Biotrensformacija kombucha napitka od soka ananasa

Čondić Galiničić, Kristina

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:159:984298

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**

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

Kristina Čondić-Galiničić
6724/BT

BIOTRANSFORMACIJA *KOMBUCHA* NAPITKA OD SOKA ANANASA

ZAVRŠNI RAD

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

Zagreb, 2017.

Ovaj rad izrađen je 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: Biotehnologija

BIOTRANSFORMACIJA *KOMBUCHA* NAPITKA OD SOKA ANANASA

Kristina Čondić-Galinčić, 6724/BT

Sažetak: *Kombucha* kao fermentirano piće konzumira se dugi niz godina širom cijelog svijeta zbog svojih profilaktičkih i terapeutskih svojstava. U ovom radu praćena je fermentacija soka od ananasa nacijepljenog s *kombuchom* te zaslađenog s 80, 100, 120 i 140 g/L saharoze, tijekom 10 dana na temperaturi od 25°C u aerobnim i anaerobnim uvjetima.Promjene pH vezane su uz metaboličke aktivnosti simbiotski združene kulture kvasca i bakterija octene kiseline. Praćena je i proizvodnja organskih kiselina (octene i glukonske), etanola i bakterijske celuloze. Najveći prinos bakterijske celuloze dobiven je pri koncentarciji 80 g/L saharoze (140 g/L). Debljina sloja i prinos bakterijske celuloze dobivene u aerobnim i anaerobnim uvjetima povećava se s vremenom.

Ključne riječi: *kombucha,* organske kiseline, bakterijska celuloza
Rad sadrži: 36 stranica, 18 slika, 1 tablica, 70literaturnih navoda,
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: *Izv. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan*

Datum obrane: 17. srpanja 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate studyBiotechnology

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

BIOTRANSFORMATION OF *KOMBUCHA* BEVERAGE PRODUCED WITH ANANAS JUICE

Kristina Čondić-Galiničić, 6724/BT

Abstract: *Kombucha* fermented beverage has been intensively consumed during a long time worldwide for its prophylactic and therapeutic properties. In this present study, the pineapple juice sweetened with 80, 100, 120 and 140 g/L sucrose were fermented in aerobic and anaerobic conditions naturally at 25 °C with *kombucha* over a period up to 10 days. Changes in pH were related to the symbiotic metabolic activities of yeasts and acetic acid bacteria. The production of organic acids (acetic and gluconic), ethanol and BC was studied. The highest BC production was obtained using 80 g/L sucrose (140 g/l). The thickness and yield of bacterial cellulose obtained in both aerobic and anaerobic conditions increased with fermentation time.

Keywords: *Kombucha,* organic acids, bacterial cellulose
Thesis contains: 36 pages, 18 figures, 1 table, 70 references
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 17th2017

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 2

2.1. Bakterijska celuloza 2

2.2. Bakterijska proizvodnja celuloze 4

2.3. Biosinteza bakterijske celuloze 5

2.4. Svojstva bakterijske celuloze 6

2.5. Metode uzgoja 8

2.6. Formiranje mikrofibrila 9

2.7. Formiranje gela 11

3. MATERIJALI I METODE 12

3.1. Priprava kulture *kombuche* 13

3.2. Upotrebljena vrsta soka 13

3.3. Aerobni i anaerobni uzgoj 13

3.4. Određivanje pH vrijednosti 14

3.5. Određivanje koncentracije octene kiseline 14

3.6. Određivanje koncentracije glukonske kiseline 15

3.7. Određivanje alkohola kemijskom metodom 15

3.8. Izračunavanje mase i prinosa celulozne biomase *kombuche* 16

4. REZULTATI I RASPRAVA 18

4.1. Aerobni uzgoj 18

4.2. Anaerobni uzgoj 21

5. ZAKLJUČCI 29

6. POPIS LITERATURE 30

1. UVOD

Celuloza je najzastupljeniji biopolimer na zemlji s godišnjom proizvodnjom od $1,5 \cdot 10^{12}$ tona (Czaja i sur., 2004; Klemm i sur., 2005) i uglavnom se dobiva obradom biljne biomase (Siró i Plackett, 2010).

Kombucha je napitak dobiven biotransformacijom saharozom zaslađenetekućine 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 tekućine (Chen i Liu, 2000). Ishodište mu je u Kini, no *kombucha*se na tradicionalni način proizvodi u mnogim kućanstvima, uključujući i Europu, sjevernu Ameriku i sjevernu Afriku.*Kombucha* u Hrvatskoj još uvijek nije prepoznati napitak kojem se pristupa s „blagim ili potpunim nepovjerenjem". Ovaj napitak se konzumira u mnogim državama stoljećima, no interes za njim raste zbog mnogih znanstvenih studija koje ukazuju na to kako utječe na poboljšanje zdravlja i sprječavanje kroničnih bolesti.

Tijekom fermentacije, bakterije i kvasci metaboliziraju saharozu ili neki drugi izvor ugljika do različitih organskih kiselina, uglavnom octene i glukonske. 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).

Cilj ovog rada bio je istražiti biokemijske promjene koje se zbivaju tijekom biotransformacije simbiotički združene kulture bakterija octene kiseline i kvasaca (*kombucha*) tijekom 10 dana uzgoja u kompleksnoj podlozi (sok od ananasa) u aerobnim i anaerobnim uvjetima s različitim koncentracijama saharoze (80, 100, 120 i 140 g/L).

Tijekom fermentacija praćeni su i određivani sljedeći parametri:

- promjena pH vrijednosti, koncentracije etanola, octene i glukonske kiseline u aerobnim i anaerobnim uvjetima
- prinos bakterijske celuloze *kombuche* na kraju aerobnog uzgoja i anaerobnog procesa fermentacije

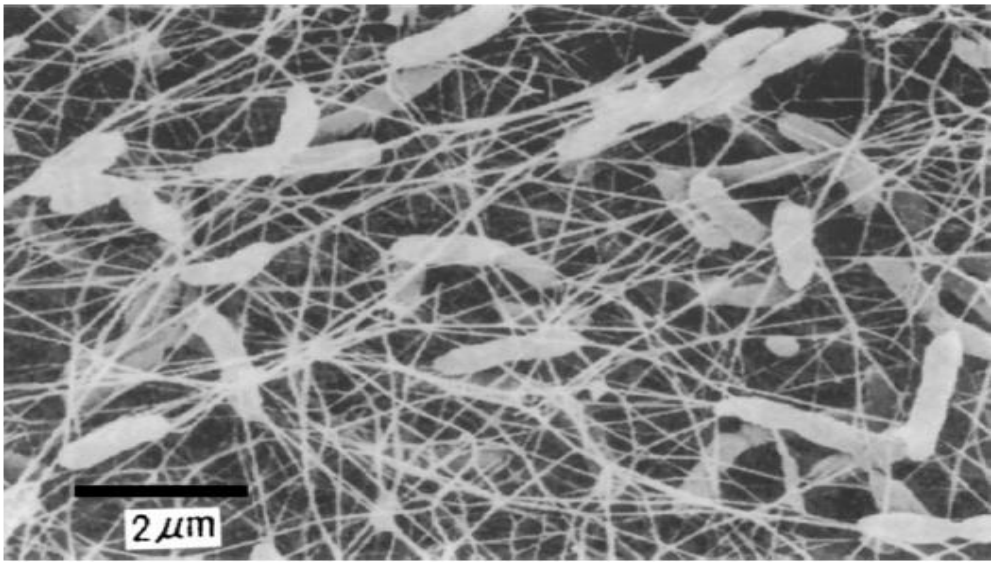
2. TEORIJSKI DIO

2.1. Bakterijska celuloza

Iako je celulozu početkom prošlog stoljeća Anselme Payen definirao kao čvrstu strukturu, odnosno glavni sastojak stanične stijenke viših biljaka (Nevell i Zeronian, 1995), bakterijsku celulozu kao ekstracelularni proizvod bakterija octene kiseline Louis Pasteur opisuje kao „vlažnu, natečenu, želatinoznu i sklisku strukturu".Premda na čvrsti dio u gelu otpada manje od jedan posto, bakterijska celuloza sadržava gotovo potpuno čistu celulozu bez kontaminacije ligninom, hemicelulozom, pektinom i inulinom. Bakterijska celuloza koristi se već dugi niz godina u proizvodnji *nata-de-coco*, autohtonog filipinskog deserta.Za pripremu takvog deserta gel debljine jedan centimetar fermentira u kokosovoj vodi, nakon fermentacije reže se na kockice i uranja u šećerni sirup. Slična hrana može se pripremiti od različitih voćnih sokova kao što je *nata-de-pina* od ananasa. U prošlosti se smatralo da je glavna komponenta u *nata-de-coco* gelu zapravo dekstran i tek 1960-ih otkrili su da se radi o celulozi (Lapas i sur., 1967).*Nata-de-coco* danas se proizvodi u velikim količinama na razini domaće proizvodnje u zemljama kao što je Indonezija, te se izvozi i prodaje kao zdrava namirnica. *Teekvass* (čajna-gljiva) priprema se na sličan način, fermentira u šalicama za čaj, te se konzumira u podjedinim dijelovima Rusije i srednje Azije. Znanstvenom napretku potpomogao je Brown (Brown, 1986a; Brown 1986b) koji je izolirao i identificirao tvar koja se od davnina u Europi koristi za proizvodnju octa poznata kao "vinegar plant". Iako su tadašnji mikroskopi davali sliku bakterija ugrađenih u površinski, proziran i nestrukturiran sloj, identifikacijom je zaključeno da je taj sloj po kemijskom sastavu i aktivnosti isti kao celuloza koja je sastavni dio stanične stijenke biljaka. Ranijih godina ovog stoljeća počinje se upotrebljavati metoda temeljena na rengenskoj difrakciji kojom je otkriveno da bakterijska celuloza kristalografski pripada skupini celuloza zajedno s celulozom biljnog podrijetla. Građena je od dvije podjedinice celobioze postavljene paralelno u jediničnoj molekuli. Molekule celuloze u suhom filmu imaju tendenciju zauzimanja točno određene orijentacije u prostoru (Mark i Susich, 1929). Ranijih dana proučavana je i promjena orijentacije tijekom procesa sušenja (Sisson, 1936). Nakon otkrića elektronskog mikroskopa proučavana je gel celuloza s povećanim udjelom vode te je otkriveno da se radi o nasumično posloženim mikrofibrilima promjera manjeg od 100Å . Elektonski mikrogram liofilizirane površine bakterijske celuloze prikazan je na Slici 1, dok celuloza iz stanične stijenke ima mnogo kompleksniju strukturu.

Slika 1. SEM snimka sinteze celuloznog vlakna bakterije *Komagataeibacter xylinus* (Hirai sur., 2002)

Na Slici 2 prikazana je struktura fibrila bakterijske celuloze u kojima je vidljiva prisutnost bakterijskih stanica i stanica kvasca u gelu.



Slika 2. SEM snimka bakterijske celuloze (Iguchi i sur., 2000)

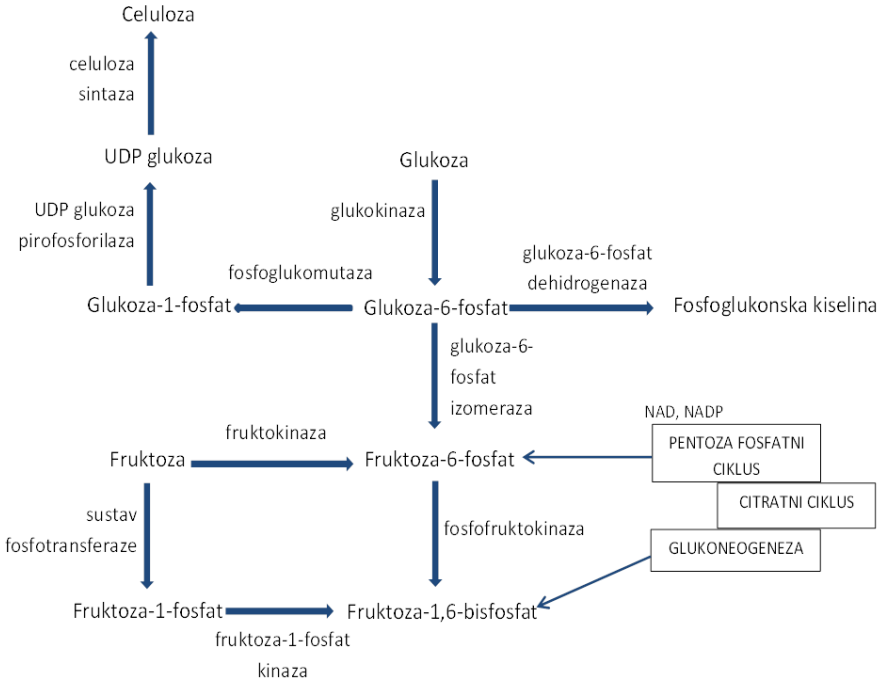
U doba kada započinje proizvodnja umjetne svile tako orijentirana struktura postaje idealno vlakno za predenje. Otkrićem strukturne građe markromolekula u posljednjih nekoliko desetljeća mnogo se truda uložilo u razvoj super-jakih vlakana. Prema Brown-u(Brown, 1986a;Brown, 1986b) pelikula bakterijske celuloze je vrlo kruta pogotovo ukoliko ju pokušamo razdvojiti u smjeru njenog rasta. Mnogi autori proučavali su stukturu peleta međutim nitko nije pridavao pažnju fizikalnim svojstvima sve do sredine 80-ih godina prošlog stoljeće kada započinju analize deformacije i naprezanja materijala(Yamanaka i sur., 1989; Nishi i sur., 1990). Young-ov modul je izrazito visok obzirom da se radi o dvodimenzionalnom organskom materijalu, a za ovaj izotropni materijal iznosi 16–18 GPa, kasnije je unaprijeđen čak do 30 GPa.Bakterijska celuloza pronašla je primjenu u pripremi pulpe za proizvodnju papira. Različita je primjena ovih materijala, a između ostalog koristi se kao materijal za izradu akustičnih membrana u hi-fi zvučnicima i slušalicama. Interes za bakterijskom celulozom naglo je porastao u posljednjem desetljeću.

