

Biosinteza bakterijske nanoceluloze (BNC) i antimikrobna aktivnost fermentirane kokosove vode *kombuchom*

Sažetak

Bakterijska nanoceluloza (BNC) je obnovljiva prirodna polimerna sirovina koju karakteriziraju izvrsna svojstva poput visoke kristaliničnosti i stupnja polimerizacije, hidrofilnosti, kiralnosti, biorazgradivosti, te sposobnosti stvaranja različitih morfologija polukristaliničnih vlakana. U ovom je radu istraživana uzgoj kombuche u aerobnim uvjetima tijekom 14 dana fermentacije u kokosovoj vodi na sobnoj temperaturi, pri različitim koncentracijama saharoze. Praćene su promjene pH vrijednosti, koncentracije etanola, octene, glukonske i mliječne kiseline, kao i prinos BNC. Istraživana je kinetika otpuštanja vode iz sintetizirane BNC, a rezultati su potvrdili da su uzorci pogodni za zacjeljivanje rana na koži. Antimikrobna aktivnost kombuche je testirana na bakterijama *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* i *Bacillus subtilis*, te kvascu vrste *Candida albicans*. Uočena je antimikrobna aktivnost fermentirane kokosove vode na bakterije, no ne u potpunosti i na kvasac *C. albicans*.

Ključne riječi: bakterijska nanoceluloza, kombucha, organske kiseline, kinetika otpuštanja vode, antimikrobna aktivnost

Uvod

Biomaterijali imaju vitalnu ulogu u svakodnevnom životu ljudi (Czaja i sur., 2007; Ratner i Bryant, 2004). Važnost biopolimera u prehrambenoj industriji, kao i u medicini sve više dobiva na važnosti (Ellis i Smith, 2008; Jay i sur., 2008). Celuloza je najzastupljeniji biopolimer na zemlji s godišnjom proizvodnjom od $1,5 \times 10^{12}$ tona (Czaja i sur., 2004; Klemm i sur., 2005) i uglavnom se dobiva obradom biljne biomase (Siró i Plackett, 2010).

Bakterijska nanoceluloza (BNC) 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 (Chawla i sur., 2009; Ullah i sur., 2016).

Kombucha je nutritivno vrijedni fermentirani tradicionalni napitak koji se konzumira za poboljšanje zdravlja jer su rezultati istraživanja pokazali da pomaže pri određenim zdravstvenim tegobama, kao što su artritis, različiti tipovi karcinoma, te bolesti jetre (Sreeramulu i sur., 2000; Pauline i sur., 2001). Tradicionalno se proizvodi s crnim ili zelenim čajem zaslađenim saharozom u koji je, kao starter kultura, naciepljena združena, odnosno simbiotska kultura bakterija octene kiseline i raznih vrsta osmofilnih kvasaca, a fermentacija se provodi tijekom 10-14 dana (Teoh i sur., 2004).

Napitak dobiven fermentacijom, ovisno o koncentraciji dodanog šećera, osvježavajuće je slatkast, blago kiselkast, lagano pjenušav poput jabukovače, a zbog njegovih nutritivnih, bioloških i ekoloških vrijednosti, preporučuje se svakodnevna konzumacija u malim količinama (Blanc, 1996). Smatra se da je prvi put proizveden u Kini, no *kombucha* se danas na tradicionalni način proizvodi u mnogim kućanstvima diljem Europe, sjeverne Amerike i Sjeverne Afrike. U posljednje vrijeme se u razvijenim zemljama povećala zainteresiranost za ovim napitkom, što je prepoznala i prehrambena industrija, pa se u trgovinama zdrave hrane mogu naći komercijalni proizvodi novije generacije (Malbaša i sur., 2008).

1 izv. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan, Vili Nemeč, red. prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek, Sveučilište u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Hrvatska
Autor za korespondenciju: sunbel@pbf.hr

Tijekom fermentacije, bakterije i kvasci metaboliziraju saharozu ili neki drugi izvor ugljika do različitih organskih kiselina, octene i glukonske u većim koncentracijama, a glukuronske, mliječne i limunske u manjim jer njihove koncentracije ne prelaze 1 g/L (Jayabalan i sur., 2007).

Na površini napitka se svakodnevno sintetizira tanki sloj plutajuće pelikule (opne), odnosno BNC koja s vremenom fermentacije dobiva na volumenu i površini (Chen i Liu, 2000). BNC ima širok raspon primjena u biomedicini i prehrani zbog svoje visoke čistoće i jedinstvenih fizikalno-kemijskih svojstava (Dufresne, 2013). U prehrambenoj industriji, BNC se koristi u proizvodnji hrane, dijetalnih vlakna, kao sredstvo za zgušnjavanje i stabilizaciju, te za povezivanje različitih vrsta proizvoda (Okiyama i sur., 1993).

U ovom radu su istraživane biokemijske promjene koje su posljedica biotransformacije simbiotski združene kulture bakterija octene kiseline i kvasaca u fermentirani napitak (*kombucha*) i sintezu BNC. Uzgoj je proveden u statičnim uvjetima na sobnoj temperaturi tijekom 14 dana u kompleksnoj podlozi (kokosova voda), a glavni izvor ugljika bila je saharoza (bijeli konzumni šećer) pri različitim koncentracijama (40, 60, 80, 100 i 120 g/L). Istraživani su ključni čimbenici koji utječu na sintezu BNC, a poglavito se to odnosi na udjel izvora ugljika, nastajanje organskih kiselina (octena, glukonska i mliječna) i etanola, kao i na antimikrobnu aktivnost fermentiranog *kombucha* napitka.

