Fermentacija i antimikrobna aktivnost kombucha crnog, zelenog, bijelog i voćnog čaja

Moharić, Lidia

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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:159:623477

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

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

LIDIA MOHARIĆ
6444/BT

Fermentacija i antimikrobna aktivnost *kombucha* crnog, zelenog, bijelog i voćnog čaja

ZAVRŠNI RAD

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

Zagreb, 2015.

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.

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

FERMENTACIJA I ANTIMIKROBNA AKTIVNOST *KOMBUCHA* ČAJA

Lidia Moharić, 6444/BT

Sažetak: *Kombucha* je odavno poznati osvježavajući napitak dobiven fermentacijom čaja, uz dodatak šećera i simbiotički združene kulture bakterija octene kiseline i kvasaca. Ovaj se napitak stoljećima intenzivno konzumira diljem cijelog svijeta zbog svojih profilaktičkih i terapeutskih svojstava. U ovom su radu pripremljene infuzije crnog, zelenog, bijelog i voćnog čaja (5 g/L), zaslađene sa 70 g/L saharoze, te fermentirane pomoću *kombuche* tijekom 35 dana pri 28 ^{o}C. Uočeno je da su promjene pH vrijednosti bile povezane sa simbiotskim metaboličkim aktivnostima kvasaca i bakterija octene kiseline. Debljina i prinos bakterijske celuloze povećala se tijekom fermentacije. Uočena je antimikrobna aktivnost *kombuche* na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije (*Streptococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium*), no ne i na kvasac *Candida albicans*.

Ključne riječi: fermentirani čaj, *kombucha,* antimikrobna aktivnost
Rad sadrži: 35 stranica, 11 slika, 4 tablice, 88 literaturnih navoda
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.
Mentor: *Izv. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan*

Rad predan: rujan, 2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biochemical Engineering,
Industrial Microbiology, Malting and Brewing Technology

KOMBUCHA TEA FERMENTATION AND ITS ANTIMICROBIAL ACTIVITY

Lidia Moharić, 6444/BT

Abstract: *Kombucha* is a traditional refreshing beverage obtained by the fermentation of sugared tea with a powerful symbiosis of acetic bacteria and yeasts. This drink has been extensively consumed for a long time worldwide for its prophylactic and therapeutic properties. In this present study, the tea broths produced with black, green, white and fruit teas (5 g/L) were fermented naturally at 28 ^{o}C with *kombucha* over a period of up to 35 days in the presence of 70 g/L sucrose. Changes in pH were related to the symbiotic metabolic activities of yeasts and acetic acid bacteria. The thickness and yield of bacterial cellulose increased with fermentation time. Antimicrobial activities were observed in the fermented samples against the tested Gram-positive and Gram-negative organisms (*Streptococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*), but *Candida albicans* was not inhibited by *kombucha*.

Keywords: *Fermented tea, Kombucha, Antimicrobial activity*
Thesis contains: 35 pages, 11 figures, 4 tables, 88 references
Original in: Croatian
Final work in printed and electronic (pdf format**) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb
Mentor: *Sunčica Beluhan, PhD, Associate Professor*

Final work delivered: September, 2015

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 4
2.1. *Kombucha* napitak 5
2.2 Mikroorganizmi *kombucha* čaja 7
2.3. Kemijski sastav *kombucha* čaja 9
2.4. Pozitivni učinci *kombucha* čaja 13
2.5. Antimikrobno djelovanje *kombucha* čaja 13
2.6. *Kombucha* čaj kao izvor antioksidansa 14
2.7. Biomasa *kombuche* i njezina primjena 15
3. MATERIJALI I METODE 17
3.1. Ciljevi i tijek istraživanja 18
3.2. Materijali i metode rada 19
3.2.1. Priprava kulture *kombuche* 19
3.2.2. Uporabljene vrste čaja 19
3.2.3. Priprava fermentiranih čajeva 19
3.2.4. Određivanje pH vrijednosti 20
3.2.5. Određivanje koncentracije octene kiseline 20
3.2.6. Određivanje alkohola u prevreloj komini 21
3.2.7. Antimikrobna aktivnost *kombucha* čaja 21
3.2.8. Izračunavanje mase i prinosa celulozne biomase *kombuche* 21
4. REZULTATI 17
5. RASPRAVA 30
6. ZAKLJUČCI 33
7. LITERATURA 35

1. UVOD

Kombucha je tradicionalni fermentirani napitak s poviješću dužom od nekoliko tisuća godina na istoku, a u posljednje vrijeme sve je popularniji u zapadnoj civilizaciji. Uobičajeno se pripravlja od zašećerenog fermentiranog crnog čaja sa simbiotičkom kulturom bakterija octene kiseline i kvasaca, popularno nazvanom „čajna gljiva“. Fermentacija se odvija pri sobnoj temperaturi tijekom 14 do 21-og dana (Anken i Kappel, 1992; Teoh i sur., 2004; Malbaša i sur., 2011).

Podrijetlom iz Kine, *kombucha* se tradicionalno proizvodi u mnogim kućanstvima uključujući Rusiju i Ukrajinu, fermentiranjem čajeva pomoću gljive koja se prenosi od kuće do kuće. *Kombucha* je osvježavajući napitak koji ima okus kao gazirani sok od jabuke. Tijekom fermentacije okus *kombuche* se mijenja od blago kiselog okusa s gaziranom aromom, a nakon dulje fermentacije okus postaje sličan octu (Sievers i sur., 1995; Blanc, 1996).

Kombucha se stoljećima koristila u mnogim zemljama i uočeno je nekoliko pozitivnih učinaka na zdravlje (Greenwalt i sur., 1998; Dufresne i Farnworth, 2000). Pokazalo se da konzumiranje *kombuche* pozitivno utječe na probavni, intestinalni i endokrini sustav, te može prevladati arteriosklerozu, izlučivanje toksina, dijabetes, nervozu i probleme sa starenjem. Također može djelovati kao laksativ, a poznato je da olakšava reumatizam zglobova, giht i hemoroide (Reiss, 1994; Dufresne i Farnworth, 2000; Bhattacharya i sur., 2011). Ljekoviti učinci konzumiranja *kombuche* mogu se povezati s gubitkom tjelesne mase, čak i izlječenjem raka i AIDS-a (Teoh i sur., 2004). Nedavno je pokazano da *kombucha* ima sposobnost vezanja slobodnih radikala i antioksidativnu aktivnost (Jayabalan i sur., 2008; Malbaša i sur., 2011).

Glavne vrste bakterija octene kiseline izolirane iz *kombuche* su: *Acetobacter xylinum, A. xylinoides, A. aceti, A. pasteurianus* i *Bacterium gluconicum* (Reiss, 1994; Liu i sur., 1996). Kvasci identificirani u fermentiranom čaju pripadaju vrstama *Schizosaccharomyces pombe, Saccharomyces ludwigii, Kloeckera apikulata, S. cerevisiae, Torulaspora delbrueckii, Brettanomyces bruxellensis, B. lambicus, B. cuersii* i *Candida stellata* (Teoh i sur., 2004).

Glavni metaboliti dobiveni kao nusprodukti tijekom fermentacije *kombuche* su monosaharidi i različiti oblici organskih kiselina i vitamina (Malbaša i sur., 2008). Bakterijska celuloza ima široku primjenu u hrani i biofarmaceutici zbog svoje visoke čistoće i jedinstvenih fizikalno-kemijskih značajki. Također, bakterijska celuloza pronalazi primjenu gdje se biljna celuloza ne može iskoristiti. U prehrambenoj industriji, bakterijska celuloza se koristi u proizvodnji hrane (*nata de coco*), dijetalnih vlakna, kao sredstvo za zgušnjavanje i stabilizaciju, te za povezivanje različitih vrsta proizvoda (Kent i sur., 1991; Okiyama i sur., 1993).

