.M., Estevez, J.M. et al. (2012) Cellulose microfibril crystallinity is reduced by mutating C-terminal transmembrane region residues CESA1A903V and CESA3T942I of cellulose synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**:4098–4103.

Helenius, G., Backdahl, H., Bodin, A., Nannmark, U., Gatenholm, P. and Risberg, B.(2006) In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. *Jornal of Biomediccal Materials Research* **76A (2)**:431–438.

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

Hirai, A., Tsuji, M. and Horii, F.(1997) Culture conditions producing structure entities composed of Cellulose I and II in bacterial cellulose. *Cellulose* **4**: 239–245.

Hirai, A., Tsuji, M. and Horii, F. (2002) TEM study of band-like cellulose assemblies produced by *Acetobacter xylinum* at 4 °C. *Cellulose* **9**: 105-113.

Hirai, A., Tsuji, M., Yamamoto, H. and Horii, F. (1998) In situ crystallization of bacterial cellulose. III. Influence of different polymeric additives on the formation of microfibrils as revealed by transmission electron microscopy. *Cellulose* **5**: 201-213.

Hu, Y. and Catchmark, J.M.(2010) Formation and characterization of spherelike bacterial cellulose particles produced by Acetobacter xylinum JCM 9730 strain. *Biomacromolecules* **11**:1727–1734.

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

Jonas R. and Farah, L.F.(1998) Production and applications of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability* **59**: 101–106.

Keshk, S. and Sameshima, K.(2005) Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production. *African Journal of Biotechnology* **4**:478–482.

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. *Applied Microbiology and Biotechnology* **72**, 291-296.

Kim, J., Cai, Z., Lee, H.S., Choi, G.S., Lee, D.H. and Jo, C.(2011)Preparation and characterization of bacterial cellulose/Chitosan composite for potential biomedical application. *Journal of Polymer Research* **18**:739–744.

Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.P. and Bohn, A.(2005) Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie International Edition* **44**: 3358–3393.

Klemm, D., Shumann, D., Udhardt, U. and Marsch, S. (2001) Bacterial synthesized cellulose – Artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science* **26**: 1561–1603.

Krystynowicz, A., Czaja, W., Wiktorowska-Jezierska, A., Gonçalves-Mioekiewicz, M., Turkiewicz, M. and Bielecki, S.(2002) Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **29**:189–195.

Kudlicka K.,(1989) Terminal complexes in cellulose synthesis, *Postpy biologii komorki* **16**: 197-212.

Lapuz, M.M., Gallardo, E.G., Palo, M.A. (1967) The nata organism-cultura lrequirements, characteristics and identity. *The Philippine Journal of Science* **96**:91-108.

Lin, S.P., Calvar, I.L., Catchmark, J.M., Liu, J.R., Demirci, A., Cheng, K.C. (2011) Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. *Cellulose* **20**:2191–2219.

Lin, Y.K., Chen, K.H., Ou, K. L. and Liu, M.(2011) Effects of different extracellular matrices and growth factor immobilization on biodegradability and biocompatibility of macroporous bacterial cellulose. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **265**:508–518.

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 Microbiology* **13**:407-415.

Luo, H., Xiong, G., Huang, Y., He, F., Wang, Y. and Wan, Y. (2008) Preparation and characterization of a novel COL/BC composite for potential tissue engineering scaffolds. *Materials Chemistry and Physsics* **110**:193–196.

Malbasa, R., Loncar, E., & Djuric, M. (2008) Comparison of theproducts of Kombucha fermentation on sucrose and molasses.*Food Chemistry* **106**: 1039-1045.

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

Marx-Figini, M. and Pion, B.G.(1974) "Kinetic Investigations on Biosynthesis of Cellulose by *Acetobacter xylinum*", *Biochimica et Biophysica Acta* **338**:382-393.

Mas, A., Torija, M.J., Garcia-Parrilla, M.D.C., Troncoso, A.M. (2014) Acetic acid bacteria and the production and quality of wine vinegar. *Scientific World Journal* **2014**, 1–6.

Mayser, P., Fromme, S., Leitzmann, C., Grunder, K. (1995) The yeast spectrum of the 'tea fungus kombucha'. *Mocoses* **38**:289-295.

Meftahi, A., Khajavi, R., Rashidi, A., Sattari, M., Yazdanshenas, M.E. and Torabi, M. (2009) The effects of cotton gauze coating with microbial cellulose. *Cellulose* **17(1)**: 199–204.

Mendes, P.N., Rahal, S.C., Pereira–Junior, O.C.M., Fabris, V.E., Lenharo, S.L.R. and de Lima–Neto, J. F.(2009) *In vivo* and *in vitro* evaluation of an *Acetobacter xylinum* synthesizedmicrobial cellulose membrane intended for guided tissue repair. *Acta Veterinaria Scandinavica* **51**(12):1-8.

Moon, R.J., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J., Youngblood, J. (2011) Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews* **40**:3941–3994.

Nakagaito, A.N., Iwamoto, S. and Yano, H.(2005) Bacterial cellulose: The ultimate nano-scalar cellulose morphology for the production of high-strength composites. *Applied Physics Materials Science & Processing* **80**:93–97.