Materijali i metode

Priprava *kombuche*

Komercijalna starter kultura *kombuche* pripravljena je uzgojem u zelenom čaju (Franck d.d., Hrvatska) uz dodatak 100 g/L saharoze. Uzgoj je trajao 8 dana u aseptičnim uvjetima pri 28 °C u termostatu. Nakon toga je uzgojena *kombucha* (narezana steriliziranim skalpelom na komadiće podjednake mase) i 10 % (vol/vol) fermentiranog zelenog čaja, u aseptičnim uvjetima nacijepljena u 500 mL pasterizirane 100%-tne kokosove vode proizvođača Galleria Internazionale d.o.o., Nizozemska. Masene koncentracije dodane saharoze u istraživanim uzorcima bile su: 40, 60, 80, 100 i 120 g/L, a uzgoj (14 dana) je proveden u aseptičnim uvjetima u termostatu pri 28 °C, u steriliziranim staklenim teglama volumena 1 L, pokrivenim sterilnim gazama (kompresama) kako bi bila osigurana aeracija, te pričvršćenim čvrstom gumicom.

Određivanje pH vrijednosti

Uzorcima je početna pH vrijednost podešena na 4,5 s 10 M octenom kiselinom, nakon čega je promjena vrijednosti mjerena svaki dan tijekom 14 dana fermentacije. Mjerenja su provedena nakon pažljivog izuzimanja 5 mL uzorka pipetiranjem uz rub posuda, kako ne bi došlo do oštećenja plutajuće nanocelulozne pelikule na površini uzorka. Mjerenja su provedena pomoću pH metra Hanna Industrial model HI 98103 (SAD).

Određivanje koncentracije octene kiseline

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

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

gdje je:

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

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

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

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:

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

gdje je:

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

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

$V(\text{uzorka})$ = volumen uzorka (mL)

Određivanje koncentracije mliječne kiseline

U Erlenmeyer tikvicu od 200 mL stavljeno je 25 mL uzorka fermentirane kokosove vode i dodano je nekoliko kapi fenolftaleina. Ovako pripremljeni uzorak titriran je otopinom 0,1 M NaOH do prve pojave ljubičaste boje. Svaki mL 0,1 M NaOH ekvivalentan je 90,08 mg mliječne kiseline. Masena koncentracija mliječne kiseline (g/L) izračunata je prema jednadžbi:

$$\gamma(\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}) = (V(\text{NaOH}) \cdot M(\text{NaOH}) \cdot 90,08) / V(\text{uzorka}) \quad (3)$$

gdje je:

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

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

$V(\text{uzorka})$ = volumen uzorka (mL)

Određivanje alkohola kemijskom metodom

Udjel alkohola u fermentiranim uzorcima, tijekom previranja šećera do etanola i biooksidacije etanola do octene kiseline, određivan je kemijskom metodom koja se zasniva na oksidaciji alkohola s kalijevim bikromatom ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) u kiselom okolišu. Koncentracija (vol %) alkohola je izračunata prema jednadžbi:

$$\text{alkohol (vol \%)} = (10 - \frac{a}{6,9}) \cdot 2 \quad (4)$$

a = utrošak 0,1 M otopine $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (mL)

Izračunavanje prinosa nanocelulozne biomase *kombuche*

Nakon 14 dana fermentacije, plutajuće pelikule BNC, koje su formirane na površini kokosove vode, pažljivo su izvađene iz staklenih posuda i ispirane demineraliziranom vodom sve dok pH vode za ispiranje nije dostigao početnu vrijednost vode (Toda i sur., 1991).

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

$$Y_{cb} (\%) = \cdot 100 \frac{(\gamma \text{ vlažne biomase nakon fermentacije} - \gamma \text{ vlažnog inokuluma})}{(\gamma \text{ izvora C na početku fermentacije})} \quad (5)$$

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

Za određivanje brzine otpuštanja vode iz novo sintetizirane BNC nakon 14 dana fermentacije u kokosovoj vodi, mase vlažnih uzoraka mjerene su kontinuiranim vaganjem svakih 24 sata do konstantne mase tijekom 5 dana na sobnoj temperaturi. Uzorci su bili pohranjeni u Petrijevoj zdjelici, pokriveni filter papirom (Shezad i sur., 2010). Rezultati su prikazani grafički kao odnos mase otpuštene vode u određenom vremenskom periodu.

Određivanje antimikrobne aktivnosti

Antimikrobna aktivnost inhibicijom rasta odabranih test-mikroorganizama: bakterija vrsta *Escherichia coli* (3014), *Bacillus subtilis* (3002), *Staphylococcus aureus* (3048), *Salmonella typhimurium* (3064) i kvasca *Candida albicans* (3008) određivana je metodom radialne difuzije. Test-mikroorganizmi dobiveni su iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Čuvani su kao čiste kulture na odgovarajućim hranjivim podlogama pri temperaturi od 4 °C do početka pokusa.

Suspenzije stanica bakterija i kvasca (10^8 cfu/mL) nacijepljene su na hranjive podloge te im je u izbušene rupe u podlozi (visina 3 mm, promjer 4 mm) pipetom dodano 100 µL uzoraka fermentirane kokosove vode s različitim koncentracijama saharoze. Podloge su stavljene na inkubaciju 24 h pri 28 °C (kvasci) i 48 h pri 37 °C (bakterije). Tijekom inkubacije, istraživani uzorci su difundirali radialno u agar tvoreći gradijent koncentracije i, ovisno o njihovim antimikrobnim djelovanjima, inhibirali rast mikroorganizma u okolini izbušenih rupa. Prozirna zona u kojoj nema vidljivog rasta naziva se zona inhibicije (ZI) i indikacija je osjetljivosti mikroorganizma prema napitku s antimikrobnim djelovanjem. Nakon toga su očitani rezultati istraživanja, pri čemu je promatrano postoji li zona inhibicije, je li područje zamućeno ili čisto, te su mjereni promjeri nastalih zona. Svi su pokusi provedeni u tri usporedna nacijepljivanja na hranjive podloge.