U ovom radu su tijekom fermentacije crnog, zelenog, bijelog i voćnog čaja s *kombuchom* praćeni slijedeći parametri:

- utjecaj vrste čaja na brzinu fermentacije
- promjena pH vrijednosti, koncentracije etanola i octene kiseline
- prinos celulozne biomase *kombuche* na kraju procesa fermentacije
- antimikrobna aktivnost *kombucha* čajeva.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. *Kombucha* napitak

Kombucha čaj je kiselo-slatki osvježavajući napitak koji se konzumira širom svijeta. Dobiva se infuzijom listova čaja i fermentacijom simbiotske kulture bakterija i kvasaca koji tvore „čajnu gljivu“ (Chen i Liu, 2000). Plutajući celulozni sloj gljive i kisela tekućina čine dva dijela *kombucha* čaja (Slika 1).



Slika 1. Biomasa *kombucha* čajne gljive na kraju fermentacije u crnom čaju (www.herbateka.eu)

Okus fermentiranog čaja je kao gazirani sok od jabuke i može se proizvesti kod kuće, pomoću naručene ili lokalno dostupne čajne gljive (*eng*. tea fungus). Iako se zeleni čaj može koristiti za proizvodnju *kombucha* čaja, crni čaj i bijeli šećer se smatraju najboljom hranjivom podlogom. *Kombucha* je prvo bila korištena u istočnoj Aziji zbog svojih ljekovitih svojstava. Podrijetlom je iz sjeveroistočne Kine (Manchuria) gdje je bila cijenjena u doba dinastije Tsin („Ling Chi“), oko 220. godine prije Krista i koristila se za detoksikaciju organizma. Liječnik Kombu je 414. godine donio gljivu u Japan i koristio ju u liječenju probavnih problema cara Inkyo. Kako se trgovina širila, *kombucha* (bivšeg trgovačkog naziva „Mo-Gu“) je našla put do Rusije (pod nazivom Cainiigrib, Cainii kvass, Japonskigrib, Kambucha, Jsakvasska), a zatim i u druge istočne dijelove Europe, pojavivši se u Njemačkoj, kao Heldenpilz, Kombuchaschwamm, na prijelazu iz 19. u 20. stoljeće. Tijekom Drugog svjetskog rata, ovaj napitak je ponovo predstavljen u Njemačkoj, a 1950. godine je dospio u Francusku i francuske kolonije sjeverne Afrike, gdje je njegova konzumacija postala vrlo popularna. Navika ispijanja fermentiranog čaja u Europi je bila uobičajena prije Drugog svjetskog rata, kad je došlo do nedostatka čaja i šećera potrebnih za proizvodnju. Nakon rata, strast talijanskog društva prema napitku dosegla je vrhunac u 1950-ima. U 1960-ima, švicarski su znanstvenici izvjestili da

konzumiranje *kombucha* čaja ima blagotvoran učinak, slično jogurtu, pa se popularnost *kombuche* povećala. Danas se različiti okusi *kombucha* čaja prodaju širom svijeta u trgovinama zdravih namirnica, a *kombucha* kultura se može kupiti i preko interneta. „Dnevnik *kombuche*“, autora Gunthera W. Franka objavljen je na internetu i dostupan je širom svijeta na trideset svjetskih jezika (Dufresne i Farnworth, 2000; Hartmann i sur., 2000).

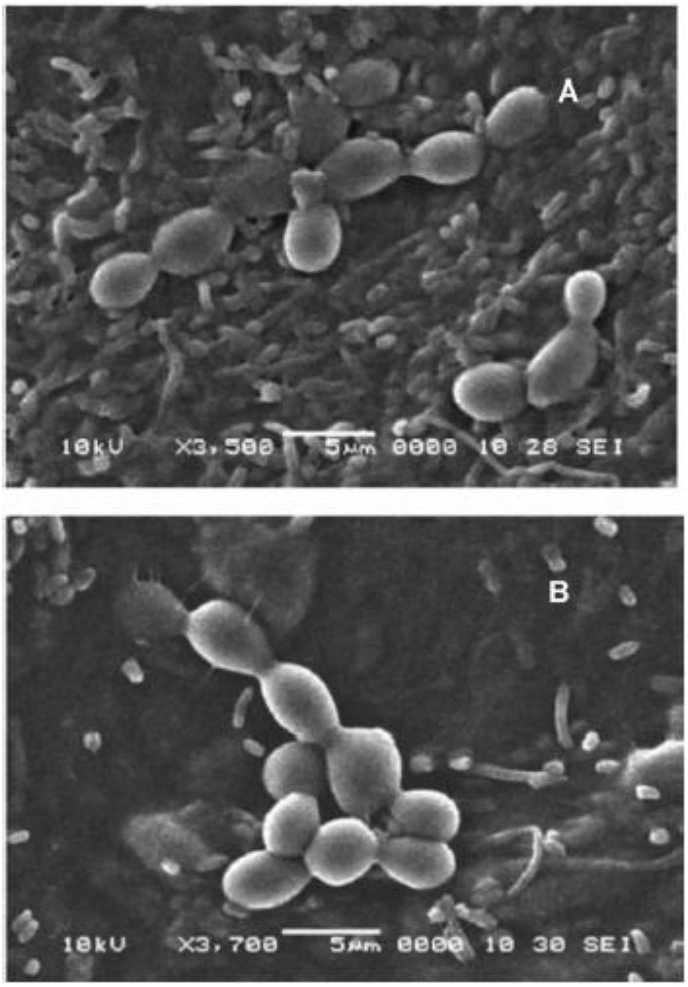
Kombucha čaj se priprema stavljanjem *kombucha* kulture u zaslađeni čaj. Ako se kultura *kombuche* uzgaja prema standardnom receptu sa crnim čajem, zaslađenim saharozom, supstrat previre u osvježavajući napitak sa visokom nutritivnom vrijednosti i pozitivnim medicinskim svojstvima (Lončar i sur., 2000). Popularnost *kombuche* se proširila, kao i mnogih tradicionalnih napitaka, zbog svojih blagotvornih učinaka na ljudsko zdravlje i mogućnosti jednostavne pripreme kod kuće. Količina čaja, šećera i čajne gljive se razlikuju u različitim mjestima. Standardna priprema je slijedeća: 1 L obične vode se skuha i umiješa se 50 g saharoze. Zatim se doda 5 g listova čaja, koji se uklone filtracijom nakon 5 minuta. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu (20 °C), čaj se inokulira sa 24 g gljive (kultura) i izlije u prethodno steriliziranu čašu (1 L). Rast nepoželjnih mikroorganizama se inhibira dodatkom 0,2 L prethodno fermentirane *kombuche*, čime se smanjuje pH. Čaša se prekrije gazom ili papirnatim ručnikom kako bi se spriječio ulazak insekata, posebno voćnih mušica iz roda *Drosophilla*. Inkubacija se provodi pri 20 °C do 22 °C. Optimalna temperatura je u širokom rasponu od 18 °C do 26 °C. Nakon nekoliko dana, novoformirana kultura kćeri počinje plutati i stvara se prozirni tanki gel poput membrane na površini čaja. To je novoformirana gljiva prisutna kao novi sloj iznad sloja stare gljive, kojom se inokuliralo kako bi započela fermentacija. Stara kultura ostaje istog volumena kao i na početku i tone na dno tekućine gdje ostaje ispod novo formirane kulture kćeri. Nakon 10 do 14 dana novoformirana gljiva se razvija na površini čaja kao disk debljine 2 cm, prekrivajući cijelu površinu čaše. Novoformirana kultura se ukloni žlicom i čuva u malom volumenu fermentiranog čaja. Ostatak napitka se filtrira i čuva u zatvorenim bocama pri temperaturi od 4 °C (Reiss, 1994). Okus *kombuche* se mijenja tijekom fermentacije, na početku je voćno kiselog okusa s gaziranom aromom, a nakon duže fermentacije okus postaje sličan octu. Koncentracija od 50 g saharoze/L pridonosi optimalnoj koncentraciji etanola i mliječne kiseline, pa se ta koncentracija šećera koristi u tradicionalnim receptima za pripremu „teakwass“ (drugi naziv za *kombuchu*) već duže vrijeme (Reiss, 1994). Potrebno je optimalno vrijeme za proizvodnju *kombucha* čaja ugodne arome i okusa. Što je vrijeme fermentacije dulje, to se proizvode veće količine kiselina (kao blagi ocat) koje mogu izazvati gastrointestinalne probleme kod pojačane konzumacije (Sreeramulu i sur., 2000).