2.2. Bakterijska proizvodnja celuloze

Bakterijska vrsta koja proizvodi celulozu je *Acetobacter xylinum,* iako se u literaturi često mogu pronaći i druge bakterijske vrste. "Vinegar-plant bacterium" ili bakterije octene biljke kako ju je nazivao Brown može se izolirati i iz pelikula koje se pojavljuju na površini piva. Takva vrsta bakterije u prirodi je pronađena na trulom voću i povrću, te je o njoj izvješteno u više od trideset slučajeva (Jesus i sur., 1971). Razlog zašto mikroorganizmi sintetiziraju celulozu pitanje je za mikrobiologe. Smatra se da aerobne bakterije proizvode pelikule kako bi zadržale tekućinu na svoj površini (Schramm i Hestrin, 1954; Valla i Kjosbakken, 1982).Druga pretpostavka je da bakterijske stanice proizvode celulozu kako bi se zaštitile od ultraljubičastog zračenja (William i Cannon, 1989). Autori preferiraju pretpostavku da su bakterijske stanice konstruirale tzv. kavez kako bi se zaštitile od neprijatelja i iona teških metala, a da istovremeno hranjive tvari mogu lako difundirati u stanicu.

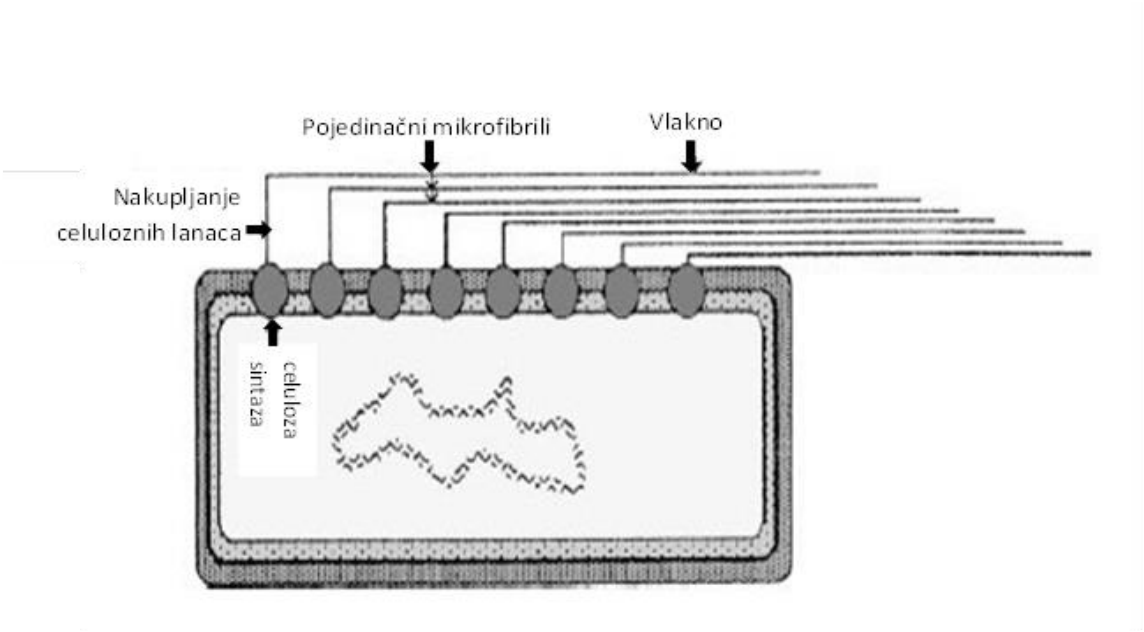
2.3. Biosinteza bakterijske celuloze

Sinteza bakterijske celuloze uključuje veliki broj koraka uz prisutnost velikog broja enzima. Međuprodukt sinteze je uridin difosfoglukoza (UDPG) koja je ujedno i prekursor u formiranju celuloze (Brown i sur., 1987). Molekule UDPG-a polimeriziraju vežući se β-1-4-glukanskim vezama formirajući tako celulozu u obliku vlakna. Takav oblik može sadržavati stotinu do tisuću pojedinačnih lanaca celuloze (Delmer i sur., 1995). U *A. xylinum* sinteza celuloze je povezana s kataboličkim procesom oksidacije i koristi 10% energije dobivene kataboličkim reakcijama (Amor i sur., 1995). *A. xylinum* konvertira različite ugljikove spojeve poput heksoza, glicerola, glukoze i melase u celulozu (Bielecki i sur., 2005). Biokemijski put sinteze celuloze kod *Acetobacter xylinum* prikazan je na Slici 3. Sinteza celuloze kod vrste *Acetobacter xylinum*, ali i kod svih ostali odvija se u dva koraka. Prvi korak je formiranje β-1-4-glukanskih lanaca polimerizacijom glukoznih jednica, drugi korak je formiranje i kristalizacija celuloznih lanaca (Lin i sur., 1985). Brzina polimerizacije ograničena je brzinom formiranja i kristalizacijom celuloznih lanaca. Celuloza sintaza katalizira biosintezu celuloze povezujući glukozne jedinice β-1-4-glukanskim vezama (Valla i sur., 1989).



Slika 3. Biokemijski put sinteze celuloze u *A. xylinum* (Saxena i sur., 2000)

Oblikovanje celuloznih fibrila prilkazano je na Slici 4. Zabilježene su dvije hipoteze mehanizma biosinteze u *A. xylinum.* Prva hipoteza pretpostavlja da polimerizacija β-1-4-glukanskih lanaca ne uključuje lipidni intermedijer (Delmer i sur., 2000). Glukozni ostaci vežu se na nereducirajući kraj polisaharida, a početni reducirajući kraj udaljava se od stanice (Yamanaka i sur., 1993). Druga hipoteza biosinteze celuloze uključuje lipidni intermedijer (Benziman i sur., 1989). Dokazana je prisutnost 12 lipidnih intermedijera u sintezi acetana, topljivog polisaharida. Tijekom sinteze polimera ne proizvodi se lipidna komponenta (Klemm, 2003).



Slika 4. Shematski prikaz biogeneze bakterijske celuloze uz formiranje fibrila (Klemm i sur., 2001)

2.4. Svojstva bakterijske celuloze

Celulozi koji proizvode bakterijskestanice popularnost raste od otkrića (1886. godine) zbog njenih posebnih svojstava kao što su visoka čistoća, fina i visoko kristalna strukturna mreža, nadmoćna mehanička čvrstoća, biorazgradivost, biokompatibilnost, veliki kapacitet zadržavanja vode i dobra kemijska stabilnost (Santos i sur., 2015; Shah i sur., 2013). Zbog tih svojstava

bakterijska celuloza kao materijal pronalazi višestruku primjenu (Iguchi i sur., 2000). Bakterijska celuloza koristi se za postizanje dodatne čvstoće polimernih materijala i papira (Miao i Hamad, 2013; Zimmermann i sur., 2010), kao sredstvo za zgušnjavanje i stabilizator hrane (Shi i sur., 2014), u pakiranju hrane (Spence i sur., 2010), kao biomaterijal u kozmetičkoj industriji (Kawaguchi i Nakamura, 2007), u proizvodnji umjetne kože (Fu i sur., 2013; Kingkaew i sur., 2014), za umjetne krvne žile i tkivno inženjerstvo (Gao i sur., 2012; Klemm i sur., 2001; Ramani i Sastry, 2014; Scherner i sur., 2014), u dijafragmama za zvučnike (Ciechanska i sur., 2002; Nishi i sur., 1990), kao transparentni film (Palaninathan i sur., 2014), u električnim vodičima (Muller i sur., 2012; Yoon i sur., 2006) ili kao magnetski materijali (Charreau i sur., 2013; Santos i sur., 2015; Zhang i sur., 2011). Bakterijsku celulozu prvi je opisao Brown (1886.) kada je na površni fermentiranog octa pronašao želatinoznu čvrstu membranu. Taj soj nazvan je *A. xylinus,* međutim i druge bakterijske vrste imaju sposobnost sinteze celuloze kao što su *Acetobacterium*(Barnhart i sur., 2013; Matthysse i sur., 2005), *Pseudomonas* (Ude i sur., 2006), *Rhizobium* (Ausmees i sur., 1999; Robledo i sur., 2012) i *Sarcina* (Yang i sur., 2013). Nekoliko istraživanja je razvijeno za proizvodnju bakterijske celuloze na industrijskoj razini s kontiniranim ili polukontinuiranim uzgojem, niskom cijenom sirovina i proizvodnjom male količine nusprodukata. Osim toga potrebno je postići visok stupanje konverzije izvora ugljika u celulozu kao i visoku produktivnost proizvodnje (Çakar i sur., 2014). U svrhu unaprijeđenja procesa fermentacije proučavan je mehanizma proizvodnje bakterijske celuloze (Chawla i sur., 2009; Huang i sur., 2014b; Jonas i Farah, 1998; Klemm i sur., 2001; Pecoraro i sur., 2007; Ross i sur., 1991; Vandamme i sur., 1998). Za svaku poru u staničnoj stijenci bakterije proizvode se lanaci celuloze, te se 10-15 takvih lanaca udružuje u nanofibre promjera 1,5 nm (Ross i sur., 1991). Nanofibri se samostalno povezuju čineći mikrofibrile koje zatim formiraju fibrilna vlakna širine 50-80 nm (Vitta i Thiruvengadam, 2012). Glavni čimbenici koji utječu na sastav, morfologiju i svojstva bakterijske celuloze su sastav hranjive podloge, oblik bioreaktora, temperatura, koncentracija kisika, pH, konačno stanje i aditivi (Hu i sur., 2014; Lee i Bismarck, 2012; Ul-Islam i sur., 2013b). Optimalan sastav hranjivog medija nije važan samo za rast stanice nego i za stimulaciju formiranja celuloze (Chawla i sur., 2009). Još jedan važan faktor je smanjenje troškova sirovine, pokušava se povećati ili održati produktivnost i prinos koristeći jeftinije sirovine npr. nusprodukte drugih proizvodnih procesa. Uzgoj u statičkom reaktoru često se primjenjuje zbog visoke produktivnosti međutim problem su trajanje uzgoja i prostor koji zauzimaju takvi reaktori (Chawla i sur., 2009; Song i sur., 2009). Osim statičkog reaktora mogu

se koristiti: reaktor s rotirajućim diskom (Kim i sur., 2007; Krystynowicz i sur., 2002; Lin i sur., 2014), reaktor s mehaničkim miješalom i centrifugalnim filterom (Jung i sur., 2007), reaktor s biofilmom (Cheng i sur., 2009a, 2010, 2011), barbotirajuća kolona (Choi i sur., 2009; Moon i sur., 2006; Song i sur., 2009), reaktor s nasutim slojem (Lu i Jiang, 2014). Postoje mnoga istraživanja i članci o karakterizaciji, svojstvima i mogućoj primjeni bakterijske celuloze (Huang i sur., 2014b; Lin i sur., 2013a). Međutim fokus u člancima i istraživanjima je različit obzirom da se razmatra kako poboljšati određenu karakteristiku ovisno o upotrebi. Izolirani su i proučavani novi bakterijski sojevi, neki od njih su genetski modificirani kako bi im se povećala produktivnost. Osim toga proces se unaprijeđuje upotrebom novih hranjivih podloga, novih reaktora i aditiva za povećanje produktivnosti, te njihovom usporedbom sa standardnim procesom proizvodnje. Istraživanjem svojstava bakterijske celuloze proizvedne različitim metodama poboljšane su određene karakteristike, što znači i širu primjenu. Vjeruje se da će novi pristup procesiranja i primjene bakterijske celuloze biti velika prednost za one koji se bave ovim područjem.