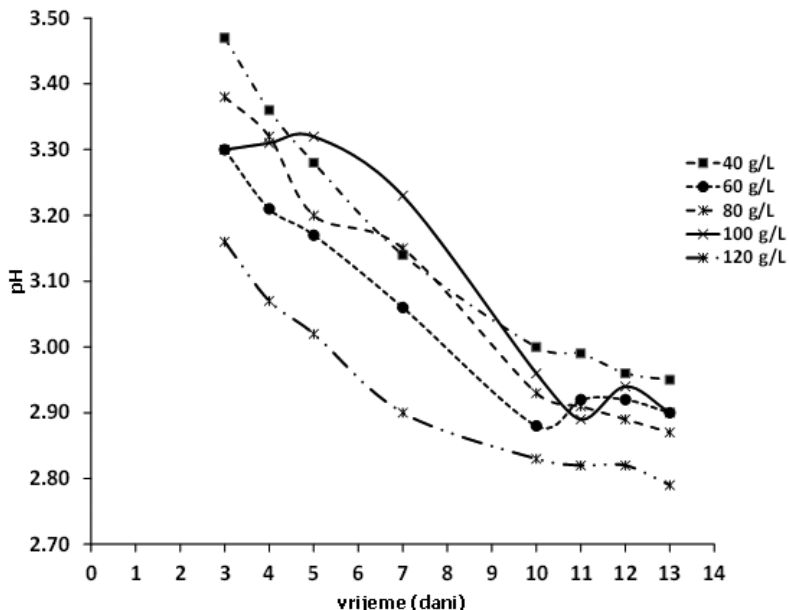
Rezultati i rasprava

U ovom su radu provedena istraživanja biokemijskih promjena koja se događaju tijekom biotransformacije simbiotički združene kulture bakterija octene kiseline i kvasaca u fermentirani napitak (kokosova voda) i BNC. Tijekom 14 dana aerobne fermentacije na sobnoj temperaturi, praćeni su različiti parametri: promjena pH vrijednosti kokosove vode, kinetika nastajanja octene, glukonske i mliječne kiseline, te smanjenja koncentracije etanola, kao i kinetika sinteze BNC, otpuštanja vode iz BNC te antimikrobno djelovanje fermentiranog *kombucha* napitka.

Promjena pH vrijednosti

Optimalna pH vrijednost za rast kvasaca iz roda *Saccharomyces* je od 4,3 do 4,8, a bakterija iz roda *Gluconacetobacter* između 5,4 i 6,3. Rast se odvija i pri nižim pH vrijednostima, od 4,0 do 4,5, no minimalni rast je zabilježen pri pH 7,0 do 8,0. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem pokazali su da su bakterije octene kiseline kao dio mikroflore *kombuche* sposobne rasti, proizvoditi organske kiseline i sintetizirati BNC čak i pri pH vrijednostima nižim od 3,0 (Grafikon 1).

Tijekom uzgoja se pH vrijednost snižava zbog nakupljanja sekundarnih metabolita, uglavnom organskih kiselina (octena, glukonska, mliječna), koje nastaju kao rezultat potrošnje izvora ugljika ili dušika. Zbog toga je u industrijskoj proizvodnji BNC izrazito važno održavanje pH podloge na vrijednosti na kojoj se postiže maksimalni prinos BNC, uz minimalnu mogućnost kontaminacije (Mikkelsen i sur., 2009). No, nastajanje organskih kiselina nije jedini razlog smanjenja pH vrijednosti *kombucha* napitaka. Postoji pH gradijent između sintetizirane pelikule BNC i fermentacijske podloge. Početna kultura (starter) BNC je prirodno kisela jer se tijekom inokulacije dodaje i određeni volumen čaja u kojem je uzgojena, te se njenom inokulacijom odmah smanjuje pH vrijednost hranjive podloge, najčešće s početne vrijednosti na pH 3 tijekom 14 dana fermentacije (Chen i Liu, 2000; Sreeramulu i sur., 2000).



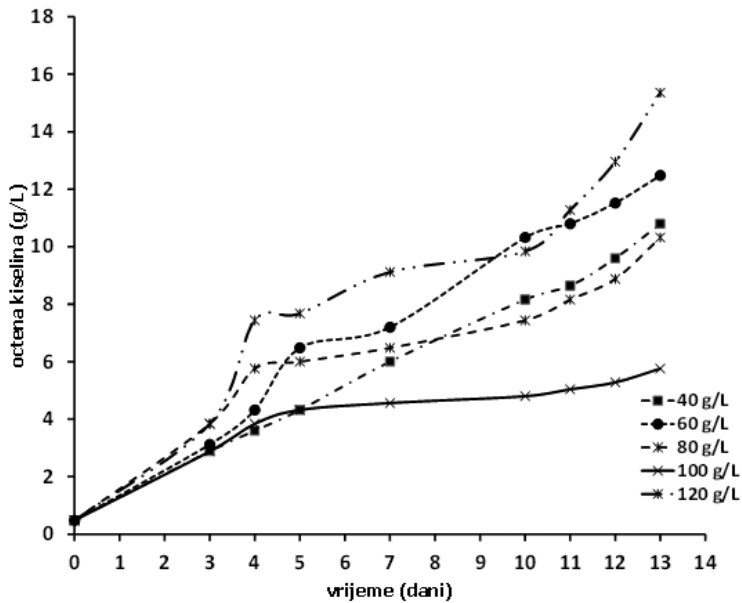
Grafikon 1. Promjene pH vrijednosti tijekom fermentacije kokosove vode s različitim masenom koncentracijom dodane saharoze