S jedne strane, *kombucha* je hvaljena kao „ultimativni zdravi napitak“, dok ju se s druge strane smatra „nepouzdano ljekovitim čajem“ (Blanc, 1996; Hartmann i sur., 2000). Možemo govoriti o različitim zdravstvenim učincima *kombucha* napitka, ali i o njegovoj toksičnosti. Iako se tvrdi da *kombucha* pozitivno djeluje protiv nekih oboljenja, nema kliničkih dokaza koji bi to potvrdili. Studije o *kombuchi* su ranije prikazali Dufresne i Farnworth (2000), Yurkevich i Kutyshenko (2002), te Ernst (2003).

2.2 Mikroorganizmi *kombucha* čaja

Čajna gljiva ili *kombucha* je zajednički naziv dobiven simbiozom bakterija octene kiseline i osmofilnog kvasca, uzgojenih u zaslađenom čaju. Jarrell i sur. (2000) smatraju da je *kombucha* združena kultura kvasaca i bakterija (Slika 2). Čajna gljiva nije u stvari gljiva, no taj se naziv pogrešno koristi zbog bakterija koje proizvode plutajuću želatinoznu strukturu koja se pojavljuje na površini kao plijesan na mirnoj, ne miješanoj hranjivoj podlozi.

Točni mikrobiološki sastav *kombuche* ovisi o izvoru inokuluma koji se koristi za fermentaciju. Najviše prokariota u ovoj kulturi pripada rodovima *Acetobacter* i *Gluconobacter*. Glavna bakterija je *Acetobacter xylinum* (Sievers i sur., 1995). Ona proizvodi celuloznu plutajuću mrežu na površini fermentirajuće tekućine. Mreža je sekundarni metabolit fermentacije *kombuche*, ali i jedna od jedinstvenih značajki te kulture (Markov i sur., 2001). Sievers i sur. (1995) su objavili da je mikroflora ugrađena u celulozni sloj spoj kultura *A. xylinum* i *Zygosaccharomyces* sp. Glavne bakterije octene kiseline otkrivene u gljivi su *A. xylium*, *A. pasteurianus*, *A. aceti*, i *Gluconobacter oxydans* (Liu i sur., 1996). Yang i sur. (2010) su izolirali ključnu bakterijsku vrstu iz očuvane *kombuche*, *Gluconacetobacter* sp. A4 (G. sp. A4), koja ima sposobnost proizvodnje D-saharoze-1,4-laktona (DSL). Boesch i sur. (1998) su iz *kombucha* napitka izolirali i opisali sojeve novih vrsta iz roda *Acetobacter*, naročito *Acetobacter intermedius* sp. nov. Dutta i Gachhui (2006, 2007) su iz *kombucha* čaja izolirali novu nitrificirajuću bakteriju *Acetobacter nitrogenifigens* sp. nov. i nitrificirajuću bakteriju koja proizvodi celulozu *Gluconacetobacter kombuchae* sp. nov. Istraživanje koje su proveli Marsh i sur. (2014) pokazalo je da dominante bakterije iz 5 uzoraka *kombuche* (2 iz Kanade i po jedna iz Irske, Sjedinjenih Američkih Država i Ujedinjenog Kraljevstva) pripadaju vrstama iz rodova *Gluconacetobacter* (preko 85% u većini uzoraka) i *Lactobacillus* (do 30%). *Acetobacter* je prisutan u vrlo malom broju (manje od 2 %).



Slika 2. SEM slike *kombucha* združene kulture kvasca i bakterije (A – povećanje 3500x, B – povećanje 2700x) (El-Taher, 2011)

Osim bakterija octene kiseline, u *kombuchi* su prisutne i mnoge vrste kvasaca. Otkriven je širok spektar kvasaca uključujući one iz roda *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces*/*Dekkera*, *Candida*, *Torulospora*, *Koleckera*, *Pichia*, *Mycotorula*, i *Mycoderma*. Kvasci iz roda *Saccharomyces* su identificirani kao *Saccharomyces* sp. (Kozaki i sur., 1972) i kao *Saccharomyces cerevisiae* (Herrera i Calderon-Villagomez 1989; Liu i sur., 1996; Markov i sur., 2001), *Saccharomyces bisporus* (Markov i sur., 2001), *Saccharomycoides ludwigii* (Markov i sur., 2001; Ramadani i Abulreesh 2010), *Schizosaccharomyces pombe* (Teoh i sur., 2004), *Zygosaccharomyces* sp. (Sievers i sur., 1995; Markov i sur., 2001; Marsh i sur., 2014), *Zygosaccharomyces rouxii* (Herrera i Calderon-Villagomez 1989), i *Zygosaccharomyces bailii* (Herrera i Calderon-Villagomez 1989; Liu i sur., 1996; Jayabalan i sur., 2008b). Herrera i Calderon-Villagomez (1989) su izolirali *Brettanomyces intermedius*, Liu i sur. (1996) i Teoh i sur. (2004) su izolirali *B. bruxellensis*, a Jayabalan i sur. (2008b) *B. claussenii*. Istraživanja dviju komercijalnih *kombucha* i 32 kulture

iz privatnih kućanstava u Njemačkoj (Mayser i sur., 1995) pokazala su različit sastav kvasaca. Prevladavajuće vrste kvasaca bile su *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces*, i *Saccharomyces* spp.

Candida sp. je sastavni dio velikog broja *kombucha* napitaka. Kozaki i sur. (1972) su izolirali vrste *C. famata*, *C. guilliermondii* i *C. obutsa*. U uzorcima kombuche iz Meksika, Herrera i Calderon-Villagomez (1989) su otkrili *C. famata*. Teoh i sur. (2004) su identificirali *C. stellata*. Iz lokalne *kombuche* u Saudijskoj Arabiji, Ramadani i Abulreesh (2010) su izolirali i identificirali četiri vrste kvasaca: *C. guilliermondi*, *C. colleculosa*, *C. kefyr* i *C. krusei*.

Također je potvrđena prisutnost sljedećih rodova kvasaca: *Torula* i *Torulopsis* (Herrera i Calderon-Villagomez 1989; Markov i sur., 2001), *Torulaspora delbrueckii* (Teoh i sur., 2004), *Mycotorula* (Konovalov i sur., 1959), *Mycoderma*, *Pichia*, *Pichia membranefaciens* (Herrera i Calderon-Villagomez, 1989), *Kloeckera apiculata* i *Kluyveromyces africanus* (Safak i sur., 2002).

2.3. Kemijski sastav *kombucha* čaja

Kemijska analiza *kombucha* napitaka pokazala je prisutnost različitih organskih kiselina (octene, glukonske, glukuronske, limunske, L-mliječne, jabučne, vinske, oksalne, jantarne, pirogrožđane), šećera (saharoza, glukoza i fruktoza), vitamina (B_1, B_2, B_6, B_{12} i C), 14 aminokiselina, biogenih amina, purina, pigmenata, lipida, proteina, hidrolitičkih enzima, etanola, antibiotički aktivnih supstanci, ugljikovog dioksida, fenola kao i nekih polifenola iz čaja, minerala, aniona, DSL-a, kao i nedovoljno poznatih produkata metabolizma kvasaca i bakterija. Istraživanja napitka su uvijek provođena u statičkim uvjetima (Hauser, 1990; Sievers i sur., 1995; Blanc, 1996; Liu i sur., 1996; Bauer-Petrovska i Petrushevska-Tozi, 2000; Chen i Liu, 2000; Lončar i sur., 2000; Malbaša i sur., 2002a, 2008a, 2008b, 2011; Chu i Chen, 2006; Jayabalan i sur., 2007, 2008a; Kumar i sur., 2008; Wang i sur., 2010; Yang i sur., 2010; Yavari i sur., 2010, 2011; Velićanski i sur., 2013).