Nishijima, M., Tazato, N., Handa, Y., Tomita, J., Kigawa, R., Sano, C., Sugiyama, J. (2013) Gluconacetobacter tumulisoli sp. nov., Gluconacetobacter takamatsuzukensis sp. nov. and Gluconacetobacter aggeris sp. nov., isolated from Takamatsuzuka Tumulus samples before and during the dismantling work in 2007. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**:3981–3988.

Nobles, D.R., Romanovicz, D.K. and Brown, R.M. Jr (2001) Cellulose in cyanobacteria. Origin of vascular plant cellulose synthase? *Plant Physiology* **127**:529–542.

Ohad, I., Danon, I.O. and Hestrin, S.(1962) Synthesis of cellulose by Acetobacter xylinum. V. Ultrastructure of polymer. *The Journal of Cell Biology* **12**: 31–46.

Olsson, R.T., Kraemer, R., Lopez-Rubio, A., Torres-Giner, S., Ocio, M.J. and Lagaron, J.M. (2010) Extraction of microfibrils from bacterial cellulose networks for electrospinning of anisotropic biohybrid fiber yarns. *Macromolecules* **43(9)**:4201-4209.

Oshima, T., Kondo, K., Ohto, K., Inoue, K. and Baba, Y. (2008) Preparation of phosphorylated bacterial cellulose as an adsorbent for metal ions. *Reactive and Functional Polymers* **68**: 376–383.

Pertile, R., Andrade, F.K., Alves, C. and Gama, M.(2010) Surface modification of bacterial cellulose by nitrogen-containing plasma for improved interaction with cells. *Carbohydrate Polymers* **82**:692–698.

Pertile, R., Moreira, S., Andrade, F., Domingues, L. and Gama, M.(2012) Bacterial cellulose modified using recombinant proteins to improve neuronal and mesenchymal cell adhesion. *Biotechnology Progress* **28**: 526–532.

Petersen, N. and Gatenholm, P.(2011) Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* **91(5)**:1277–1286.

Phisalaphong, M., Jatupaiboon, N. (2008) Biosynthesis and characterization of bacteria cellulose–chitosan film. *Carbohydrate Polymers* **78**:482-488.

Ross, P., Mayer, R. and Benziman, M. (1991) Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological Reviews* **55**:35–58.

Ruka, D.R., Simon, G.P. and Dean, K.M. (2013) In situ modifications to bacterial cellulose with the water insoluble polymer poly-3-hydroxybutyrate. *Carbohydrate Polymers* **92**:1717–1723.

Ruka, D.R., Simon, G.P., Dean, K.M. (2012) Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers* **89**:613-622.

Saxena, I.M. and Brown, R.M.(2005) Cellulose biosynthesis current views and evolving concepts. *Annals of Bot*any **96**: 9–21.

Schrecker, S. and Gostomski, P.(2005) Determining the water holding capacity of microbial cellulose. *Biotechnology Letters* **27**:1435–1438.

Schumann, D.A., Wippermann, J., Klemm, D.O., Kramer, F., Koth, D., Kosmehl, H., Wahlers, T. and Salehi-Gelani, S.(2009) Artificial vascular implants from bacterial cellulose: preliminaryresults of small arterial substitutes. *Cellulose* **16**:877–885.

Seifert, M., Hesse, S., Kabrelian, V. and Klemm, D.(2004) Controlling the water content of never dried and reswollen bacterial cellulose by the addition of water soluble polymers to the culture medium. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **42**:463-470.

Shah, N., Ul-Islam, M., Khattak, W.A. and Park, J.K. (2013) Overview of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material. *Carbohydrate Polymers* **98**:1585–1598.

Sheykhnazari, S., Tabarsa, T., Ashori, A., Shakeri, A., Golalipour, M. (2011) Bacterial synthesized cellulose nanofibers. Effects of growth times and culture mediums on the structural characteristics. *Carbohydrate Polymers* **86**:1187-1191.

Shi, Z., Zhang, Y., Phillips, G.O. and Yang, G. (2014) Utilization of bacterial cellulose in food. *Food Hydrocolloids* **35**:539–545.

Teoh, A.L., Heard, G., Cox, J. (2004) Yeast ecology of kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology* **95**:119-126.

Thompson, D.N. and Hamilton, M.A.(2001) Production of bacterial cellulose from alternate feedstocks. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **91–93**:503–513.

Toda, K., Asakura, T., Fukaya M., Entani, E. and Kawamura, Y.(1997) Cellulose production by acetic acid-resistant *Acetobacter xylinum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **84**:228–231.

Torres, F., Commeaux, S. and Troncoso, O.(2012a) Biocompatibility of Bacterial Cellulose Based Biomaterials. *Journal of Functional Biomaterials* **3(4)**:864–878.

Torres, F.G., Troncoso, O.P., Lopez, D., Grande, C. and Gomez, C.M.(2009) Reversible stress softening and stress recovery of cellulose networks. *Soft Matter* **5**: 4185–4190.