Graph. 1. Changes in pH values for the fermented coconut water with different sucrose concentrations

Promjena koncentracija organskih kiselina i etanola

Octena kiselina jedna je od glavnih metabolita tijekom fermentacije *kombuche*. Kinetika nastajanja octene kiseline tijekom fermentacije kokosove vode prikazana je na Grafikonu 2. Vidljivo je gotovo linearno povećanje koncentracije tijekom 14 dana fermentacije pri različitim koncentracijama saharoze. Najveća koncentracija na kraju procesa određena je u uzorku sa 120 g/L šećera (15,36 g/L), a najniža kod 100 g/L (5,76 g/L). Pri ostalim koncentracijama saharoze određene su relativno podjednake koncentracija octene kiseline (od 10,32 do 12,48 g/L). Dobiveni rezultati mogu se djelomično usporediti s rezultatima koje je objavio Blanc (1996), koji je u podlozi sa 70 g/L saharoze izmjerio nisku koncentraciju octene kiseline, u podlozi sa 100 g/L visoku koncentraciju, a najvišu koncentraciju u podlozi s 50 g/L saharoze. No, općenito gledano, iako i u rezultatima dobivenim u ovom radu i u istraživanju koje je proveo Blanc (1996) nema izričite podudarnosti, apsolutne vrijednosti nastale octene kiseline u oba istraživanja su bile podjednake, između 4 i 16 g/L.

Ovisno o tome želi li se proizvoditi fermentirani *kombucha* napitak ili BNC, učinak početne koncentracije izvora ugljika u podlozi je izrazito važan jer nastajanje glukonske kiseline kao sporednog proizvoda rezultira snižavanjem pH hranjive podloge, a samim tim smanjenjem brzine i produktivnost sinteze BNC (Masaoka i sur., 1993). Prema istraživanju koje je proveo Roussin (1996), uz octenu kiselinu koja je dominantna u *kombucha* napitcima, u relativno visokim koncentracijama je određena i glukonska kiselina. Autor je upozorio da i često navođena prisutnost glukuronske kiseline u različitim uzorcima *kombuche* može zavarati jer obje kiseline imaju isto retencijsko vrijeme ako se određuju mjerenjem na HPLC-u. Zaključio je da glukuronska kiselina nije tipična za *kombucha* napitke, već je to glukonska kiselina.



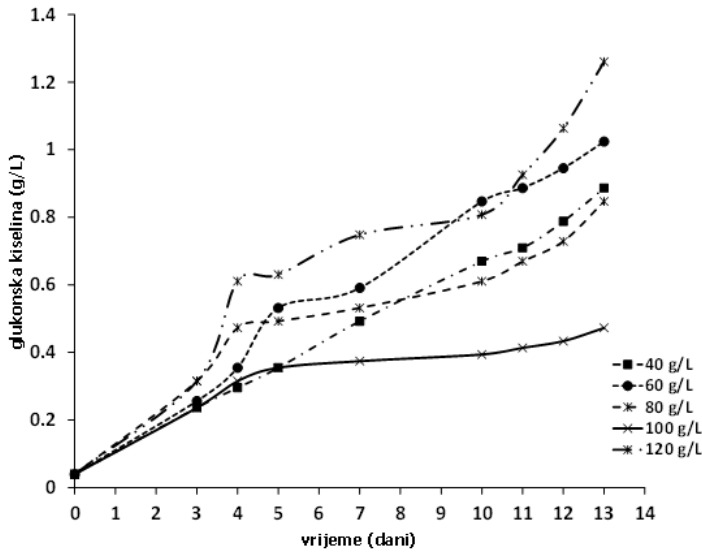
Grafikon 2. Promjene koncentracije octene kiseline tijekom fermentacije kokosove vode s različitom masenom koncentracijom dodane saharoze

Graph. 2. Changes in acetic acid concentration for the fermented coconut water with different sucrose concentrations

Rezultati prikazani na Grafikonu 3 ukazuju da je koncentracija glukonske kiseline bila 10 puta niža od koncentracije octene kiseline, no može se uočiti karakteristični linearni rast i kod jedne i druge kiseline tijekom 14 dana fermentacije kokosove vode. Ponovno je najveća koncentracija određena kod uzorka s dodanih 120 g/L saharoze (1,26 g/L), nešto niža pri 60 g/L (1,024 g/L), najniža pri 100 g/L (0,85 g/L), a u uzorcima sa 40 i 80 g/L izmjerene su vrlo slične koncentracije glukonske kiseline (0,89 i 0,87 g/L).

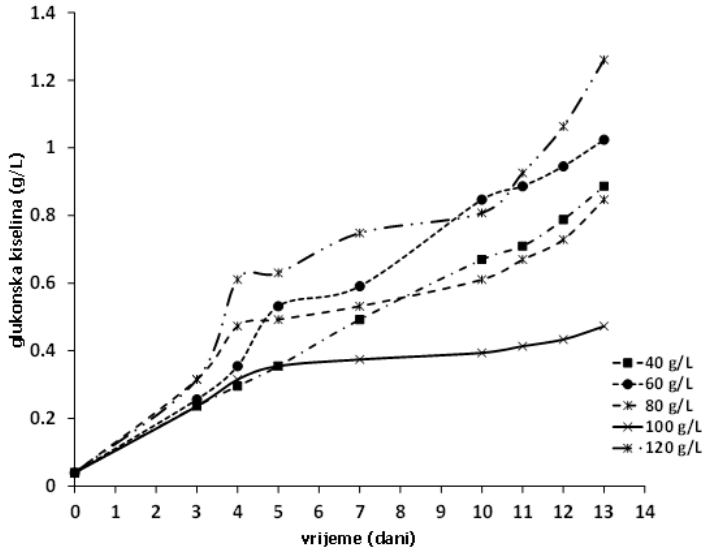
Uzorcima naciepljeni *kombuchom* uzgojeni su u statičnoj kulturi, pri čemu nije bio određivan mikrobiološki sastav uzoraka. Upravo zbog ovog razloga određeno odstupanje između dobivenih rezultata u ovom radu i objavljenih u literaturi može biti posljedica različitosti mikroflore koja je dio ekološkog izvorišta naciepljenih kultura.