Kvasci i bakterije u *kombuchi* su uključeni u takve metaboličke aktivnosti da koriste supstrate na različite načine. Kvasci hidroliziraju saharozu u glukozu i fruktozu pomoću invertaze i proizvode etanol putem glikolize, preferirajući fruktozu kao supstrat. Bakterije octene kiseline koriste glukozu kako bi proizvele glukonsku kiselinu i etanol iz čega proizvode octenu kiselinu. pH vrijednost *kombucha* napitka se smanjuje proizvodnjom organskih kiselina tijekom fermentacije (Dufresne i Farnworth, 2000).

Rezultati prikazani u Tablici 1. prikazuju glavne sastojke tradicionalnog *kombucha* napitka pripravljenog sa crnim čajem. Ovi podaci ukazuju na heterogenost istraživanja provedenih na *kombuchi*. Glavne razlike u istraživanim sastojcima su povezane sa trajanjem fermentacije i sastavom crnog čaja. Istraživači iz različitih dijelova svijeta (Taiwan – Chen i Liu, 2000, Srbija – Lončar i sur., 2000 i Indija – Jayabalan i sur., 2007) koristili su jednaku početnu koncentraciju saharoze (100 g/L). Istraživači su koristili različite količine *kombucha* čaja za početnu inokulaciju: 20% (Chen i Liu, 2000) i 10% (Lončar i sur., 2000; Malbaša i sur., 2002a; Jayabalan i sur., 2007). Proces fermentacije provodio se u reaktoru malog volumena (staklenki ili čaši) do 1 L. Izmjerene vrijednosti sastojaka pokazale su da primijenjeni parametri (temperatura fermentacije, vrijeme fermentacije i početna koncentracija saharoze i crnog čaja), kao i sastav *kombucha* kulture imaju utjecaj na metaboličku aktivnost čajne gljive, stoga i na krajnje produkte metabolizma.

Bakterije octene kiseline iz *kombuche* proizvode octenu kiselinu, kao jedan od glavnih metabolita, dok se saharoza koristi kao izvor ugljika. Mnogi autori su odredili sadržaj octene kiseline u napitku dobivenom nakon kultivacije *kombuche* na tradicionalan način. Chen i Liu (2000) su proveli produljenu fermentaciju *kombuche* i odredili najveću koncentraciju od 11 g/L octene kiseline nakon 30 dana. Koncentracija octene kiseline je polako rasla s vremenom, a zatim se postupno smanjila na 8 g/L na kraju fermentacije (60 dana; Tablica 1). Sličan pokus proveli su Jayabalan i sur. (2007), u kojem su pratili fermentaciju zelenog čaja do 18-tog dana zaslađenog sa 100 g/L saharoze. Najveća koncentracija octene kiseline bila je 9,5 g/L 15-tog dana. Malbaša i sur. (2008a, 2008b) su umjesto saharoze koristili melasu. Kod fermentacije *kombuche* na melasi, proizvodnja octene kiseline iznosila je samo 50% u usporedbi sa fermentacijom na saharozi u istom stupnju fermentacije. Razlog tome može biti slabi rast bakterija octene kiseline na melasi.

Glukuronske i glukonske kiseline su također glavne organske kiseline proizvedene kao posljedica fermentacije *kombuche* na tradicionalnoj podlozi. Lončar i sur. (2000) odredili su glukuronsku kiselinu nakon fermentacije zaslađenog crnog čaja. Najviša količina izmjerena je nakon 7. i 21. dana (0,0034 g/L; Tablica 1). Jayabalan i sur. (2007) izmjerili su maksimalnu vrijednost D-glukuronske kiseline od 2,33 g/L nakon 12 dana fermentacije. Chen i Liu (2000) uočili su da glukuronska kiselina nastaje tek nakon šestog dana fermentacije. Krajnja koncentracija nakon 60 dana iznosila je 39 g/L (Tablica 1).

Yavari i sur. (2010) uzgajali su *kombuchu* na soku od višnje zaslađenom sa 6 g/L, 8 g/L i 10 g/L saharoze. Glukuronska kiselina bila je proizvedena u velikoj koncentraciji od 132,5 g/L, a određena je nakon 14-tog dana fermentacije, u podlozi sa 8 g/L saharoze. Fermentacija

je provedena pri temperaturi od 37 °C. Yavari i sur. (2011) su koristili metodu odzivne površine (RSM) kako bi predvidjeli količinu glukuronske kiseline u *kombucha* napitku dobivenom nakon fermentacije grožđanog soka zaslađenog sa 7 g/L saharoze i najveća vrijednost bila je postignuta nakon 14 dana fermentacije pri 37 °C. Franco i sur. (2006) ustanovili su prisutnost glukuronske (0,07 do 9,63 g/L) i glukonske kiseline (0,04 do 1,16 g/L) u proizvodu dobivenom nakon kultivacije *kombuche* na crnom čaju zaslađenom glukozom (0,62 g/L do 15,1 g/L).

Tablica 1. Prevladavajući sastojci *kombucha* čaja na kraju fermentacije crnog zaslađenog čaja

sastojak	količina sastojka (g/L)	početna saharoza (%)	crni čaj	temperatura fermentacije (°C)	vrijeme fermentacije (d)	referenca
octena kiselina	8	10	2 vrećice	24 ± 3	60	Chen i Liu (2000)
	4,69	10	12 g/L	24 ± 3	18	Jayabalan i sur. (2007)
glukuronska	0,0031	5	1,5 g/L	28	21	Lončar i sur. (2000)
kiselina	0,0026	7	1,5 g/L	28	21	Lončar i sur. (2000)
	0,0034	10	1,5 g/L	28	21	Lončar i sur. (2000)
	1,71	10	12 g/L	24 ± 3	18	Jayabalan i sur. (2007)
glukonska kiselina	39	10	2 vrećice	24 ± 3	60	Chen i Liu (2000)
glukoza	179,5	7	1,5 g/L	28	21	Malbaša i sur. (2002a)
	24,59	7	1,5 g/L	28	21	Lončar i sur. (2000)
	12	10	2 vrećice	24 ± 3	60	Chen i Liu (2000)
fruktoza	76,9	7	1,5 g/L	28	21	Malbaša i sur. (2002a)
	5,40	7	1,5 g/L	28	21	Lončar i sur. (2000)
	55	10	2 vrećice	24 ± 3	60	Chen i Liu (2000)
ostatak	192,8	7	1,5 g/L	28	21	Malbaša i sur. (2002a)
saharoze	11	10	2 vrećice	24 ± 3	60	Chen i Liu (2000)
	2,09	7	1,5 g/L	28	21	Lončar i sur. (2000)

L-mliječna kiselina nije karakteristični sastojak tradicionalnog *kombucha* napitka, ali je njezina prisutnost znanstveno potvrđena. Jayabalan i sur. (2007) su ustvrdili da *kombucha* pripremljena sa zelenim čajem ima višu koncentraciju mliječne kiseline od *kombuche* pripremljene od crnog čaja. Maksimalna vrijednost od 0,54 g/L postignuta je nakon trećeg dana fermentacije. Limunska kiselina također nije karakteristični produkt metabolizma u tradicionalnom napitku. Malbaša i sur. (2011) su izmjerili prosječnu vrijednost limunske kiseline od 25 g/L u ukupnim kiselinama (podloga sa 1,5 g/L crnog čaja sa 70 g/L saharoze), a

Jayabalan i sur. (2007) su određivali limunsku kiselinu samo treći dan fermentacije i izmjerili 0,03 g/L u *kombuchi* pripremljenoj sa zelenim, odnosno 0,11 g/L sa crnim čajem.