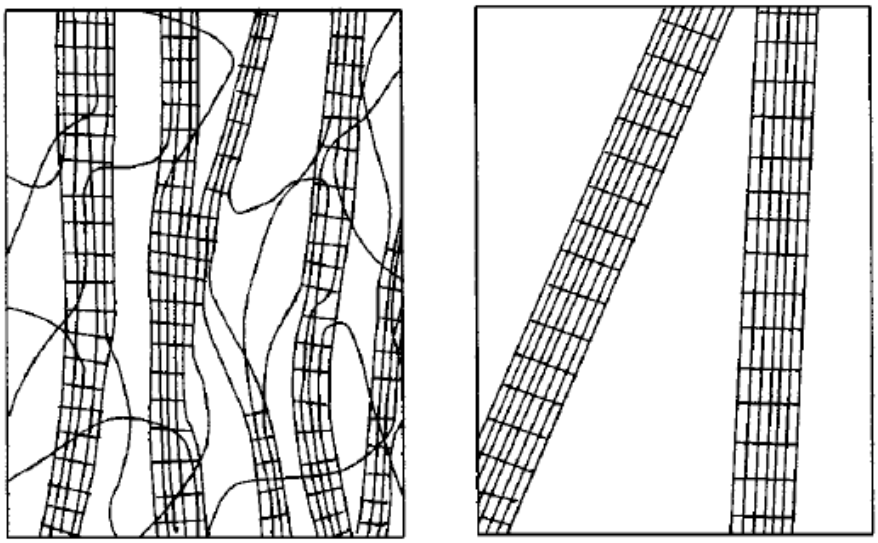
2.5. Metode uzgoja

Izvornisupstrat za proizvodnju bakterijske celuloze je saharoza. Često se za uzgoj u laboratorijima koristi hranjiva podloga koja se dobiva otapanjem 50g saharoze, 5g kvaščevog ekstrakta, 5g $(NH_4)_2SO_4$, 5g KH_2PO_4 i 0,05g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ u jednoj litri vode (Schramm i Hestrin, 1954). Hranjiva podloga može biti upotpunjena dodatkom male količine vitamina. Općenito dodatak anorganskih tvari nije nužan međutim neophodan je kada se koriste prirodni sokovi. Uobičajena praksa u proizvodnji *nata-de-coco* je dodatak malih količina dušičnih spojeva u obliku amonij sulfata ili diamonij hidrogenfosfata. Kultura se uzgaja u statičnim uvjetima na temperaturi 28-30°C uz dodatak određenog alikovota hranjivog bujona. Na početku uzgoja hranjiva podloga je zamućena, nakon određenog vremena pojavljuje se bijeli pelet na površini i njegova debljina povećava se vremenom, a nakon četiri tjedna dostiže preko 25mm (Slika 4). Važno je napomenuti da u procesu rasta aerobne bakterijske stanice sintetiziraju celulozu na svojoj površini, stoga produktivnost ovisi o površini, a ne o volumenu (Masaoka i sur., 1993). U stacionarnom uzgoju gel u obliku diska drži se silama kohezije za stijenke posude, kako raste i taj sloj postaje gušći tako lagano klizi prema dolje. Kontinuirani sloj gela sklon je propadanju ukoliko se koriste posude s konusnim dnom. Za kućnu proizvodnju *nata-de –coco* koriste se

plastične posude veličine 50š × 35d × 10h cm^3. Nakon inokulacije posude se prekrivaju s novinama i skladište na 8-10 dana. Ukoliko je pročišćavanje potrebno, odnosno ako se kultura koristi u znanstvene svrhe, bakterije sadržane u početnom gelu mogu se vrlo jednostavno ukloniti uranjanjem u razrijeđenu alkalnu otopinu te zatim isprati vodom (Brown, 1986a; Brown, 1986b). Za daljnje pročišćavanje djelotvorne rezultate daje tretman s oksidansima (Nishi i sur., 1990). S ciljem povećana produktivnosti u novije vrijeme rađeni su eksperimenti u kojima je kultura uzgajana uz miješanje (Yoshinaga i sur., 1997) pri čemu se više ne dobiva ravan gel, te je tako dobivenom gelu upotreba ograničena na proizvodnju papira.

2.6. Formiranje mikrofibrila

U posljednjih nekoliko desetljeća kombinirajući znanje o biogenezi opsežno je proučavan mehanizam formiranja strukture mikrofibrila (Brown i sur., 1976; Zaar, 1977). Danas se vjeruje da bakterije sintetiziraju celulozu u unutrašnjosti stanice koja se zatim izlučuje iz stanice posebnim transportnim komponentama ili mlaznicama formirajući protofibrile promjera približno 2-4nm, a protofibrili su upakirani u obliku vrpce formirajući tako mikrofibrile veličine otprilike 80x4nm (Brown, 1989) (Slika 5).



Slika 5. Shematski prikaz mikrofibrila bakterijske celuloze (desno) u usporedbi s "resastim " micelama biljnog vlakana

Kinetika sinteze bakterijske celuloze proučavana je 1950-ih godina i ustanovljeno je da se s vremenom prinos povećava gotovo eksponencijalno barem pri niskom stupnju konverzije uz miješanje i dovoljnu opskrbu kisikom iz zraka. Pretpostavlja se da bakterijska stanica sintetizira određen broj lanaca inicijatora tijekom svog generacijskog vremena. Na te inicijacijske lance vežu se monomerne jedinice formirajući tako celulozu poštujući zakon bakterijskog rasta. Dakle,

$$N_t = N_0 e^{\alpha t} \qquad (1.)$$

pri čemu su N_0i $N_t$brojevi bakterijskih stanica u vremenu t i 0; α je konstanta povezana sa srednjim vremenom generiranja bakterija τ:

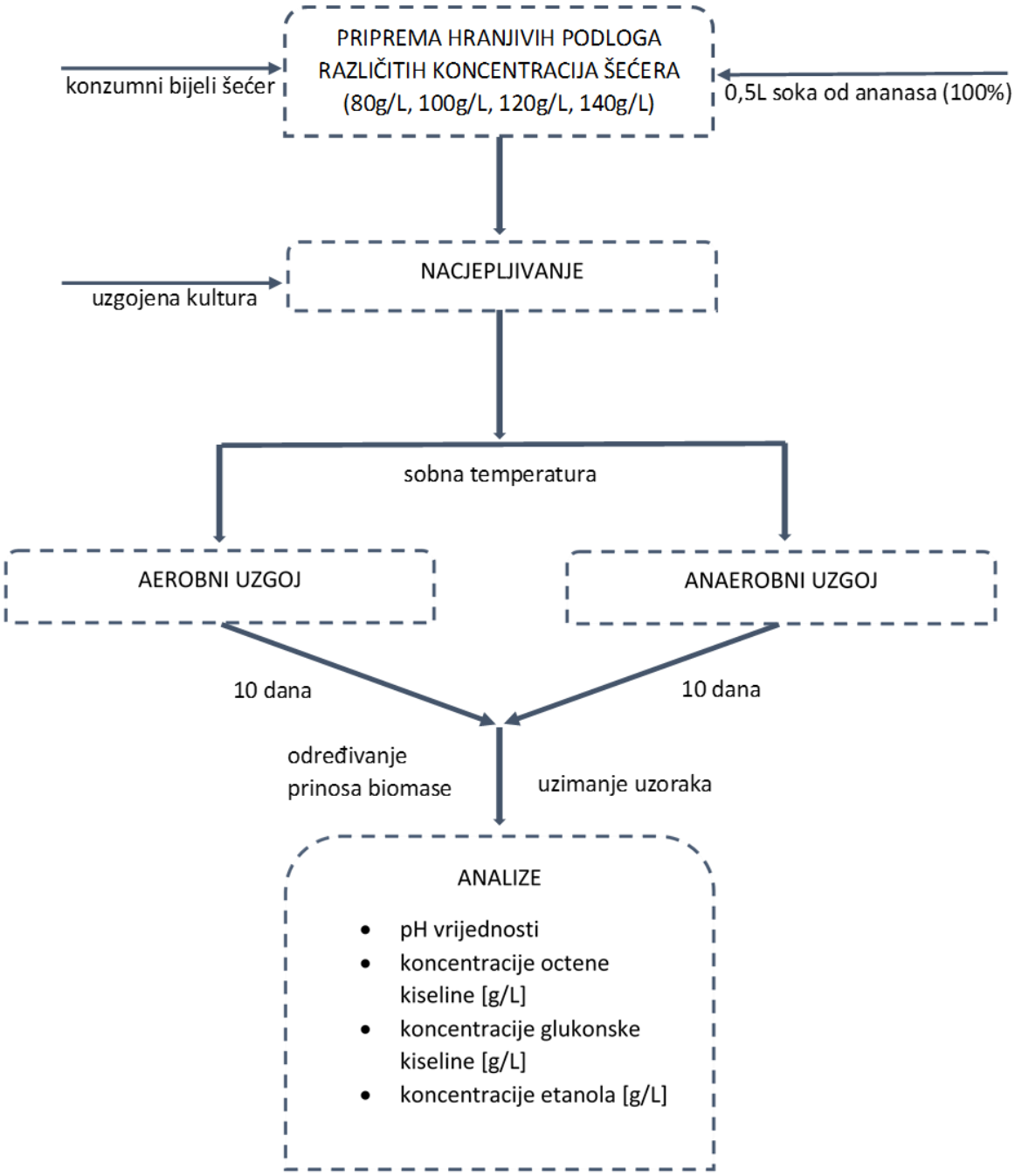
$$\alpha = \left(\frac{1}{\tau}\right) \ln 2 \qquad (2.)$$

Teorija da se izrazi prinos i stupanj polimerizacije na račun prosječnog životnog vijeka bakterijske stanice i rasta lanca je izveden (Brown, 1962), a τ=220-330 min je procijenjen iz podataka o prinosu i mjerenja prosječne molekularne težine. Slični eksperimenti provedeni su za vrijednosti τ=290-480min i τ=380-900min (Ring,1982, Marx-Figini i Pion,1974).Što se tiče životnog vijeka lanca eksperimentima je dobiveno da prosječna molekularna masa celuloze i dalje nastavlja rasti sve do nekoliko generacija, iako noviji rezultati pokazuju suprotno (Okajima i sur., 1991). Upitno je što se događa s fibrilnom strukturom tijekom diobe stanica. Smatralo se da je formacija trostrukog grananja neizbježna, ako se istiskivanje fibrila nastavlja kroz generacija sa stanice majke na stanice kćeri (Yamanaka i sur., 1989). Vlakna mogu biti sužena na mjestu grananja ukoliko u fazi diobe stanice nemaju normalan broj mlaznica, a oporavak normalnom promjeru fibrila pitanje je vremena. Fibrili na uvećanim slikama nisu uvijek linearni. Iz prosječnog životnog vijeka bakterije(Marx-Figini i Pion, 1974; Marx-Figini i Pion, 1976) i brzine rasta fibrila (Brown Jr. i sur., 1976) procijenjena je duljina segmenta između dvije točke grananja na 580-960 μm (Watanabe, 1995), a prema broju bakterija u produktu dobiveno je 200–700 μm duljine između dvije točke grananja. Postojanje takvih grananja povezano je s mehaničkim svojstava gela kao što je žilavost i otpornost na istezanje.