Nastajanje mliječne kiseline rezultat je metabolizma bakterija mliječne kiseline, koje su u inokulumu zastupljene u malom broju, a vrlo je značajno zbog inhibicijskog djelovanja ove kiseline na patogene mikroorganizme i vrste koje izazivaju kvarenje namirnica (Magalhães i sur., 2011). Povećanje koncentracije mliječne kiseline tijekom 14 dana fermentacije prikazano je na Grafikonu 4. Kao što se može primijetiti na grafičkom prikazu, ponovno je najmanja koncentracija određena u uzorku sa 100 g/L dodane saharoze (0,024 g/L), a najveća kod 120 g/L (0,063 g/L). Pri koncentraciji šećera od 60 g/L izmjereno je 0,047 g/L mliječne kiseline, a s 40 g/L i 80 g/L saharoze su imale istu koncentraciju (0,041 g/L). Ovako niske koncentracije mliječne kiseline mogu se objasniti time što kokosova voda ne sadrži biotin kao faktor rasta i amino dušik koji su nužni za intenzivniji metabolizam *kombuche* koji bi rezultirao većim udjelom mliječne kiseline u napitku. Nadalje, bakterije mliječne kiseline su mikroaerofili, a uzgoj *kombuche* se odvija u aerobnim uvjetima zbog striktno aerobnih bakterija octene kiseline i fakultativno anaerobnih kvasaca (Malbaša i sur., 2008).



Grafikon 3. Promjene koncentracije glukonske kiseline tijekom fermentacije kokosove vode s različitim masenom koncentracijom dodane saharoze

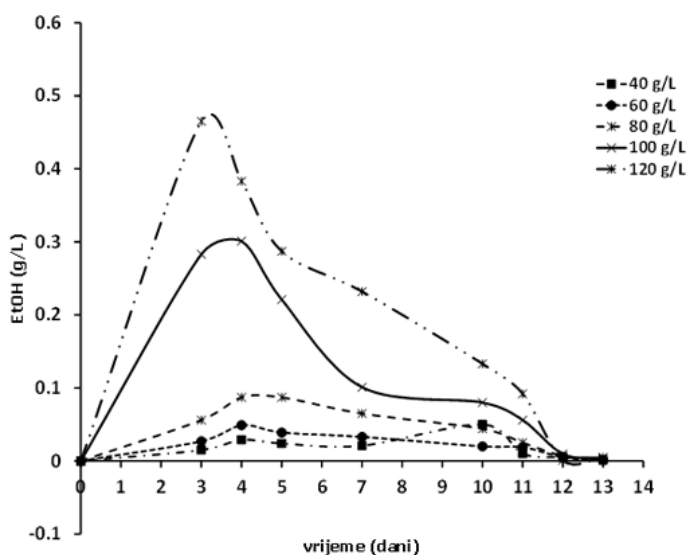
Graph. 3. Changes in gluconic acid concentration for the fermented coconut water with different sucrose concentrations



Grafikon 4. Promjene koncentracije mliječne kiseline tijekom fermentacije kokosove vode s različitim masenom koncentracijom dodane saharoze

Graph. 4. Changes in lactic acid concentration for the fermented coconut water with different sucrose concentrations

Kombucha je kompleksni napitak koji je istovremeno i zdrav i osvježavajući, te gotovo ima status „kultnog“ ili „izlječujućeg“. Na tržištu se može naći kao bezalkoholno piće, čija koncentracija etanola mora biti niža od 0,5 % vol/vol. Prema istraživanjima koje su proveli Chen i Liu (2000), koncentracija etanola se povećava u prvom dijelu fermentacije *kombuche* i postiže svoju maksimalnu vrijednost, te se nakon toga smanjuje. Do istog zaključka došao je i Reiss (1994), koji je zaključio da se nastajanje etanola povećava do maksimuma u šestom danu fermentacije, a nakon toga se smanjuje. U ovom je radu izmjereno linearno povećanje koncentracije etanola do četvrtog dana fermentacije *kombuche* u kokosovoj vodi i to kod svih koncentracija šećera (Grafikon 5). Najveće koncentracije su izmjerene kod 120 g/L (0,465 g/L) i 100 g/L saharoze (0,301 g/L), dok su pri drugim koncentracijama šećera izmjerene puno manje koncentracije etanola (od 0,029 do 0,087 g/L). Rezultati smanjenja koncentracije etanola ukazuju na biooksidaciju do octene kiseline jer je u četvrtom danu njena koncentracija naglo počela rasti (Grafikon 2).



Grafikon 5. Promjene koncentracije etanola tijekom fermentacije kokosove vode s različitim masenom koncentracijom dodane saharoze

Graph. 5. Changes in ethanol concentration for the fermented coconut water with different sucrose concentrations

Sinteza bakterijske celuloze

Jedna od prvih i vidljivih proizvoda biotransformacije zaslađenog napitka tijekom fermentacije je nanocelulozna opna (pelikula) koja se u tankom sloju oblikuje na površini tekućine (Slika 6, lijevo). Celuloznu pelikulu na površini održava CO₂ koji nastaje kao posljedica fermentativne aktivnosti kvasaca (Sievers i sur., 1995). Na površini nanocelulozne 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).