Saharoza je najčešći izvor ugljika u fermentaciji *kombuche*. Znatan udio saharoze ostaje neprevreo tijekom fermentacije (Malbaša i sur., 2002a). Istraživanja su pokazala da 34,06% saharoze ostaje neprevrelo nakon 7 dana, a nakon 21 dan ta vrijednost pada na 19,28% (Tablica 1). Chen i Liu (2000) su odredili da se sadržaj saharoze linearno smanjuje tijekom prvih 30 dana, nakon čega slijedi spori pad. Yavari i sur. (2010) su zaključili da se trošenje saharoze počinje povećavati nakon četvrtog dana i nastavlja se sve do 14-tog dana kad je otkrivena najmanja koncentracija saharoze (2,1 g/L).

Bauer-Petrovska i Petrushevska-Tozi (2000) su u *kombuchi*, napravljenoj sa 70 g/L saharoze i 5 g/L crnog čaja, izmjerili vitamine topljive u vodi. Vrijednosti su bile sljedeće: vitamin B_1 74 mg/100 mL, vitamin B_6 52 mg/100 mL, vitamin B_{12} 84 mg/100 mL i vitamin C 151 mg/100 mL. Malbaša i sur. (2011) su izmjerili maksimalnu vrijednost vitamina B_2 u uzorcima dobivenim iz domaće *kombuche* (10. dan, 70 g/L saharoze i 5 g/L) na crnom (8,30 mg/100 mL) i zelenom (9,60 mg/100 mL) čaju. U tom istraživanju, količina vitamina C se konstantno povećavala u svim dobivenim produktima i dostigla maksimalnu vrijednost od 28,98 mg/L deseti dan, u napitku proizvedenom sa bakterijama octene kiseline i *S. cerevisiae* koji su bili izolirani iz prirodne *kombuche*.

Količinu mangana, željeza, nikla, bakra, cinka, olova, kobalta, kroma i kadmija u običnoj *kombuchi* odredili su Bauer-Petrovska i Petrushevska-Tozi (2000). Količine ispitivanih minerala bile su u rasponu od 0,004 μg/mL za kobalt do 0,462 μg/mL za mangan. Pronalazak toksičnih elemenata upućivao je na sljedeće vrijednosti: 0,005 μg/mL za olovo, 0,001 μg/mL za krom, dok kadmij nije bio pronađen. Zaključeno je da se udio esencijalnih minerala (Cu, Fe, Mn, Ni, i Zn) povećao kao rezultat metaboličke aktivnosti *kombuche*. Koncentracija kobalta nije se povećala, vjerojatno zbog njegove povezanosti s vitaminom B_{12} (Bauer-Petrovska i Petrushevska-Tozi, 2000). Kumar i sur. (2008) su ustvrdili prisutnost fluorida, klorida, bromida, jodida, nitrata, fosfata i sulfata u napitcima sa 100 g/L saharoze i 5 g/L crnog čaja, nakon 7 dana, a najviša izmjerena vrijednost bila je 3,20 mg/g za fluorid.

Chen i Liu (2000) su uočili da se količina etanola povećava s vremenom i doseže najvišu vrijednost oko 5,5 g/L, a zatim slijedi lagani pad. Na isti način je Reiss (1994) proučavao udio etanola i zaključio da je proizvodnja maksimalna šesti dan fermentacije, zatim slijedi smanjenje.

Sastav *kombucha* napitka upućuje na prisutnost mnogobrojnih spojeva i ovisi o podlozi za uzgoj, vremenu i temperaturi fermentacije, kao i o mikroorganizmima prisutnim u kulturi, ali i o primijenjenim metodama analize.

2.4. Pozitivni učinci *kombucha* čaja

Mnogi ljudi diljem svijeta koji konzumiraju *kombucha* čaj, tvrde da taj čaj ima mnogo pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje. Međutim, većina je blagotvornih učinaka proučavana samo eksperimentalno i manjak je znanstvenih dokaza temeljenih na ljudima. Iznesena istraživanja povezana sa antimikrobnim, antioksidativnim, hepatoprotektivnim i antikancerogenim svojstvima *kombucha* čaja i biološka aktivnost su prikazani u Tablici 2.

Učinci *kombuche* prema ruskim znanstvenicima (Dufresne i Farnworth 2000) su slijedeći: detoksikacija krvi, smanjenje razine kolesterola, smanjenje ateroskleroze regeneracijom staničnih stijenki, smanjenje krvnog tlaka, smanjenje upalnih problema, ublažavanje artritisa, reume i simptoma gihta, poboljšanje funkcije jetre, normaliziranje crijevne aktivnosti, ravnoteža crijevne flore, liječi hemoroide, smanjenje pretilosti i reguliranje apetita, sprečavanje, odnosno, liječenje infekcije mjehura i smanjenje kalcifikacije bubrega, poticanje endokrinog sustava, zaštita protiv dijabetesa, povećava otpornost organizma na rak, antibiološko djelovanje protiv bakterija, virusa i kvasaca, poboljšava imunološki sustav i stimulira proizvodnju interferona, olakšava bronhitis i astmu, smanjuje menstrualne poremećaje i olakšava menopauzu, poboljšava kosu, kožu i zdravlje noktiju, smanjuje želju alkoholičara za alkoholom, smanjuje stres, živčane poremećaje i nesanice, ublažava glavobolje, poboljšava vid, usporava starenje i poboljšava opći metabolizam.

2.5. Antimikrobno djelovanje *kombucha* čaja

Kombucha čaj su proučavali mnogi znanstvenici zbog njegovih inhibicijskih aktivnosti prema patogenim mikroorganizmima. Čaj koji sadrži 4,36 g suhog čaja po litri i 100 g/L saharoze i fermentiran je čajnom gljivom, nema antibiotičku aktivnost u napitku osim one koju uzrokuje octena kiselina, primarni produkt fermentacije (Steinkraus i sur., 1996). Kombucha čaj koji sadrži 33 g/L ukupnih kiselina (7 g/L octena kiselina) djelovao je antimikrobno prema *Agrobacterium tumefaciens, Bacillus cereus, Salmonella choleraesuis serotype Typhimurium, Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*, ali ne i prema *Candida albicans* (Greenwalt i sur., 1998). *Kombucha* čaj mogao bi inhibirati rast patogena *Entamoeba cloacae, Pseudomonas aeruginosa, B. cereus, E. coli, Aeromonas hydrophila, Salmonella typhimurium, Salmonella enteritidis, Shigella sonnei, Staphylococcus epidermis, Leuconostoc monocytogenes, Yersinia enterocolitica, S. aureus, Campylobacter jejuni, Helicobacter pylori* i *C. albicans* (Sreeramulu

i sur., 2000, 2001). *Kombucha* čaj pripremljen iz različitih supstrata, kao što su dudov čaj, japanski crni čaj, čaj od jasmina, oolong i crni čaj, testiran je na patogenim bakterijama ljudi i račića. Rezultati su otkrili da je *kombucha* crni čaj imao najveću sposobnost inhibicije rasta patogenih mikroorganizama i *Vibrio parahaemolytica* pokazala je najveću osjetljivost prema fermentiranom čaju (Talawat i sur., 2006). Battikh i sur. (2012) su izvjestili da *kombucha* pripremljena iz zelenog i crnog čaja ima antimikrobni potencijal prema testiranim ljudskim patogenim mikroorganizmima, osim *C. krusei*, a *kombucha* zelenog čaja pokazala je najviši antimikrobni potencijal.