Ul-Islam, M., Khan, T. and Park, J.K.(2012) Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification. *Carbohydrate Polymers* **88**:596–603.

Ul-Islam, M., Shah, N., Ha, J.H. and Park, J.K.(2011) Effect of chitosan penetration on physicochemical and mechanical properties of bacterial cellulose. *Korean Journal of Chemical Engineering* **28**:1736–1743.

Ullah, H., Wahid, F., Santos, H.A., Khan, T. (2016) Advances in biomedical and pharmaceutical applications of functional bacterial cellulose-based nanocomposites. *Carbohydrate Polymers* **150**: 330-352.

Vandamme, E.J., De Baets, S., Vanbaelen, A., Joris, K. and De Wulf, P. (1998) Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polymer Degradation and Stability* **59**: 93–99.

Vitta, S. and Thiruvengadam, V.(2012) Multifunctional bacterial cellulose and nanoparticle embedded composites. *Current Science* **102(10)**: 1398-1405.

Wan, Y., Hong, L., Jia, S., Huang, Y., Zhu, Y., Wang, Y. and Jiang, H.(2006) Synthesis and characterization of hydroxyapatite–bacterial cellulose nanocomposites. *Composites Science and Technology* **66**:1825–1832.

Wan, Y.Z., Gao, C., Luo, H.L., He, F., Liang, H., Li, X.L. and Wang, Y.L.(2009). Early growth of Nano-Sized calcium phosphate on phosphorylated bacterial cellulose nanofibers. *Journal of Nanoscience andNanotechnology* **9**:6494–6500.

Wang, J., Wan, Y.Z., Luo, H.L., Gao, C. and Huang, Y.(2012) Immobilization of gelatin on bacterial cellulose nanofibers surface via crosslinking technique. *Materials Science and Engineering:C* **32**:536–541.

Wang, J., Zhu, Y. and Du, J. (2011)Bacterial cellulose: a natural nanomaterial for biomedical applications. *Journal of Mechanics in Medicine and Biology* **11(02)**:285–306.

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

Williams, D.F.(1999) The Williams Dictionary of Biomaterials; Liverpool University Press: Liverpool, UK.

Yadav, V., Sun, L., Panilaitis, B. and Kaplan, D.L. (2013) In vitro chondrogenesis with lysozyme susceptible bacterial cellulose as a scaffold. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **2013**:1644.

Yamada, Y. (2014) Transfer of Gluconacetobacter kakiaceti, Gluconacetobacter medellinensis and Gluconacetobacter maltaceti to the genus Komagataeibacter as Komagataeibacter kakiaceti comb. nov., Komagataeibacter medellinensis comb. nov. and Komagataeibacter maltaceti comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**:1670–1672.

Yamada, Y., Hoshino, K., Ishikawa, T. (1997) The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: The elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **6**:1244-1251.

Yamamoto, H., Horii, F. and Hirai, A. (1996) In situ crystallization of bacterial cellulose II. Influences of different polymeric additives on the formation of celluloses Ia and Ib at the early stage of incubation.*Cellulose* **3**, 229–242.

Yamanaka, S. and Ishihara, M.(2000) Structural modification of bacterial cellulose. *Cellulose* **7**: 213–225.

Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, M., Iguchi, M., Mitsuhashi, S., Nishi, Y. and Uryr, M (1989) The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose.*Journal of Materials Science* **24**: 3141-3145.

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

Yin, N., Chen, S.Y., Ouyang, Y., Tang, L., Yang, J.X. and Wang, H. P.(2011) Biomimetic mineralization synthesis of hydroxyapatite bacterial cellulose nanocomposites. *Progress in Natural Science:Materials International* **21**:472–477.

Yoshinaga, F., Tonouchi, N. and Watanabe, K.(1997) Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its application as a new industrial material. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **61**:219–224.

Yu, X. and Atalla, R.H.(1996) Production of cellulose II by *Acetobacter xylinum* in the presence of 2,6-dichlorobenzonitrile. *International Journal of Biological Macromolecules* **19**:145–146.

Zaar, K. (1977) The biogenesis of cellulose by *Acetobacter Xylinum*. *European Journal of Cell Biology* **16**: 1-15.

Zheng, Y., Yang, J., Zheng, W., Wang, X., Xiang, C., Tang, L., Zhang, W., Chen, S. i sur. (2013) Synthesis of flexible magnetic nanohybrid based on bacterial cellulose under ultrasonic irradiation. *Materials Science and Engineering: C Materials for Biological Applications* **33**:2407–2412.

Zhu, C., Li, F., Zhou, X., Lin, L. and Zhang, T. (2013) Kombucha-synthesized bacterial cellulose: preparation, characterization, and biocompatibility evaluation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **102A**:1548–1557.

Zhu, H., Jia, S., Wan, T., Jia, Y., Yang, H., Li, J., Yan, L. and Zhong, C. (2011) Biosynthesis of spherical Fe_3O_4 bacterial cellulose nanocomposites as adsorbents for heavy metal ions. *Carbohydrate Polymers* **86**:1558–1564.

Izjava o izvornosti

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

Ivana Hranić

ime i prezime studenta