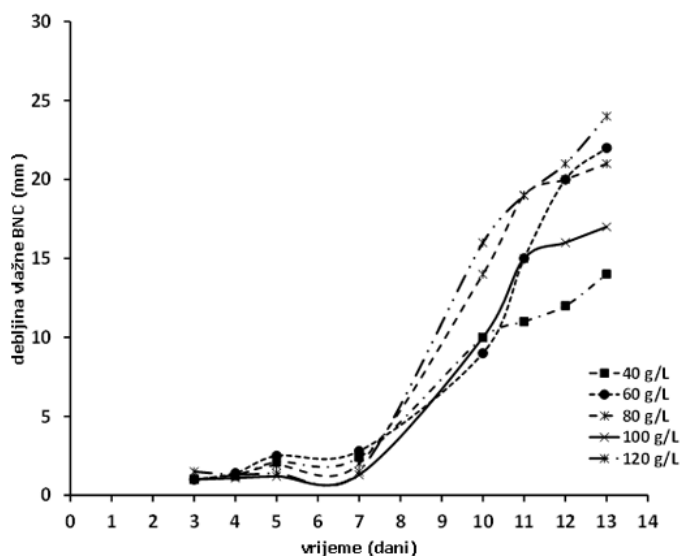
Slika 6. Sintetizirana BNC pelikula u kokosovoj vodi nakon 24 sata fermentacije (lijevo) i nakon 14 dana fermentacije (desno)

Fig. 6. BNC pelicula synthesized in coconut water after 24 hours of fermentation (left) and prolonged 14 days of fermentation (right)

Tablica 1. Prinos BNC nakon 14 dana fermentacije *kombuche* u kokosovoj vodi

Table 1. BNC yield after 14 days of *kombucha* fermentation in coconut water

Koncentracija saharoze (g/L)/ Sucrose concentration (g/L)	γ inokuluma (g/L)/ γ inoculum (g/L)	γ BNC (g/L)/ γ BNC (g/L)	Prinos (%)/ Yield (%)
40	16,14	27,02	27,21
60	24,28	35,82	19,23
80	32,07	62,65	38,23
100	40,47	49,64	9,17
120	48,02	78,68	25,55



Grafi on 7. Promjena debljine (mm) vlažne BNC tijekom 14 dana fermentacije kokosove vode

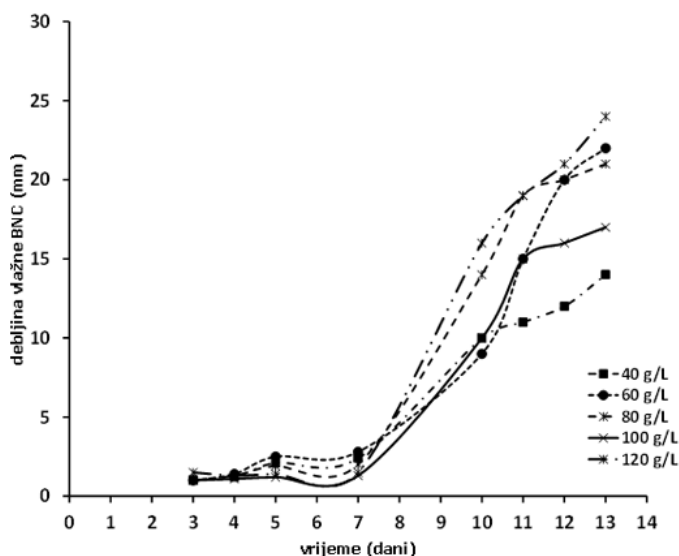
Graph. 7. Changes in wet BNC thickness (mm) during fermentation of coconut water for a period of 14 days

Prinos biomase tijekom fermentacije je usko povezan s koncentracijom izvora ugljika (Tablica 1, Grafikon 7). Prema dobivenim rezultatima, dodatkom 80 g/L saharoze u kokosovu vodu postignut je najbolji prinos vlažne BNC biomase (38,23 %) nakon 14 dana fermentacije. Iz Tablice 1 je vidljivo da je najmanji prinos BNC bio pro koncentraciji saharoze od 100 g/L (9,17 %). Prema Goh i sur. (2012), moguće objašnjenje ovakvog rezultata je neujednačena brzina prijenosa hranjiva i potrošnje supstrata, te da, ovisno o sastavu hranjive podloge, prinos BNC može varirati, bez obzira na koncentraciju dodanog izvora ugljika.

Kinetika otpuštanja vode (WRR)

Spособnost otpuštanja vode izrazito je važno svojstvo BNC za biomedicinsku primjenu kao pokrovnog materijala za rane. Velika mehanička čvrstoća u vlažnom stanju, propustljivost za tekućine i plinove, te ne izazivanje iritacija kože, čini želatinoznu membranu BNC dobrom umjetnom kožom za kratkotrajno prekrivanje površinskih kožnih ozljeda i opekline (Portela i sur., 2019).

Na Grafikonu 8 je prikazana kinetika otpuštanja vode iz uzoraka sintetiziranih u kokosovoj vodi tijekom 5 dana pokusa. Vidljivo je da je izmjereni specifični udjel vode u početku bio najveći u uzorku sa 120 g/L saharoze, slijedio je 80 g/L saharoze, u uzorku sa 100 g/L saharoze izmjerena je srednja vrijednost, a najmanja vrijednost je izmjerena u uzorcima s 40 i 60 g/L saharoze. Apsorbirana voda je nakon 6 dana iz uzoraka potpuno evaporirala (ishlapila), dok je u uzorku BNC iz podloge sa 120 g/L ostalo 2 % vode vezane u matriksu pelikule.