2.7. Formiranje gela

U početnoj fazi povećava se broj bakterijskih stanica koje za svoj rast koriste otopljeni kisik. Pritom proizvode određenu količinu celuloze koja se očituje kroz zamućenje tekuće hranjive podloge. Kada je otopljeni kisik potrošen, bakterije koje se nalaze na površini imaju sposobnost sinteze celuloze. Iako dolazi do diobe, broj bakterijskih stanica na površini ne povećava se eksponencijalno, ali doseže određenu ravnotežnu koncentraciju stanica. Višak stanica apsorbirase i zadržava u gelu. Bakterijske stanice ispod površine nisu mrtve nego se nalaze u stanju mirovanja tako da se mogu ponovno aktivirati i koistiti za novi uzgoj. Ukoliko se tlak kisika poveća tako da bude veći nego u zraku ubrzati će se proizvodnja celuloze, međutim takva proizvodnja je kompliciranа i dobiva se drugačiji materijal (Watanabe i Yamanaka,1995). Uočen je opći trend (Yamanaka i sur.,1989,Masaoka i Sakota,1993,Borzani i Souza,1995) rasta sloja gela u statičnim uvjetima. Indukcijsko razdoblje traje nekoliko dana nakon čega se naglo povećava debljina sloja i prinos celuloze, a nakon tjedan do deset dana brzina rast se usporava.

3. MATERIJALI I METODE



Slika 6. Tijekcjelokupnog istraživanja

3.1. Priprava kulture *kombuche*

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 na sobnoj temperaturi.

3.2. Uporabljena vrsta soka

Uzgojena *kombucha*nacijepljena je na Juicy sok od ananasa proizvođača Stanić Beverages, Zagreb, Hrvatska.

Sastav: koncentrirani sok od ananasa, vitamin C, stabilizator E440, sredstvo protiv pjenjenja E900.

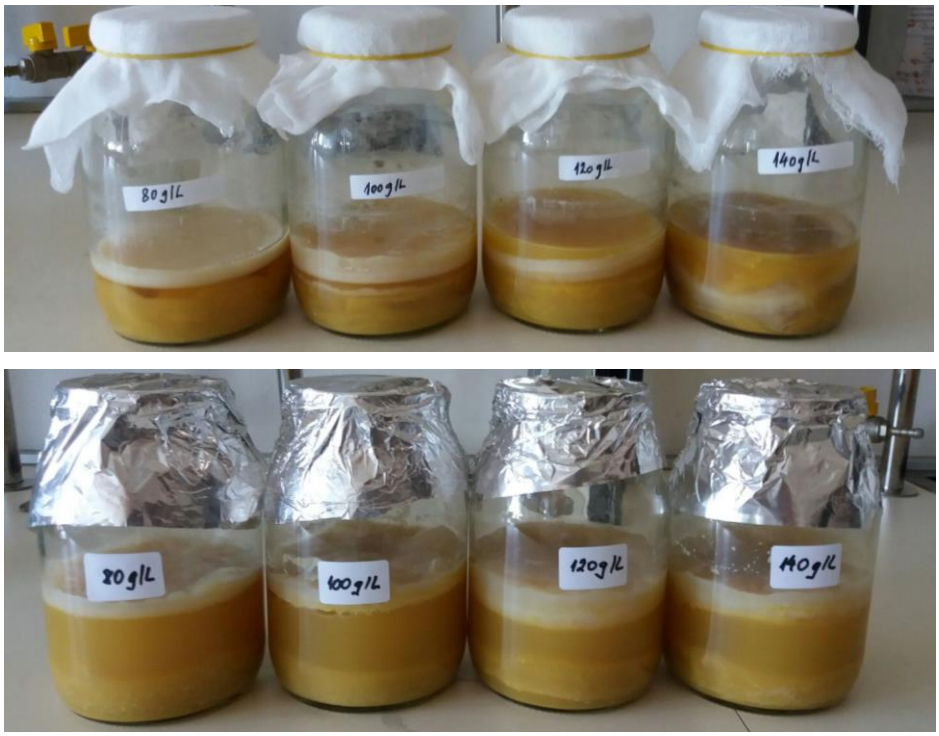
Nutritivna vrijednost (100 mL):

energijska vrijednost	214 kJ/50 kcal
masti	<0,1 g
ugljikohidrati	11,4 g
proteini	<0,5 g
sol	<0,01 g
vitamin C	45 mg (56 % RDA)

Nacijepljeni uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi tijekom 10 dana, a supernatant je svakih 24 sata izuzimanza daljnja određivanja. Kontrolni uzorak je bio sok koji nije bio nacijepljen s kulturom *kombuche*.

3.3. Aerobni i anaerobni uzgoj

U radu su pripravljena četiri uzorka za uzgoj u aerobnim i četiri za uzgoj u anaerobnim uvjetima s različitim koncentracijama dodanog konzumnog šećera (80, 100, 120 i 140 g/L). Sve staklene posude pripravljene za aerobni uzgoj bile su zatvorene sterilnim kompresama, a za anaerobni uzgoj aluminijskom folijom (Slika 7).



aerobni uzgoj

anaerobni uzgoj

Slika 7. Uzorci za aerobni i anaerobni uzgoj *kombuche*

3.4. Određivanje pH vrijednosti

Odmah nakon nacjepljivanja, te tijekom i na kraju fermentacije,soku od ananasa određivana je pH vrijednost pomoću pH metra Hanna Industrial model HI 98103.

3.5. Određivanje koncentracije octene kiseline

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

$$\gamma(CH_3COOH) = V(NaOH) \cdot f(NaOH) \cdot V(podloge) \cdot 6 \qquad (3.)$$

U kojem je:

V(NaOH) = utrošeni volumen 0,1 M NaOH (mL)

f(NaOH) = faktor 0,1 M NaOH (1,000)

Vuzorka = volumen uzorka (1 mL)

3.6. Određivanje koncentracije glukonske kiseline

U Erlenmeyer tikvicu od 200 mL stavljeno je 5 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:

$$\gamma(C_6H_{12}O_7) = (V(\text{NaOH}) \cdot M(\text{NaOH}) \cdot 1{,}97) / V\text{uzorka} \qquad (4.)$$

U kojem je 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 soka 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 soka koji je razrijeđen s demineraliziranom vodom do 50 mL (odnos soka 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 predestiliran. 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 mL20%-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:

$$\text{alkohol (vol \%)} = (10 - \frac{a}{6.9}) \cdot 2 \qquad (5.)$$

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

3.7. Izračunavanje mase i prinosa celulozne biomase *kombuche*

Nakon 10 dana fermentacije, izmjerena je masa celulozne biomase (g) prema slijedećoj formuli:

masa celuloze (g) = masa biomase nakon fermentacije – masa inokuluma

$$m_{cb}\ (g) = m_{bt} - m_i \qquad (6.)$$

gdje je:

m_{cb} = masa celulozne biomase (g)

m_{bt} = masa biomase nakon uzgoja (g)

m_i = masa inokuluma (g)

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

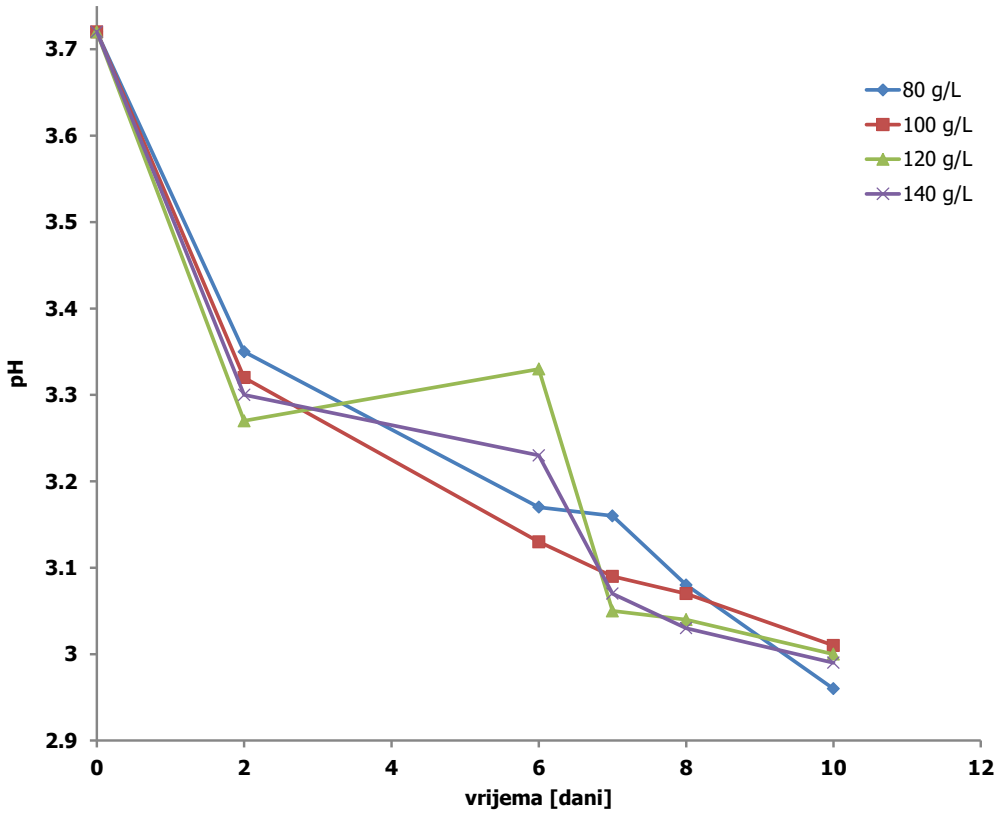
Y_{cb} (%) = (γ biomase nakon fermentacije / γ saharoze na početku procesa) x 100 (7.)

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom je radu proučavana fermentacija soka od ananasa sa združenom kulturom bakterija octene kiseline i kvasaca, u javnosti poznatoj kao *kombucha* ili „čajna gljiva". Tijekom 10 dana aerobne i anaerobne fermentacije na sobnoj temperaturi, praćeni su različiti parametri: promjene pH vrijednosti fermentiranog soka, koncentracija octene i glukonske kiseline, etanola i kinetika nastajanja bakterijske celuloze (Slike 8-18).

4.1. Aerobni uzgoj

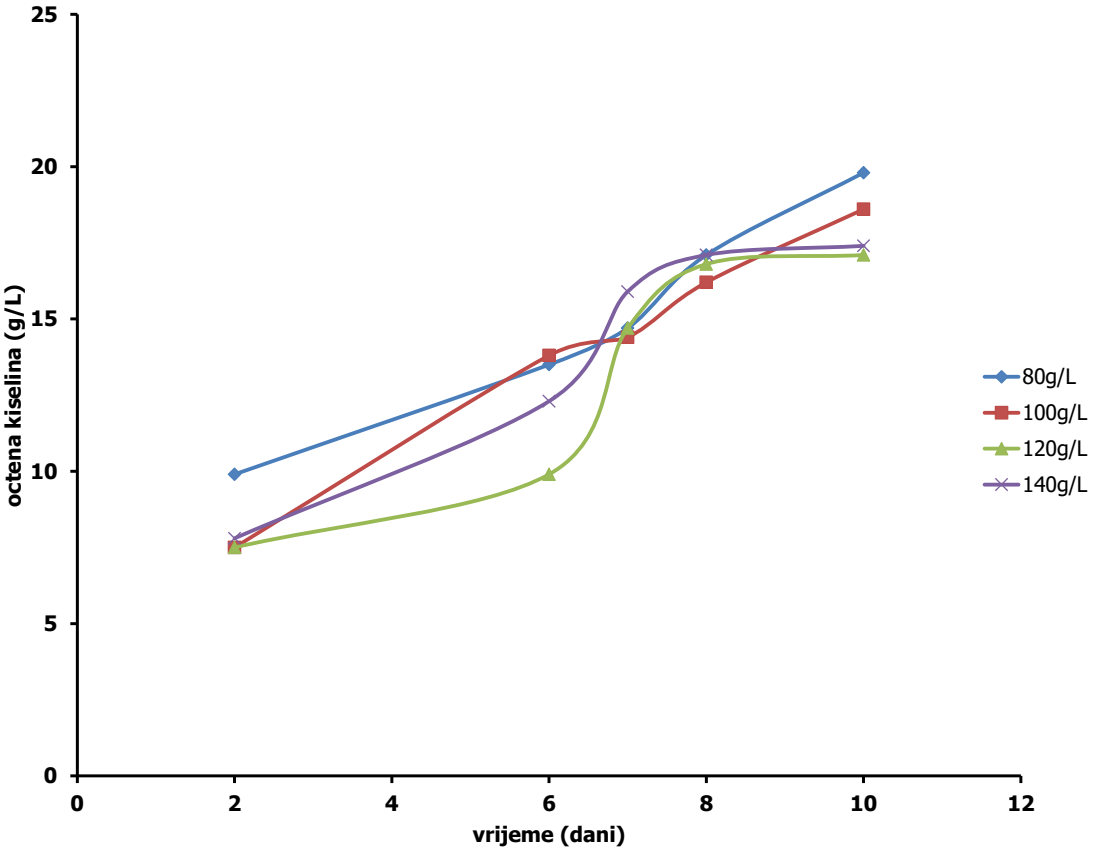
Optimalna pH vrijednost za rast bakterija iz roda *Acetobacter* je između 5,4 i 6,3. Rast se odvija i pri nižim pH vrijednostima, od 4,0 do 4,5, a minimalni rast je zabilježen pri pH 7,0 do 8,0. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju ukazuju da su bakterije octene kiseline iz *kombuche*, sposobne rasti, proizvoditi organske kiseline i bakterijsku celulozu čak i pri pH vrijednostima nižim od 3,0 (Slika 8).