Istraživanje na *kombuchi* pokazalo je njezinu antimikrobnu učinkovitost prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim patogenim mikroorganizmima. Antimikrobna aktivnost *kombucha* čaja se u velikoj mjeri može pripisati prisutnosti organskih kiselina, posebno octenoj kiselini, velikim proteinima i katehinima. Octena kiselina i katehini su poznati po tome da inhibiraju brojne Gram-pozitivne i Gram-negativne mikroorganizme (Sreeramulu i sur., 2000).

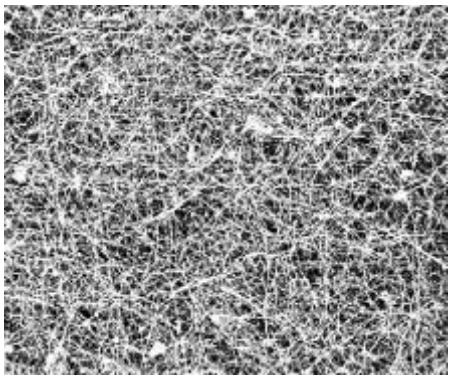
2.6. *Kombucha* čaj kao izvor antioksidansa

Globalni je trend upotrebe fitokemikalija prisutnih u prirodnim izvorima da se iskoriste kao antioksidansi i funkcionalna hrana. Bioaktivne molekule iz prirodnih izvora se upotrebljavaju u prehrambenoj industriji i postoje dokazi da te molekule mogu djelovati kao antioksidansi u ljudskom tijelu. Antioksidativna aktivnost *kombuche* je povezana sa mnogim njezinim pozitivnim učincima kao što su prevencija raka, poboljšanje imunološkog sustava, ublažavanje upala i artritisa. Primijećeno je da *kombucha* čaj ima višu antioksidativnu aktivnost nego nefermentirani čaj. Razlog tome je proizvodnja niskomolekularnih spojeva i strukturnih modifikacija polifenola iz čaja enzimima koje proizvode bakterije i kvasci tijekom fermentacije (Bhattacharya i sur., 2011b).

Kombucha je pokazala povećanu aktivnost vezanjem slobodnih radikala tijekom fermentacije. Opseg aktivnosti ovisi o vremenu fermentacije, vrsti čaja i normalnoj mikrobnoj populaciji *kombucha* kulture koja određuje prirodu njihovih metabolita. Iako mogućnost vezanja slobodnih radikala *kombucha* pokazuje u određenim vremenskim profilima, produljena fermentacija se ne preporuča zbog nakupljanja organskih kiselina u količini koja bi bila štetna za izravnu konzumaciju.

2.7. Biomasa *kombuche* i njezina primjena

Celuloza koju proizvodi *A. xylinum* tijekom fermentacije, pojavljuje se kao tanka membrana na površini čaja za koju su pričvršćene stanice bakterija i kvasaca. Ova mješavina mikroorganizama i celuloze je vjerojatno razlog zbog kojeg je *kombucha* nazvana i „čajna gljiva“ (Sreeramulu i sur., 2000). Celulozna struktura biomase *A. xylinum* (Slika 3) ima jedinstveno svojstvo u smislu kemijske stabilnosti, molekularne strukture i mehaničke čvrstoće (Czaja i sur., 2006). Slična plutajuća celulozna mreža na površini različitih voćnih sokova fermentiranih simbiotskom kulturom sastavljenom od *A. xylinum* i kvasaca, zvanom „note“, se konzumira kao delikatesa na Filipinima. Celulozna mreža proizvedena od čiste kulture *A. xylinum* koristi se za tretiranje opeklina kože i drugih kožnih bolesti u Brazilu (Blanc, 1996).



Slika 3. Struktura celuloznih mikrovlakana biomase bakterije *Acetobacter xylinum* (Chawla i sur., 2009)

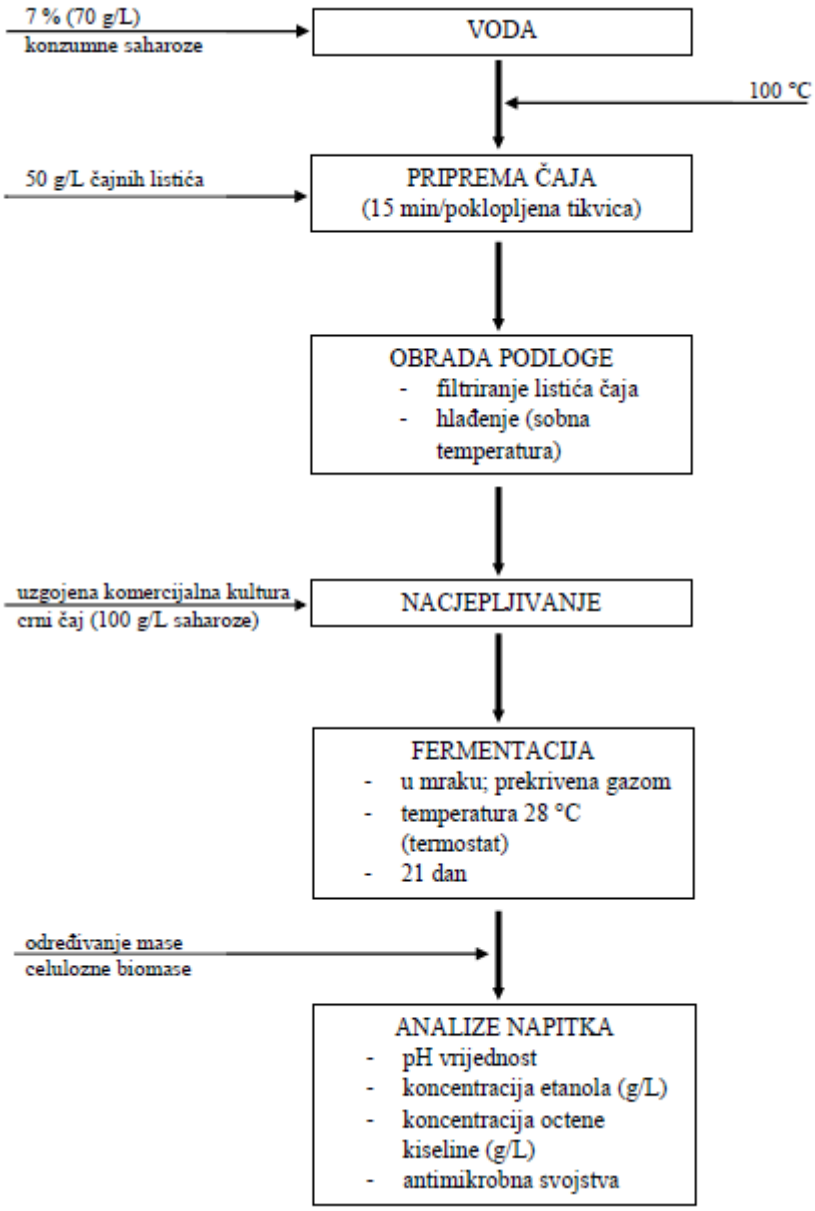
Kafein i slični spojevi (teofilin i teobromin) su identificirani kao aktivatori za proizvodnju celuloze koju proizvodi *A. xylinum* (Lončar i sur., 2001). U prošlosti se celulozni biofilm koristio za liječenje ozljeda. Mikrobna celuloza sintetizirana u izobilju *A. xylinum* pokazala je veliki potencijal kao novi sustav za liječenje ozljeda (Czaja i sur., 2006).