Grafikon 8. Brzina otpuštanja vode (5 dana) iz BNC sintetizirane nakon 14 dana fermentacije kokosove vode

Graph. 8. Water Release Rate (WRR) (5 days) from BNC synthesized after fermentation of coconut water for a period of 14 days

Izlazak molekula vode iz matriksa pelikule BNC ovisi o rasporedu mikrovlakana (Shezad i sur., 2010). Gusto pakirana mikrovlakna vežu molekule vode puno učinkovitije zbog jačih inte-

rakcija među vodikovim vezama u strukturi nanoceluloznog matriksa (Shah i sur., 2013). Prema literaturnim podacima, brzina otpuštanja vode (WRR) je jako ovisna o strukturnim značajkama BNC, posebice o veličini i ukupnom volumenu pora. Uzorci s manjim promjerima pora mogu zadržati vodu u matriksu pelikule duže vrijeme, ali veći promjer pora znači da će uzorak akumulirati više vode i time povećati kapacitet zadržavanja vode (Ul-Islam i sur., 2012).

Antimikrobna aktivnost

Mnoga dosadašnja istraživanja antimikrobne aktivnosti *kombucha* napitaka pokazala su djelovanje na široki spektar patogenih bakterija, no djelovanje na kvasce i plijesni je vrlo rijetko istraživano (Greenwalt i sur., 1998; Sreeramulu i sur., 2000), no rezultati istraživanja pokazali su da je to vjerojatno zato što su kvasci i plijesni acidofilni mikroorganizmi, a time i otporniji na organske kiseline koje nastaju tijekom fermentacije, posebice na octenu kiselinu koja nastaje u najvećoj koncentraciji (Battikh i sur., 2012).

U ovom su radu, zbog određivanja antimikrobne aktivnosti *kombuche* uzgajane u kokosovoj vodi s različitim koncentracijama dodane saharoze, uzorci testirani na hranjivim podlogama nacijepjenim s bakterijama *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* i *S. typhimurium*, te kvascem *C. albicans*. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 2. Može se uočiti da je dvostruko veća antimikrobna aktivnost postignuta prema bakterijama, pri svim koncentracijama saharoze dodane u kokosovu vodu, nego prema *C. albicans*. Najveće zone inhibicije, i kod bakterija i kod kvasca, postignute su pri koncentraciji 40 g/L, tek malo manje pri 120 g/L, dok pri 100 g/L i 120 g/L nisu postignute zone inhibicije prema kvascu *C. albicans*. Fermentirana kokosova voda s dodatkom 40 g/L saharoze pokazala se izrazito djelotvornom za inhibiciju rasta svih vrsta ispitivanih mikroorganizama.

Tablica 2. Antimikrobna aktivnost fermentirane kokosove vode pomoću *kombuche*
Table 2. Antimicrobial activity of *kombucha* fermented coconut water

Koncentracija saharoze (g/L) /Sucrose concentration (g/L)	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>C. albicans</i>
	Zone inhibicije (mm)/Zones of inhibition (mm)				
40	33	20	-	23	14
60	28	24	-	23	13
80	28	22	-	22	11
100	25	16	-	15	-
120	32	24	-	24	-

Zaključak

Posljednjih godina intenzivno se vrše istraživanja usredotočena na uporabu prirodnih polimera (biomase) kao obnovljivih izvora energije. Prirodni polimeri obilno su dostupni zahvaljujući raznolikosti prirodnih organizama sa specifičnim svojstvima koji mogu zadovoljiti potrebe za njima u svakodnevnom životu. BNC je u spektru polimernih materijala izazvala izrazitu pažnju među istraživačima, zahvaljujući dostupnosti i jedinstvenim svojstvima, te širokom rasponu primjene u biomedicini, prehrambenoj, papirnoj i tekstilnoj industriji, no njena sveobuhvatna primjena još uvijek nije u potpunosti istražena. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem pokazali su da je koncentracija saharoze, koja je uporabljena kao jedini izvor ugljika, značajno utjecala na udjel organskih kiselina u *kombucha* napitku, kao i na prinos sintetizirane BNC.