Slika 8. Promjena pH vrijednosti tijekom 10 dana aerobnog uzgoja *kombuche* u soku od ananasa

Sinteza organskih kiselina mijenjala se tijekom fermentacije što je prikazano na Slikama 8 i 9. Koncentracija octene kiseline se tijekom 10 dana fermentacije linearno povećavala od 7,5 g/L na

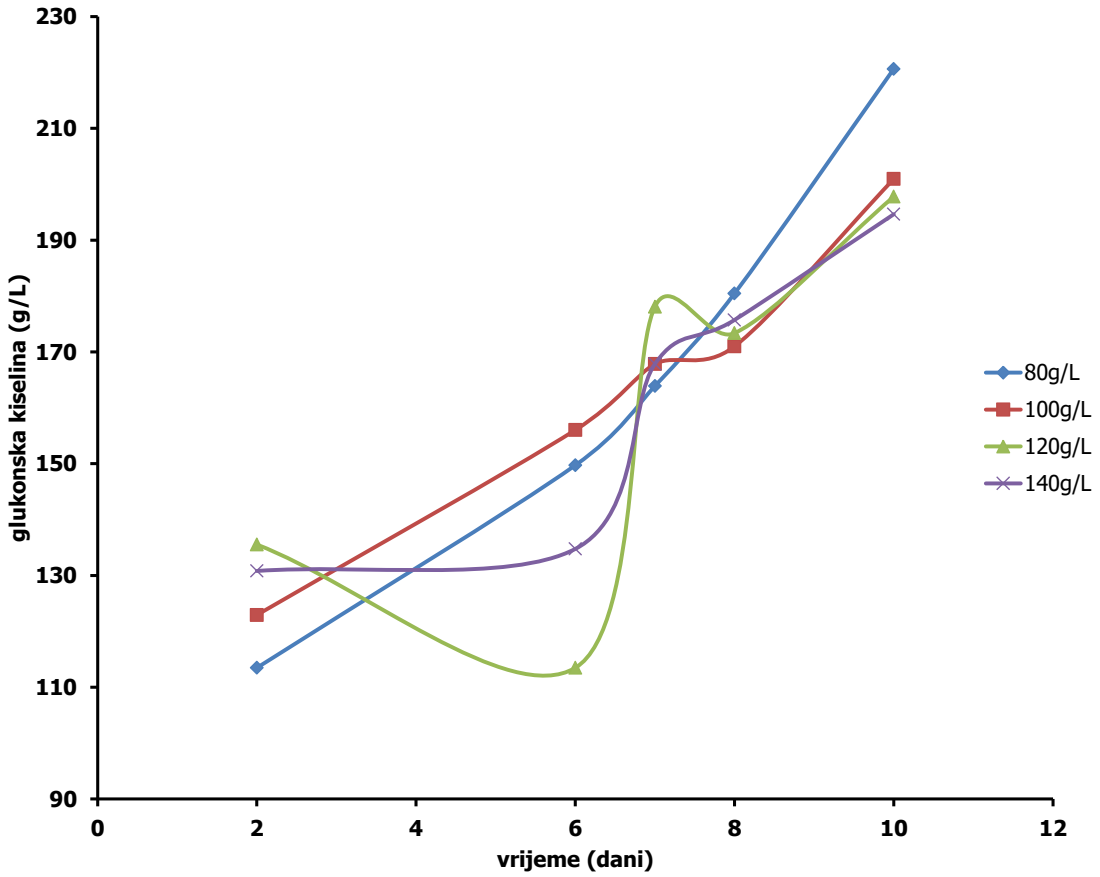
početku istraživanja (koncentracije šećera 100, 120 i 140 g/) i 9,9 g/L kod 80 g/l šećera do 17,0 g/L (120 i 140 g/L), 18,6 g/L (100 g/L) i 19,8 g/L (80 g/L) na kraju uzgoja. Uz sposobnost sinteze relativno visokih koncentracija octene kiseline, bakterije octene kiseline pokazuju i toleranciju na kiselost, 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).



Slika 9. Promjena koncentracije octene kiseline tijekom 10 dana aerobnog uzgoja *kombuche* u soku od ananasa

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 10, koncentracija glukonske kiseline bila je višestruko veća od koncentracije octene kiseline.Kod svih koncentracija dodanog šećera uočen je linearni rast koncentracije glukonske

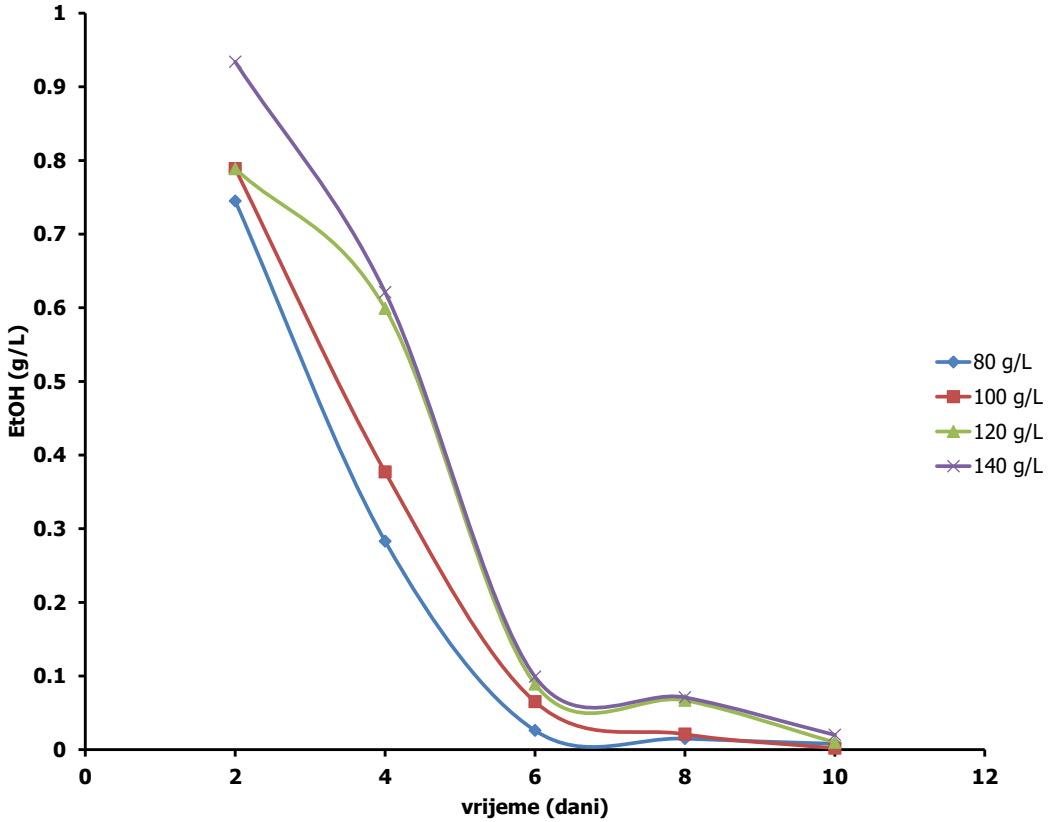
kiseline, uz određene oscilacije u koncentracijama izmjerenim 6. dana uzgoja (120 i 140 g/L), pri čemu se koncentracija glukonske kiseline u svim uzorcima na kraju uzgoja udvostručila (Slika 10).



Slika 10. Promjena koncentracije glukonske kiseline tijekom 10 dana aerobnog uzgoja *kombuche* u soku od ananasa

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 70 g/L saharoze u hranjivoj podlozi i uočili da koncentracija proizvedenog EtOH ovisi o vrsti i količini dodanog šećera. U ovom su radu u sok od ananasa dodanerazličite koncentracije saharoze (konzumni bijeli šećer) i već nakon 2. dana fermentacije, izmjerena je maksimalna koncentracija EtOH, 0,94 g/L(80 g/L) i od 0,75 do 0,79 g/L (100, 120 i 140 g/L), koja se do 6.

dana linearno smanjivala na vrijednosti od 0,3 do 0,1 g/L, a nakon toga je pala na manje od 0,05 g/L i nije se značajnije mijenjala do kraja fermentacije (Slika 11).



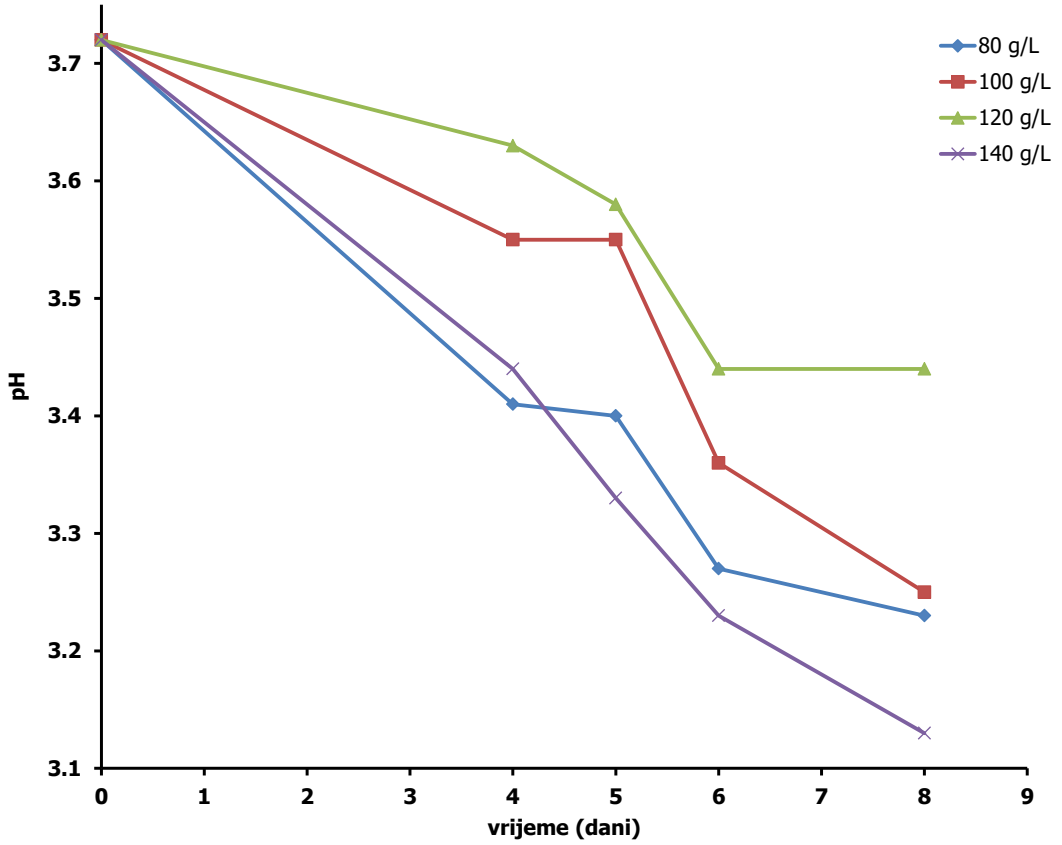
Slika 11. Promjena koncentracije EtOH tijekom 10 dana aerobnog uzgoja *kombuche* u soku od ananasa

4.2. Anaerobni uzgoj

U ovom radu je proveden i anaerobni uzgoj s ciljem proučavanja kinetike sinteze organskih kiselina i bakterijske celuloze i usporedbe s rezultatima dobivenim u aerobnim uvjetima. Budući da nema literaturnih podataka o anaerobnom uzgoju *kombuche*, dakle pravoj fermentaciji, a ne vrenju koje se zbiva u aerobnim uvjetima, rezultati nisu bili predvidivi i usporedivi s rezultatima drugih autora.