Nekoliko istraživača u svijetu (Murugesan i sur., 2005; Razmovski i Šćiban, 2008) je upotrijebilo osušenu biomasu čajne gljive kao biapsorbenta za učinkovito uklanjanje metalnih zagađivača prisutnih u otpadnoj vodi. Naboji koje posjeduju bakterije i kvasci prisutni u celuloznoj biomasi povezani su sa sposobnošću apsorpcije. Istraživanjem učinkovitosti biomase čajne gljive prethodno tretirane sa $FeCl_3$ kako bi se uklonio arsen iz vodenih otopina otkriveno je da je najveći kapacitet biomase čajne gljive za arsen (V) dobiven pri $3{,}98 \times 10^{-3}$ mmol/g pri pH od 6 do 8. Razmovski i Šćiban (2008) su proučavali učinkovitost otpadne biomase čajne gljive u uklanjanju Cr(VI) i Cu(II) iona iz vodenih otopina u seriji bioapsorpcijskih sustava i zaključili da je optimalna pH vrijednost za bioapsorpciju Cr(VI) i

Cu(II) 2,0 i 4,0. Murugesan i sur. (2005) su istraživali sastav biomase *kombuche* i zaključili da sadrži 179,38 g sirovih proteina, 120 g sirovih vlakana, 4,82 g fosfora, 6,56 g kalcija i 8,92 MJ metabolizirajuće energije po kilogramu biomase. Otkriveno je da je čajna gljiva bogata sirovim vlaknima, sirovim proteinima i aminokiselinom lizinom (Jayabalan i sur., 2010b). Uzgajanje *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 1671 i *S. cerevisiae* CGMCC 1670 u tradicionalnoj *kombuchi* sa 10,37% inokuluma, početnog pH 4,96, i hranjive podloge volumena 77,13 mL u tikvici od 250 mL rezultiralo je sa 300,093 mg/g bakterijske celuloze (Tan i sur., 2012). Istraživači su zaključili da se kokultura čistih sojeva tradicionalne *kombuche* može koristiti za dobivanje bakterijske celuloze visokog stupnja i zatim proizvodnje visokokvalitetnog *kombucha* napitka. Čaj sa koncentracijom saharoze od 90 g/L daje najveći prinos bakterijske celuloze (66,9%), a debljina i prinos ove bakterijske celuloze povećavaju se s vremenom fermentacije i omjerom površine i dubine (Goh i sur., 2012a). Karakterizaciju mikrobne celuloze koju proizvodi *kombucha* nakon 8 dana fermentacije, koristeći SEM, FTIR, defraktometriju X-zraka, adsorpcijsku izotermu i mjerenjem svojstva otekline napravili su Goh i sur. (2012b). Njihov rezultat na SEM-u je pokazao da je celulozni sloj izrađen od ultrafine mreže. FTIR je potvrdio prisutnost karakterističnih regija anomernih ugljika i β-1,4-veza. Potvrđeno je da u celulozi ne postoje kontaminanti poput lignina i hemiceluloze. Difrakcija X-zrakama je pokazala da je cjelokupni stupanj kristaličnosti suhe biomase čajne gljive nešto niži nego kod nemikrobne celuloze. Dakle, može se koristiti i za pripremu kemikalija koje se temelje na celulozi poput karboksimetilceluloze i može biti fermentirana u bioetanol. Zhu i sur. (2013) su pokazali da celuloza koju proizvodi *kombucha* ima dobru biokompatibilnost s primarno kultiviranim Schwannovim stanicama i nije pokazala histološke i hematološke toksične učinke na živčano tkivo *in vivo*.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ciljevi i tijek istraživanja



Slika 4. Shematski prikaz cjelokupnih istraživanja

3.2. Materijali i metode rada

3.2.1. 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.

3.2.2. Uporabljene vrste čaja

Uzgojena *kombucha* nacijepljena je na 4 vrste čaja:

- **bijeli čaj** – Pai mu tan- Fu Jian Province Guanfu Tea Co. Ltd., Guangdong, Kina
- **crni čaj** – Mountain Tea trade PVT. Ltd., Kathmandu, Nepal
- **voćni čaj**, odnosno zeleni čaj uz dodatak tropskog voća i ružinih latica – Geisha – Fleur des geisha, Palais thes thès, Pariz, Francuska
- **zeleni čaj** - Bilouchun Tea - Zhejiang Qiandao Yuye Co. Ltd., Yixing, Jiangsu, Kina

3.2.3. Priprava fermentiranih čajeva

Infuzije crnog, zelenog, bijelog i voćnog čaja su pripravljene s 50 g listića pojedinog čaja, uz dodatak 70 g/L saharoze (bijeli konzumni šećer) u ukupnom volumenu od 1 L kipuće vode. Ekstrakcija je trajala 15 minuta, nakon čega je čaj ohlađen na sobnu temperaturu i filtrirani su čajni listići. Bistri filtrat je preliven u sterilne Erlenmeyer tikvice od 1 L korisnog volumena i inokuliran sa svježe ugojenom *kombucha* kulturom. Nacijepljeni uzorci su inkubirani pri 28 ^{o}C u termostatu tijekom 21-og dana, nakon čega je prevrela tekućina centrifugirana pri 2500 o/min tijekom 10 minuta, a supernatant je upotrebljen za daljnja određivanja. Kontrolni uzorak bila je neprevrela infuzija istraživanih vrsta čaja.



Slika 5. Priprava čajeva prije inokulacije s kombuchom; B- bijeli čaj, C- crni čaj, V-voćni čaj, Z – zeleni čaj

3.2.4. Određivanje pH vrijednosti

Prije, tijekom i na kraju fermentacije je infuziji čajeva određivana pH vrijednost pomoću pH metra Hanna Industrial model HI 98103.

3.2.5. Određivanje koncentracije octene kiseline

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

$$m(CH_3COOH) = V(NaOH) \cdot f(NaOH) \cdot V(podloge) \cdot 6$$

3.2.6. Određivanje alkohola u prevreloj komini

Pomoću graduiranog cilindra odmjereno je 100 mL fermentiranog čaja i prebačeno u tikvicu za destilaciju s okruglim dnom, te je podešena pH vrijednost podloge na pH = 7.0 pomoću otopine 1 M NaOH. Tikvica je priključena na aparaturu za destilaciju, a destilat se prikupljao u odmjernu tikvicu od 100 mL. Kada je oko 2/3 volumena odmjerne tikvice ispunjeno destilatom, destilacija je prekinuta, odmjerna tikvica nadopunjena je vodom do 100 mL i određena je refraktometrijska vrijednost destilata. Iz baždarnog pravca očitan je odgovarajući volumni udio etanola i izračunata je koncentracija proizvedenog etanola.

3.2.7. Antimikrobna aktivnost *kombucha* čaja

Antimikrobna aktivnost *kombucha* čaja određivana je metodom radijalne difuzije (Sreeramulu i sur., 2001), mjerenjem zona inhibicije rasta testiranih mikroorganizama: bakterija *Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurium* i *Escherichia coli*, te kvasca *Candida albicans*.

Suspenzije stanica bakterija i kvasca (10^8/mL) nacijepljene su na hranjive podloge te im je u izbušene rupice u podlozi (visina 3 mm, promjer 4 mm) pipetom dodano 100 μL fermentiranog čaja. Podloge su stavljene na inkubaciju 24 h pri 28 ^oC (kvasac) i 37 ^oC (bakterije). Nakon toga su očitani rezultati pokusa, pri čemu je promatrano postoji li zona inhibicije, je li područje zamućeno ili čisto, te su mjereni promjeri nastalih zona. Svi pokusi su provedeni u trima paralelama, te je izračunata srednja vrijednost dobivenih rezultata.