Literatura

- Battikh, H., Bakhrouf, A., Ammar, E. (2012) Antimicrobial effect of Kombucha analogues. *LWT – Food Science and Technology*, 47, 71–77.
DOI: 10.1016/j.lwt.2011.12.033
- Blanc, P. J. (1996) Characterization of the tea fungus metabolites. *Biotechnology Letters*, 18(2), 139–142.
- Chawla, P. R., Bajaj, I. B., Survase, S. A., Singhal, R. S. (2009) Microbial Cellululose: Fermentative Production and Application. *Food Technology and Biotechnology*, 47(2), 107–124.
- Chen, C., Liu, B. Y. (2000) Changes in major components of tea fungus metanolites during prolonged fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 834–839. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.01188
- Czaja, W., Romanovicz, D., Brown, M. R. (2004) Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose*, 11, 403–411. DOI: 10.1023/B:CELL.0000046412.11983.61
- Czaja, W. K., Young, D. J., Kawecky, M., Brown, R. M. (2007) The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules*, 8, 1–12.
DOI: 10.1021/bm060620d
- Dufresne, A. (2013) Nanocellulose: a new ageless bionanomaterial. *Biomaterials*, 16 (6), 220–227. DOI: 10.1016/j.mattod.2013.06.004
- Ellis, B., Smith, R. (2008) *Polymers: a property database*. CRC Press, Boca Raton.
- Goh, W. N., Rosma, A., Kaur, B., Fazilah, A., Karim, A. A., Bhat, R. (2012) Fermentation of black tea broth (Kombucha): 1. Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose. *International Food Research Journal*, 19(1), 109–117.
- Greenwalt, C. J., Letford, R. A., Steinkraus, K. H. (1998) Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea kombucha. *LWT – Food Science and Technology*, 31, 291 – 296.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., Golden, D. A. (2008) *Modern food microbiology*. Springer, New York.
- Jayabalan, R., Marimuthu, S., Swaminathan, K. (2007) Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*, 102, 392–398. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.05.032
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P., Bohn, A. (2005) Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie International Edition*, 44, 3358–3393. DOI: 10.1002/anie.200460587
- Malbaša, R., Lončar, E., Djurić, M., Došenović, I. (2008) Effect of sucrose concentration on the products of Kombucha fermentation on molasses. *Food Chemistry*, 108, 926–932. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.11.069
- Magalhães, K. T., Pereira, G. V. M., Campos, C. R., Dragone, G., Schwan, R. F. (2011) Brazilian Kefir: Structure, Microbial Communities and Chemical Composition. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 693–702. DOI: 10.1590/S1517-838220110002000034
- Masaoka, S., Ohe, T., Sakota, N. (1993) Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. *Journal of Fermentation and Bioenergy*, 75, 18–22.
- Mikkelsen, D., Flanagan, B. M., Dykes, G. A., Gidley, M. J. (2009) Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 576 – 583. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04226.x
- Okiyama, A., Motoki, M., Yamanka, S. M. (1993) Bacterial cellulose III. Development of a new form of cellulose. *Food Hydrocolloids*, 6, 493–501.
- Pauline, T., Dipti, P., Anju, B., Kavimani, S., Sharma, S. K., Kain, A. K., Sarada, S. K. S., Sairam, M., Ilavazhagan, G., Kumar, D., Selvamurthy, W. (2001) Studies on toxicity; anti-stress and hepatoprotective properties of Kombucha tea. *Biomedical and Environmental Sciences*, 14, 207–213.
- Portela, R., Leal, C. T., Almeida, P. L., Sobral, R. G. (2019) Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications. *Microbial Biotechnology*, 12(4), 586–610. DOI: 10.1111/1751-7915.13392
- Ratner, B. D., Bryant, S. J. (2004) Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annual Reviews of Biomedical Engineering*, 6, 41–75.
DOI: 10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140027
- Reiss, J. (1994) Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Food Research and Technology*, 198, 258–261.
- Roussim, M. R. (1996) *Analyses of Kombucha ferments report on growers*. Information Resources, LC, Salt Lake City, Utah.
- Shah, N., Ul-Islam, M., Khattak, W. A., Park, J. K. (2013) Overview of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material. *Carbohydrate Polymers*, 98, 1585 – 1598. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.08.018
- Shezad, O., Khan, S., Khan, T., Park, J. K. (2010) Physicochemical and mechanical characterization of bacterial cellulose produced with an excellent productivity in static conditions using a simplefed-batch cultivation strategy. *Carbohydrate Polymers*, 82, 173–180. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.04.052
- Siro, I., Plackett, D. (2010) Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. *Cellulose*, 17, 459–494. DOI:10.1007/s10570-010-9405-y
- Sievers, M., Lanini, C., Weber, A., Schuler-Schmid, U., Teuber, M. (1995) Microbiology and fermentation balance in kombucha beverage obtained from a tea fungus fermentation. *Systematic and Applied Microbiology*, 18, 590–594.
- Sreeramulu, G., Zhu, Y., Knool, W. (2000) Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *Journal of Agriculture*

and *Food Chemistry*, 48, 2589-2594.

DOI: 10.1021/jf991333m

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

DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.020

Toda, M., Okubo, S., Hiyoshi, R., Tadakatsu, S. (1991) The bactericidal activity of tea and coffee. *Letters of Applied Microbiology*, 8, 123-125.

Ullah, M. W., Ul-Islam, M., Khan, S., Kim, Y., Park, J. K. (2016). Structural and physico-mechanical characterization of bio-cellulose produced by a cell-free system. *Carbohydrate Polymers*, 136, 908–916. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.10.010

Ul-Islam, M., Khattak, W., Kang, M., Kim S., Khan, T., Park J. (2012) Effect of post-synthetic processing conditions on structural variations and applications of bacterial cellulose. *Cellulose*, 20, 253–263. DOI: 10.1007/s10570-012-9799-9

Prispjelo/Received: 4.6.2020.

Prihvaćeno/Accepted: 1.7.2020.

Original scientific paper

Bacterial nanocellulose (BNC) biosynthesis, and antimicrobial activity of kombucha in fermented coconut water

Abstract

*Bacterial nanoellulose (BNC) is a sustainable natural polymeric raw material characterized by exciting properties such as hydrophilicity, chirality, biodegradability, broad chemical-modifying capacity, and the formation of different semicrystalline fiber morphologies. This work studies cultivation of kombucha in aerobic conditions over a period up to 14 days of fermentation in coconut water, at room temperature with different sucrose concentrations added. Changes in pH value, ethanol, acetic acid, gluconic acid, and lactic acid concentrations were observed, as well as yield of BNC. The water release rate (WRR) were investigated, and the results supported its anticipated use as antimicrobial wound dressing material. The antimicrobial activity of kombucha was tested against bacteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* and *Bacillus subtilis*, as well as yeast *Candida albicans*. Antimicrobial activity of coconut water was observed in the fermented samples against all the investigated bacteria strains, but not completely against yeast *Candida albicans*.*

Keywords: *Bacterial nanocellulose, Kombucha, Organic acids, Water release kinetics, Antimicrobial activity*