Kao što je već prije navedeno, *kombucha*je simbiotski združena kultura bakterija octene kiseline i osmofilnih kvasaca (Chen i Liu, 2000). Uz bakterije vrste *A. xylinum* koje su obligatni aerobi, u toj združenoj kulturi mogu biti prisutni i kvasci iz rodova *Saccharomyces* i *Brettanomyces*, koji

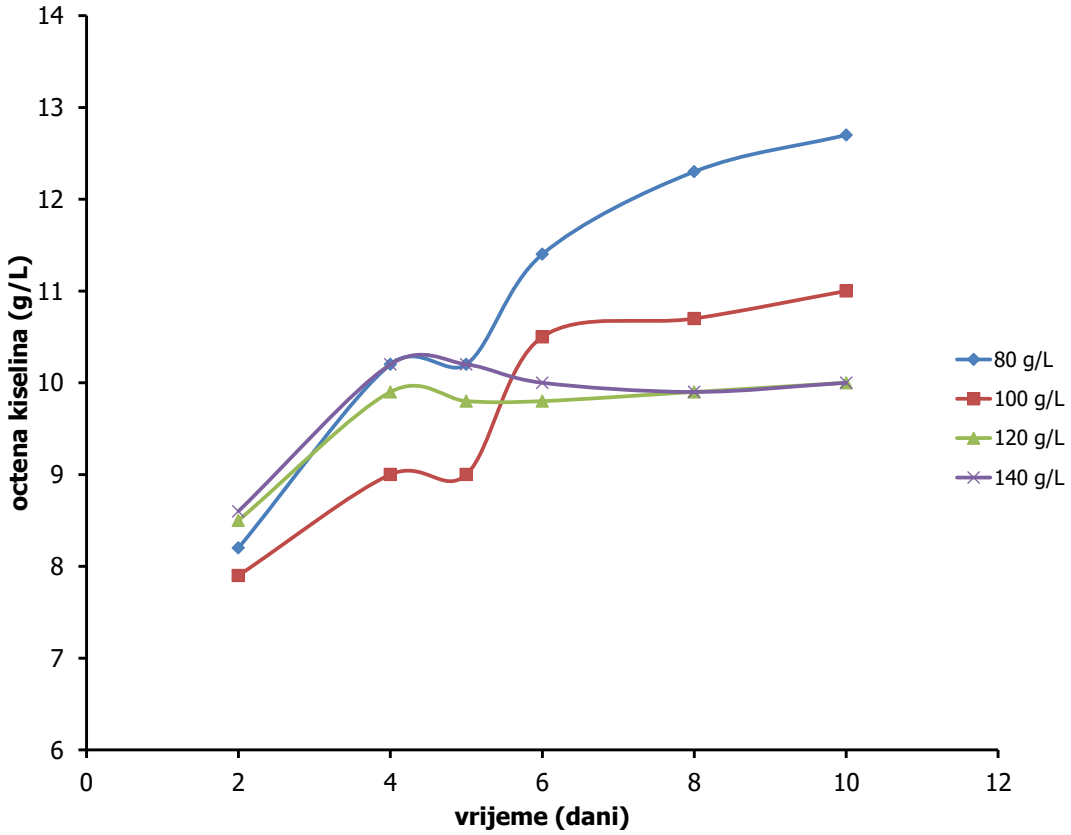
mogu rasti i u aerobnim i anaerobnim uvjetima, bakterije iz roda *Lactobacillus*, koje su mikroaerofili, *Pediococcus*, kao anaerobi i, kao najpoznatiji rod za fermentaciju *kombuche*, *Gluconacetobacter kombuchae*, koji je anaerobni mikroorganizam.Svi su pokusi anaerobne fermentacije provođeni istovremeno s aerobnim uzgojem, s istim koncentracijama šećera i s istim početnim pH vrijednostima uzoraka. Uspoređujući promjene pH vrijednosti anaerobnog s aerobnim uzgojem (Slika 8), vidljivo je da pad pH vrijednosti nije bio ujednačen kao u aerobnom uzgoju. Posebice se to odnosi na uzorak s koncentracijom šećera 120 g/L, u kojem se do kraja uzgoja pH vrijednost nije spustila ispod 3,44 (Slika 12). Najveći pad pH vrijednosti zabilježen je kod uzorka sa 140 g/L, čija je krajnja pH vrijednost bila 3,12, a uzorci sa 80 i 100 g/L su, uz oscilacije, na kraju uzgoja imali približno istu pH vrijednost, oko 3,25.



Slika 12. Promjena pH vrijednosti tijekom 10 dana anaerobnog uzgoja *kombuche* u soku od ananasa

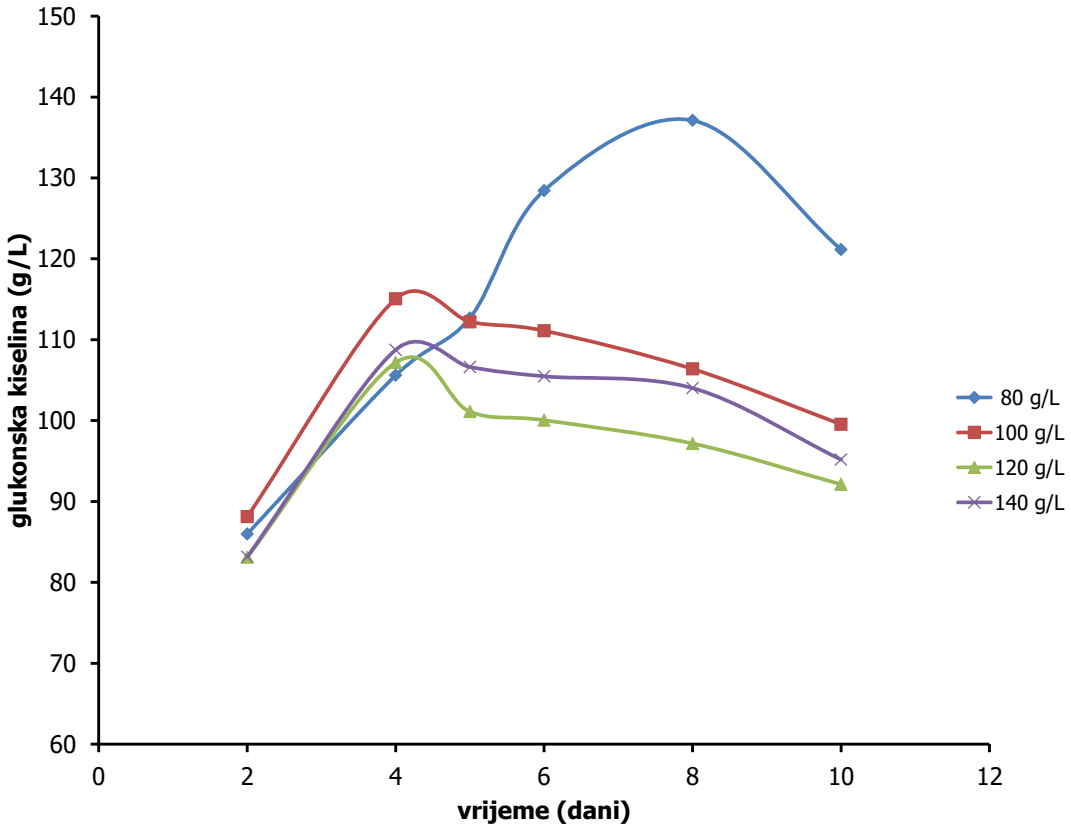
Iako tijekom fermentacije s *kombuchom*nastaje octena kiselina, metabolizmom nastaju i druge organske kiseline: glukonska, glukuronska i mliječna kiselina (Dufresne i Farnworth, 2000). Rezultati dobiveni ovim istraživanjem pokazali su da je najveća koncentracija octene kiseline

nakon 10 dana fermentacije postignuta u soku od ananasa s 80 g/l šećera (12,6 g/L), manja koncentracija je izmjerena kod 100 g/L (10,8 g/L), a potpuno iste koncentracije octene kiseline su izmjerene kod koncentracija šećera 120 i 140 g/L (9,99 g/L) (Slika 13).



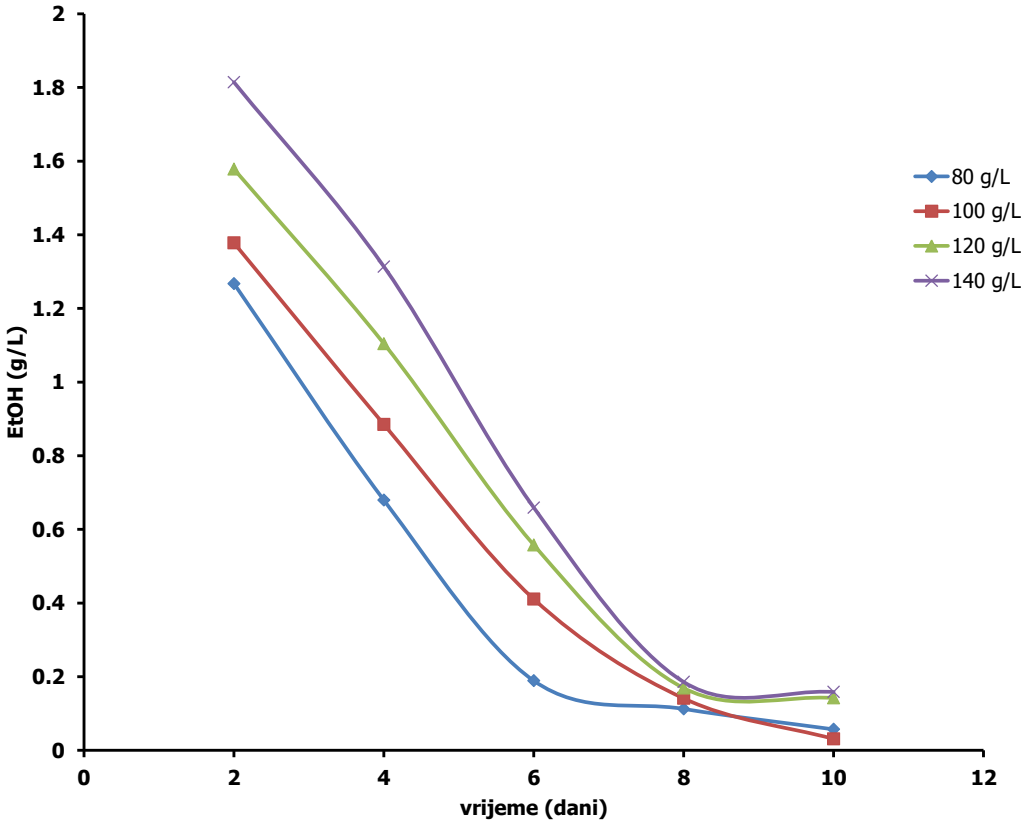
Slika 13. Promjena koncentracije octene kiseline tijekom 10 dana anaerobnog uzgoja *kombuche* u soku od ananasa

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 14, koncentracija glukonske kiseline bila je veća 10 puta od koncentracije octene kiseline, pri čemu je zabilježen linearni rast u svim uzorcima do četvrtog dana fermentacije, nakon čega je pri koncentracijama šećera 100, 120 i 140 g/L koncentracija glukonske kiselinelinearno opadala. Jedino je u uzorku s 80 g/L koncentracija glukonske kiseline rasla sve do 8. dana fermentacije, nakon čega se smanjila, no još uvijek je bila znatno veća od uzoraka s većom koncentracijom šećera (Slika 14).



Slika 14. Promjena koncentracije glukonske kiseline tijekom 10 dana anaerobnog uzgoja *kombuche* u soku od ananasa

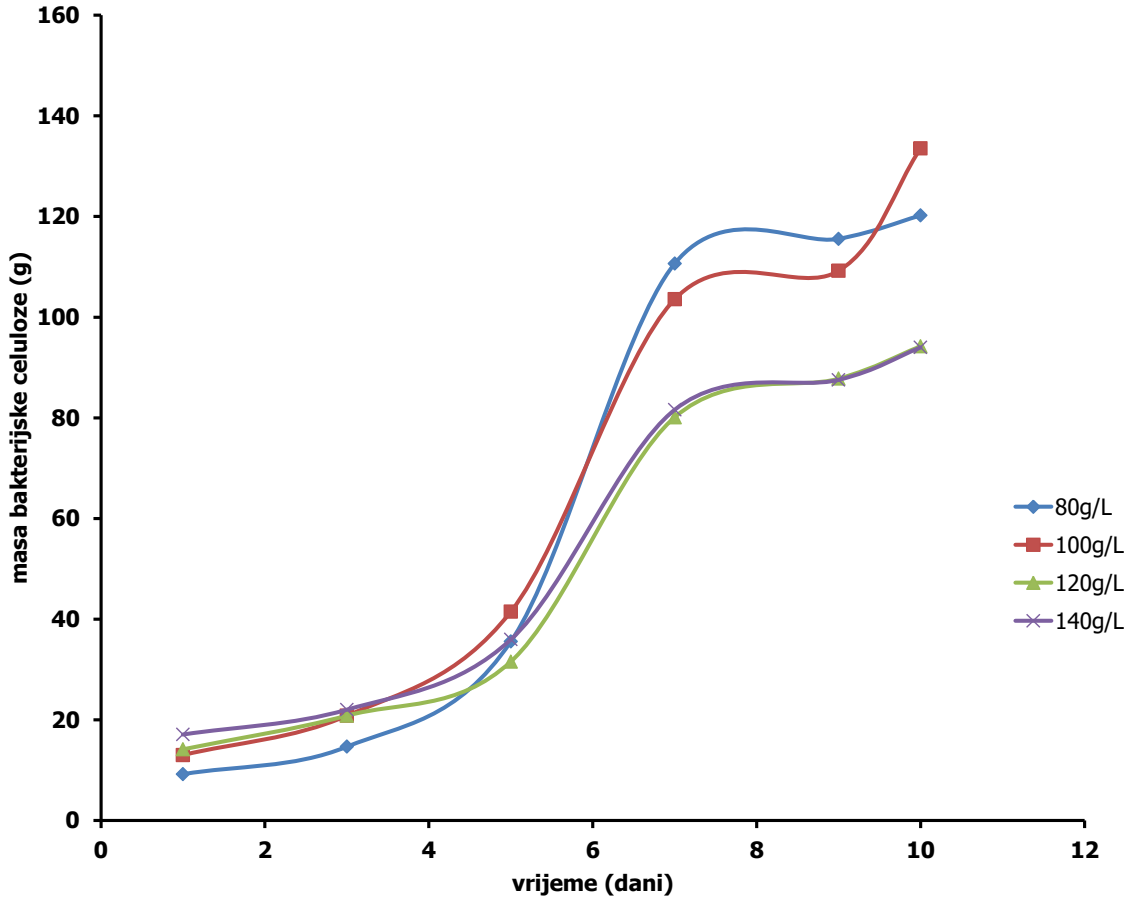
Kao što je i očekivano, tijekom anaerobne fermentacije, metabolizmom kvasaca se stvara veća koncentracija etanola nego pri aerobnom uzgoju. Već u 2. danu fermentacije određena je od 20 do 80 % veća koncentracija etanola, koja se linearno smanjivala tijekom fermentacije, sve do 8. dana, kad su se vrijednosti koncentracije etanola ustalile (Slika 15).



Slika 15. Promjena koncentracije EtOH tijekom 10 dana anaerobnog uzgoja *kombuche* u soku od ananasa

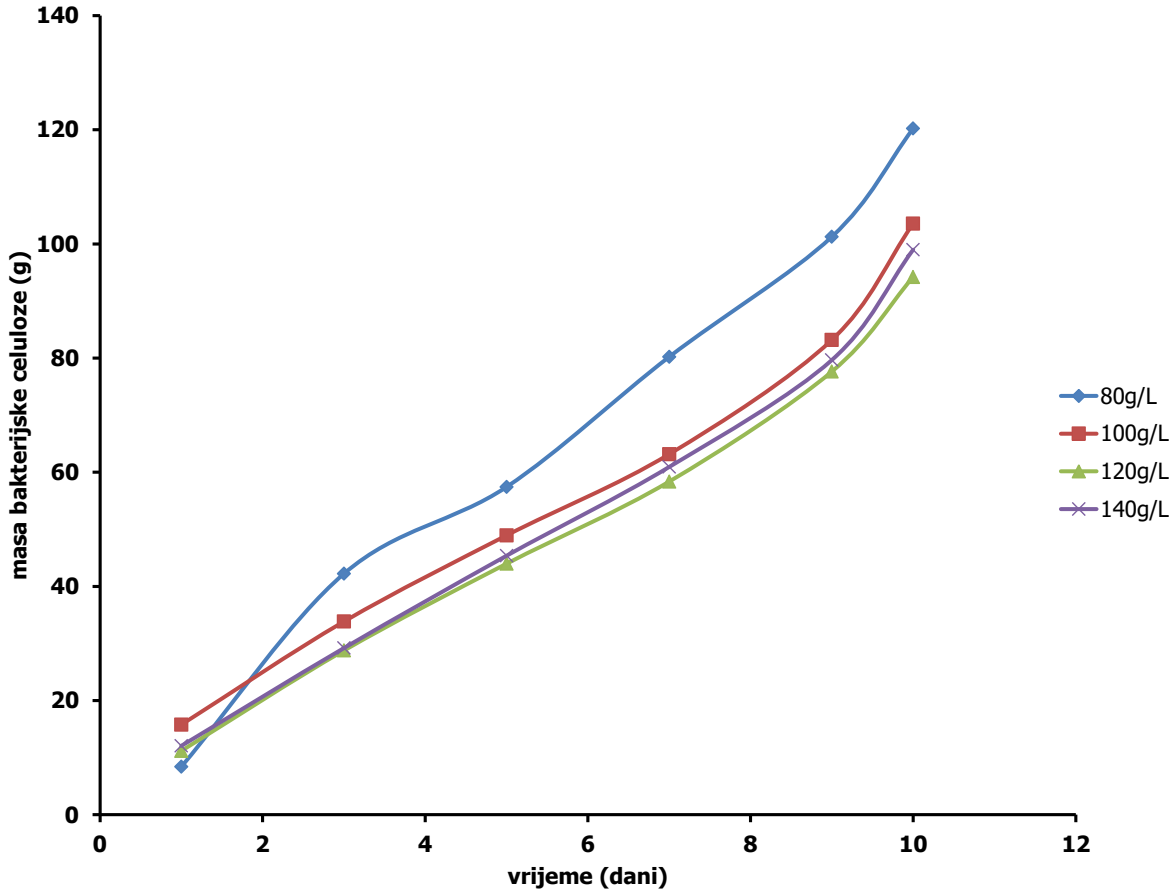
Biotransformacijom zaslađene tekućine tijekom fermentacije nastaje celulozna opna koja se u tankom sloju oblikuje na površini tekućine (Sievers i sur., 1995). Na površini celulozne pelikule nalazi se veliki broj bakterija octene kiseline, striktnih aeroba, kojima je za rast i razmnožavanje nužan atmosferski kisik, dok su s donje strane nakupine kvasaca, koji pripadaju fakultativno anaerobnim mikroorganizmima (Malbaša i sur., 2008). Na Slici 16 prikazana je kinetika nastajanja bakterijske celuloze iz koje je vidljivo povećanje mase celuloze tijekom 10 dana aerobnog uzgoja pri svim koncentracijama dodanog šećera. Prinos biomase tijekom fermentacije je usko povezan s izvorom ugljika, odnosno supstratom. Prema dobivenim rezultatima, saharoza je izvrsni supstrat jer je nakon 10 dana fermentacije izmjereno 138 g/L vlažne bakterijske celuloze (100 g/L), a u soku s 80 g/L šećera 120 g/L vlažne bakterijske celuloze.

Kod viših koncentracija šećera (120 i 140 g/L) uočenaje potpuno identična sinteza i prinos vlažne celuloze, koja je na kraju uzgojaiznosila 95 g/L.



Slika 16. Kinetika sinteze bakterijske celuloze (BC) tijekom 10 dana aerobnog uzgoja *kombuche* u soku od ananasa

Tijekom anaerobnog uzgoja izmjeren je manji prinos bakterijske celuloze nego u aerobnom uzgoju, no pri svim koncentracijama dodanog šećera u sok od ananasa, uočen je linearni rast celulozne biomase (Slika 17). Usporedbom aerobnog i anaerobnog uzgoja, vidljivo je da je pri koncentraciji od 80 g/L postignuta najveća sinteza bakterijske celuloze (Slike 16 i 17).

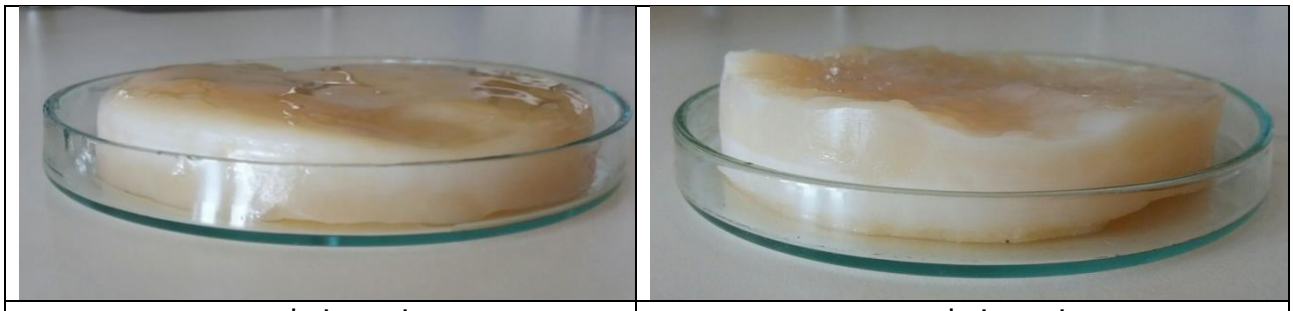


Slika 17. Kinetika sinteze bakterijske celuloze (BC) tijekom 10 dana anaerobnog uzgoja *kombuche* u soku od ananasa

Prinos bakterijske celuloze tijekom 10 dana biotransformacije soka od ananasa prikazan je u Tablici 1. Vidljivo je da je i u aerobnim i u anaerobnim uvjetima uzgoja najveći prinos bakterijske celuloze postignut pri koncentraciji šećera od 80 g/L (148,75 i 139,83 %). Nešto niži je izmjeren u aerobnim uvjetima pri koncentraciji šećera od 100 g/L (120,54 %), dok su pri anaerobnim uvjetima postignuti manji prinosi (od 62,09 do 87,77 %).

Tablica 1. Prinos celulozne biomase *kombuche* nakon 10 dana fermentacije u soku od ananasa

Koncentracija saharoze	**γ inokuluma (g/L)**	**γ celulozne biomase (g/L)**	**Prinos (%)**
Aerobni uzgoj			
80 g/L	9,21	128,21	148,75
100 g/L	13,01	133,55	120,54
120 g/L	14,15	94,21	67,72
140 g/L	17,09	93,99	54,93
Anaerobni uzgoj			
80 g/L	8,42	120,28	139,83
100 g/L	15,78	103,55	87,77
120 g/L	11,19	94,21	69,18
140 g/L	12,07	98,99	62,09



aerobni uzgoj | anaerobni uzgoj

Slika 18. Sintetizirana bakterijska celuloza nakon 35 dana aerobnog i anaerobnog uzgoja *kombuche* u soku od ananasa (80 g/L saharoze)

5. ZAKLJUČCI

Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti:

1. *Kombucha*je uzgajana 10 dana u aerobnim i anaerobnim uvjetima u soku od ananasa s dodatkom različitih koncentracija šećera (80, 100, 120 i 140 g/L) na sobnoj temperaturi.

2. Tijekom 10 dana fermentacije, istraživane su promjene pH vrijednosti, koncentracije nastalih organskih kiselina (octene i glukonske), etanola i kinetika sinteze bakterijske celuloze. Koncentracije octene i glukonske kiseline su linearno rasle u u aerobnim uvjetima pri svim koncentracijama dodanog šećera, dok je u anaerobnim uvjetima zabilježen blagi pad koncentracije glukonske kiseline.

3. U svim je uzorcima tijekom fermentacije izmjeren pad pH vrijednosti i koncentracije etanola kao rezultat povećanja koncentracije octene i glukonske kiseline.

4. Najveći prinos celulozne biomase nakon 10 dana fermentacije izmjeren je pri aerobnom uzgoju s 80 g/L šećera (148,75 %), dok je u anaerobnim uvjetima s 80 g/L šećera prinos iznosio 139,83 %.

6. POPIS LITERATURE

Ausmees N., Jonsson H., Hoglund S., Ljunggren H., Lindberg M. (1999) Structural and putative regulatory genes involved in cellulose synthesis in Rhizobium leguminosarum bv. trifolii. *Microbiology***145**: 1253–1262.

Barnhart D. M., Su S. C., Baccaro B. E., Banta L. M., Farrand S. K. (2013) CelR, an ortholog of the diguanylate cyclase PleD of caulobacter, regulates Cellulose synthesis in Agrobacterium tumefaciens. *Appl Environ Microbiol***79**: 7188–7202.

Borzani W., Souza S. J. (1995) Mechanism of the film thickness increasing during the bacterial production of cellulose on non-agitaded liquid media. *Biotechnol. Lett.* **17**: 1271-1272.

Brown A. M. (1962) The mechanism of cellulose biosynthesis by *Acetobacter acetigenum. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **59**: 155-169.

Brown A. J. (1986a) The chemical action of pure cultivations of bacterium aceti. *J. Chem. Soc.* **49**: 172-187.

Brown A. J. (1986b) On an acetic ferment which forms cellulose. *J. Chem. Soc.* **49**: 432-439.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 4565-4569.

Brown Jr R. M. (1989) Bacterial cellulose. *Cellulose: Structural and Functional Aspects. Ellis Howoodide, Chichester,* 145-151.

Budhiono A., Rosidi B., Taher H., Iguchi M. (1999) Kinetic aspect of bacterial cellulose formation in *nata-de-coco* culture system*. Carbohydrate Polymers* **40**: 137-143.

Çakar F., Özer I., Aytekin A. O., Sahin F. (2014) Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium. *Carbohyd Polym***106**: 7–13.

Charreau H., Foresti M. L., Vazquez A. (2013) Nanocellulose patents trends: a comprehensive review on patents on cellulose nanocrystals, microfibrillated and bacterial cellulose. *Recent Pat Nanotechnol***7**: 56–80.

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.

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

Cheng K.-C., Demirci A., Catchmark J.M. (2010) Advances in biofilm reactors for production of value-added products. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**: 445–456.

Cheng K.-C., Catchmark J. M., Demirci A. (2011) Effects of CMC addition on bacterial cellulose production in a biofilm reactor and its paper sheets analysis. *Biomacromolecules* **12**: 730–736.

Ciechanska D., Struszczyk H., Kazimierczak J., Guzinska K., Pawlak M., Kozlowska E., Matusiak G., Dutkiewicz M. (2002) New electro-acoustic transducers based on modified bacterial cellulose. *Fibres Text East Eur* **10**: 27–30.

Fu L. N., Zhang J., Yang G. (2013) Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. *Carbohyd Polym* **92**: 1432–1442.

Gao C., Yan T., Dai K., Wan Y. (2012) Immobilization of gelatin onto natural nanofibers for tissue engineering scaffold applications without utilization of any crosslinking agent. *Cellulose* **19**, 761–768.

Hu W. L., Chen S. Y., Yang J. X., Li Z., Wang H. P. (2014) Functionalized bacterial cellulose derivatives and nanocomposites. *Carbohyd Polym* **101**: 1043–1060.

Huang Y., Zhu C. L., Yang J. Z., Nie Y., Chen C. T., Sun D. P. (2014b) Recent advances in bacterial cellulose. *Cellulose* **21**: 1–30.

Iguchi M., Yamanaka S., Budhiono A. (2000) Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts. *J Mater Sci* **35**: 261–270.

Jesus E. G., Andres R. M., Mango E. T. (1971) Study on the isolation and screening of microorganisms for production of diverse-textured nata. *Philipp. J. Sci.* **100**: 41-51.

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

Jung J. Y., Khan T., Park J. K., Chang H. N. (2007) Production of bacterial cellulose by Gluconacetobacter hansenii using a novel bioreactor equipped with a spin filter. *Korean J Chem Eng* **24**: 265–271.

Kim Y. J., Kim J. N., Wee Y. J., Park D. H., Ryu H. W. (2007) Bacterial cellulose production by Gluconacetobacter sp. RKY5 in a rotary biofilm contactor. *Appl Biochem Biotechnol* **137**: 529–537.

Kingkaew J., Kirdponpattara S., Sanchavanakit N., Pavasant P., Phisalaphong M. (2014) Effect of molecular weight of chitosan on antimicrobial properties and tissue compatibility of chitosan-impregnated bacterial cellulose films. *Biotechnol Bioprocess Eng* **19**: 534–544.

Klemm D., Schumann D., Udhardt U., Marsch S. (2001) Bacterial synthesized cellulose—artificial blood vessels for microsurgery. *Prog Polym Sci* **26**: 1561–1603.

Krystynowicz A., Czaja W., Wiktorowska-Jezierska A., Gonçalves-Miśkiewicz M., Turkiewicz M., Bielecki S. (2002) Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *J Ind Microbiol Biot* **29**: 189–195.

Lapas M. M., Gallardo E. G., Palo, M. A. (1967) The nata organism cultural, characteristics and identity. *Philipp. J. Sci*. **96**: 91-109.

Lee K.-Y., Bismarck A. (2012) Susceptibility of never-dried and freeze-dried bacterial cellulose towards esterification with organic acid. *Cellulose* **19**: 891–900.

Lin S. P., Hsieh S. C., Chen K. I., Demirci A., Cheng K. C. (2014) Semicontinuous bacterial cellulose production in a rotating disk bioreactor and its materials properties analysis. *Cellulose* **21**: 835–844.

Lin W. C., Lien C. C., Yeh H. J., Yu C. M., Hsu S. H. (2013b) Bacterial cellulose and bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications. *Carbohyd Polym* **94**: 603–611.

Mark H., Susich G. V. (1929) Über den Bau des kristallisierten Anteils der Cellulose III. *Z. Physikal. Chem. (B)* **4**: 431-439.

Marx-Figini M., Pion B. (1976) Kinetic investigation on biosynthesis of bacterial cellulose, 2. Distribution of the degree of polymerization of different numbers of bacterial generations. *Makromol. Chem.,* **177**: 1013-1020.

Marx-Figini M., Pion B. G. (1974) Kinetic investigation of biosynthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum.* Biochimica Biophysica Acta **338**, 382-393.

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

Matthysse A. G., Marry M., Krall L., Kaye M., Ramey B. E., Fuqua C., White A. R. (2005) The effect of cellulose overproduction on binding and biofilm formation on roots by Agrobacterium tumefaciens. *Mol Plant-Microbe Interact* **18**: 1002–1010.

Miao C. W., Hamad W. Y. (2013) Cellulose reinforced polymer composites and nanocomposites: a critical review. *Cellulose***20**: 2221–2262.

Muller D., Mandelli J. S., Marins J. A., Soares B. G., Porto L. M., Rambo C. R., Barra G. M. O. (2012) Electrically conducting nanocomposites: preparation and properties of polyaniline (PAni)-coated bacterial cellulose nanofibers (BC). *Cellulose***19**: 1645–1654.

Nevell T. P., Zeronian S. H. (1995) *Cellulose Chemistry and Applications*, Howrwood,str. 15-29.

Nishi Y., Uryu M., Yamanaka S., Watanabe K., Kitamura K., Iguchi M., Mitsuhashi S. (1990) The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. *Journal of Materials Science,* **25**: 2997-3001.

Okajima K., Matsuda Y., Kamide K. (1991) Study on change in the degree of polymerisation of bacterial cellulose produced by *Acetobacter xylinum* during its cultivation. *Polymer International,* **25**: 145-151.

Palaninathan V., Chauhan N., Poulose A. C., Raveendran S., Mizuki T., Hasumura T., Fukuda T., Morimoto H., Yoshida Y., Maekawa T., Kumar D. S. (2014) Acetosulfation of bacterial cellulose: an unexplored promising incipient candidate for highly transparent thin film. *Mater Express* **4**: 415–421.

Pecoraro E., Manzani D., Messaddeq Y., Ribeiro S. J. L. (2007) Bacterial cellulose from *Gluconacetobacter xylinus*: preparation, properties and applications. U: Gandini MNBA (ed) Monomers, polymers and composites from renewable resources. Elsevier, Amsterdam,str. 369–383.

Ramani D., Sastry T. P. (2014) Bacterial cellulose-reinforced hydroxyapatite functionalized graphene oxide: a potential osteoinductive composite. *Cellulose***21**: 3585–3595.

Ring G. J. F. (1982) A Study of the Polymerization Kinetics of Bacterial Cellulose through Gel-Permeation Chromatography. U: Cellulose and Other Natural Polym., Brown R. M., ur., Plenum, New York, str. 299-325.

Robledo M., Rivera L., Jimenez-Zurdo J. I., Rivas R., Dazzo F., Velazquez E., Martinez-Molina E., Hirsch A. M., Mateos P. F. (2012) Role of Rhizobium endoglucanase CelC2 in cellulose biosynthesis and biofilm formation on plant roots and abiotic surfaces. *Microb Cell Fact***11**: 125-137.

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

Santos S. M., Carbajo J. M., Quintana E., Ibarra D., Gomez N., Ladero M., Eugenio M. E., Villar J. C. (2015) Characterization of purified bacterial cellulose focused on its use on paper restoration. *Carbohyd Polym* **116**: 173–181.

Scherner M., Reutter S., Klemm D., Sterner-Kock A., Guschlbauer M., Richter T., Langebartels G., Madershahian N., Wahlers T., Wippermann J. (2014) In vivo application of tissue-engineered blood vessels of bacterial cellulose as small arterial substitutes: proof of concept? *J Surg Res***189**: 340–347.

Schramm M., Hestrin S. (1954) Factors affecting Production of Cellulose at the Air/Liquid Interface of a Culture of *Acetobacter xylinum. J. Gen. Microbiol.* **11**: 123-129.

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

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

Sisson A. W. (1936) X-ray Studies of Crystallite Orientation in Cellulose Fibers. II. Synthetic Fibers from Bacterial Cellulose Membranes. *J. Phys. Chem.* **40**: 343-359.

Song H. J., Li H. X., Seo J. H., Kim M.J., Kim S. J. (2009) Pilot-scale production of bacterial cellulose by a spherical type bubble column bioreactor using saccharified food wastes. *Korean J Chem Eng***26**: 141–146.

Spence K. L., Venditti R. A., Rojas O. J., Habibi Y., Pawlak J. J. (2010) The effect of chemical composition on microfibrillar cellulose films from wood pulps: water interactions and physical properties for packaging applications. *Cellulose* **17**: 835–848.

Ude S., Arnold D. L., Moon C. D., Timms-Wilson T., Spiers A. J. (2006) Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental Pseudomonas isolates. *Environ Microbiol* **8**: 1997–2011.

Ul-Islam M., Khattak W., Kang M., Kim S., Khan T., Park J. (2013b) Effect of post-synthetic processing conditions on structural variations and applications of bacterial cellulose. *Cellulose* **20**: 253–263.

Valla S., Kjosbakken J. (1982) Cellulose-negative Mutants of *Acetobacter xylinum. J. Gen. Microbiol.* **128**: 1401-1408.

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

Vitta S., Thiruvengadam V. (2012) Multifunctional bacterial cellulose and nanoparticle-embedded composites. *Curr Sci* **102**: 1398–1405.

Watanabe K., Yamanaka S. (1995) Effects of Oxygen Tension in the Gaseous Phase of Production and Physical Properties of Bacterial Cellulose Formed under Static Culture Conditions. *Biosci. Biochem.*, **59**: 65-68.

William W. S., Cannon R. E. (1989) Alternative Environmental Roles for Cellulose Produced by *Acetobacter xylinum. Appl. Env. Microbiol.* **55**: 2448-2452.

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

Yang Y., Jia J. J., Xing J. R., Chen J. B., Lu S. M. (2013) Isolation and characteristics analysis of a novel high bacterial cellulose producing strain Gluconacetobacter intermedius CIs26. *Carbohyd Polym* **92**: 2012–2017.

Yoon S. H., Jin H. J., Kook M. C., Pyun Y. R. (2006) Electrically conductive bacterial cellulose by incorporation of carbon nanotubes. *Biomacromolecules***7**: 1280–1284.

Yoshinaga F., Tonouchi K., Watanabe K. (1997) Research Progress in Production of Bacterial Cellulose by Aeration and Agitation Culture and Its Application as a New Industrial Material. *Biosci. Biotechnol. Biochem.***61**: 219-224.

Zaar K. (1977) Biogenesis of cellulose by *Acetobacter xylinum. Cytobiologie* **16**: 1-15.

Zhang W., Chen S. Y., Hu W. L., Zhou B. H., Yang Z. H., Yin N., Wang H. P. (2011) Facile fabrication of flexible magnetic nanohybrid membrane with amphiphobic surface based on bacterial cellulose. *Carbohyd Polym***86**: 1760–1767.

Zimmermann T., Bordeanu .N, Strub E. (2010) Properties of nanofibrillated cellulose from different raw materials and its reinforcement potential. *Carbohyd Polym***79**: 1086– 1093.

Izjava o izvornosti

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

Kristina Čondić

ime i prezime studenta