3.2.8. Izračunavanje mase i prinosa celulozne biomase *kombuche*

Nakon 21-og dana fermentacije, izmjerena je masa celulozne biomase (g) prema slijedećoj formuli:

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

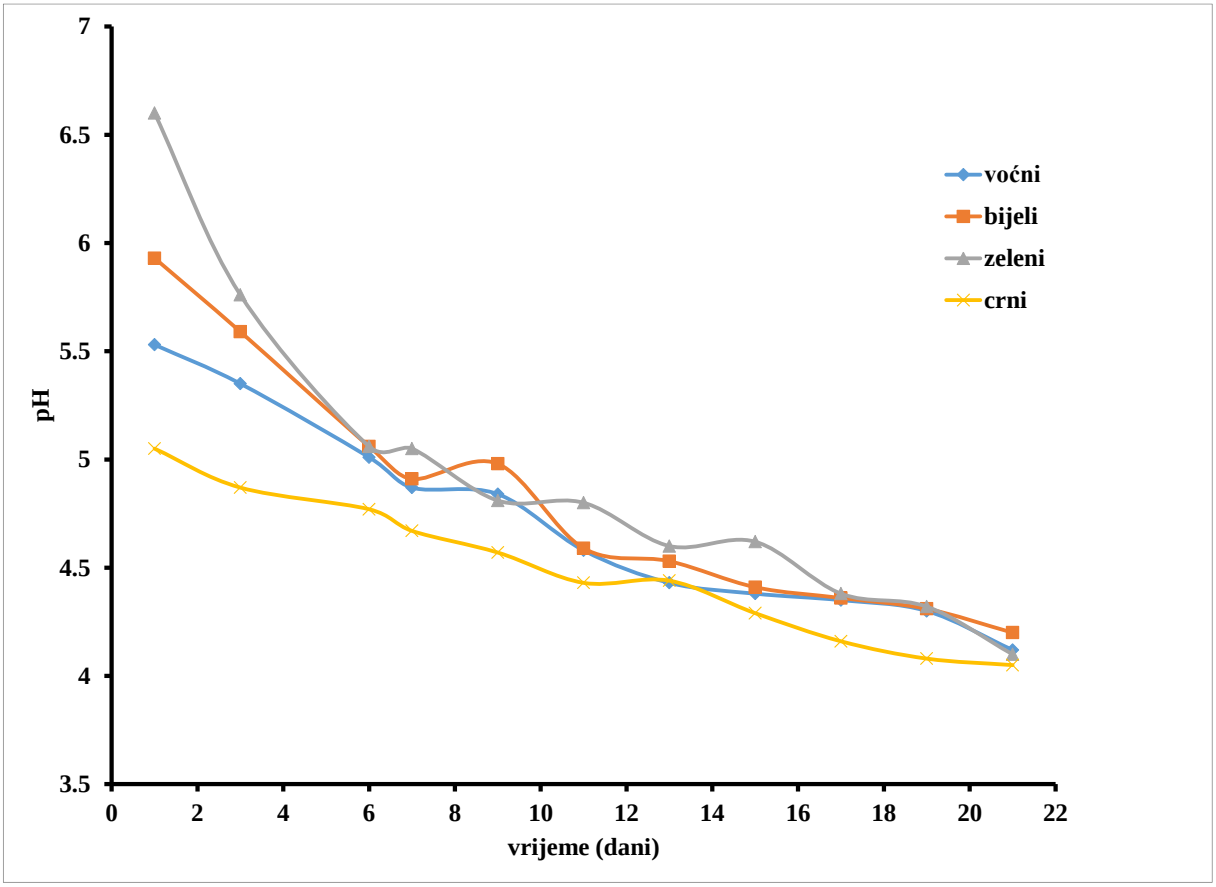
Prinos (%) je izračunat je prema formuli:

Yp = γ biomase nakon fermentacije / γ saharoze na početku procesa (g/L) x 100

4. REZULTATI

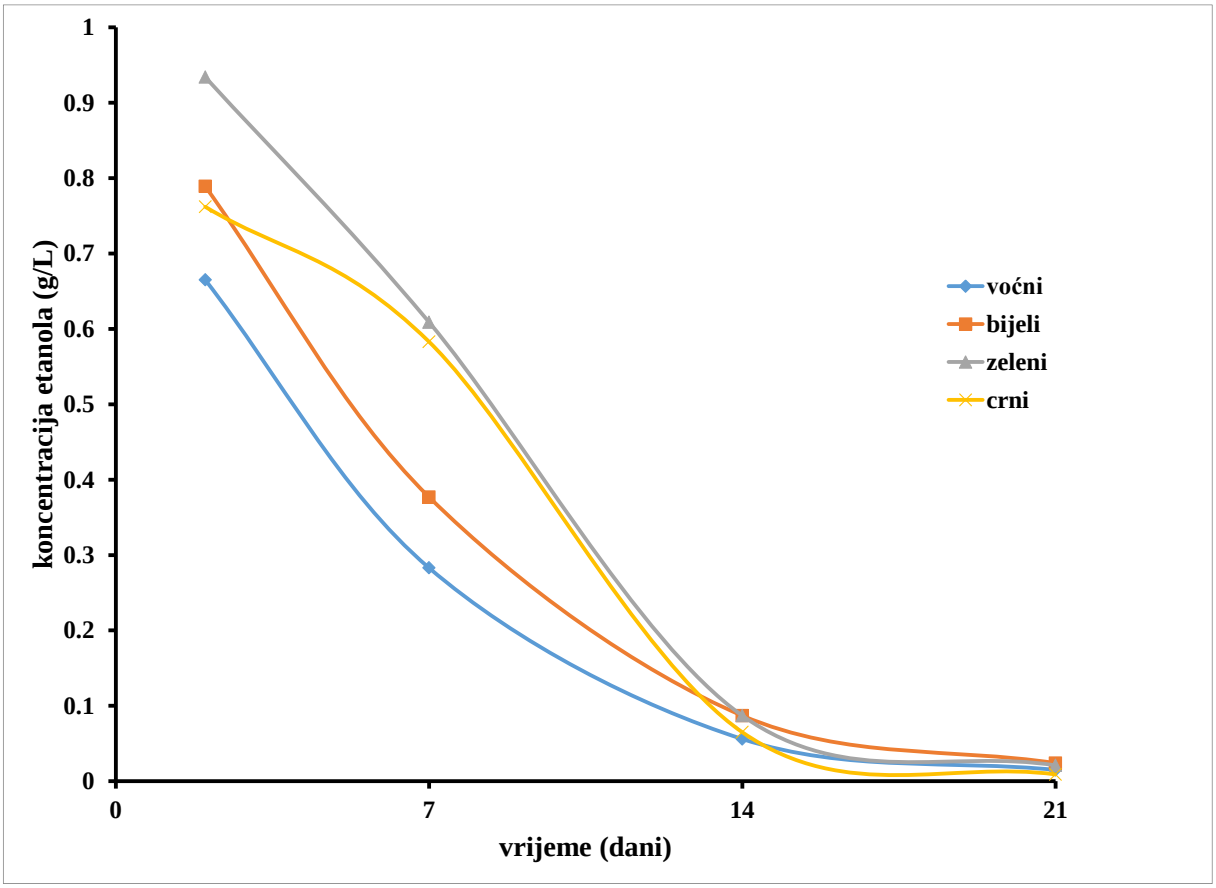
U ovom je radu proučavana fermentacija četiri različite vrste čaja: bijelog, zelenog, voćnog i crnog sa združenom kulturom bakterija octene kiseline i kvasaca, u javnosti poznatoj kao *kombucha* ili „čajna gljiva“.

Tijekom 21-og dana fermentacije pri 28 ºC, praćene su pH vrijednosti fermentiranih čajeva (Slika 6). Nastajanje kiselina tijekom fermentacije rezultiralo je padom pH vrijednosti infuzija čajeva, od početnih 6.6 (zeleni čaj), 5.93 (bijeli čaj), 5.53 (voćni čaj) i 5.05 (crni čaj) do konačnih 4.1 (zeleni čaj), 4.2 (bijeli čaj), 4.12 (voćni čaj) i 4.05 (crni čaj). Najmanja promjena pH vrijednosti primjećena je tijekom fermentacije crnog čaja, koja je trajala 21 dan, za samo 1 pH jedinicu (Slika 6).



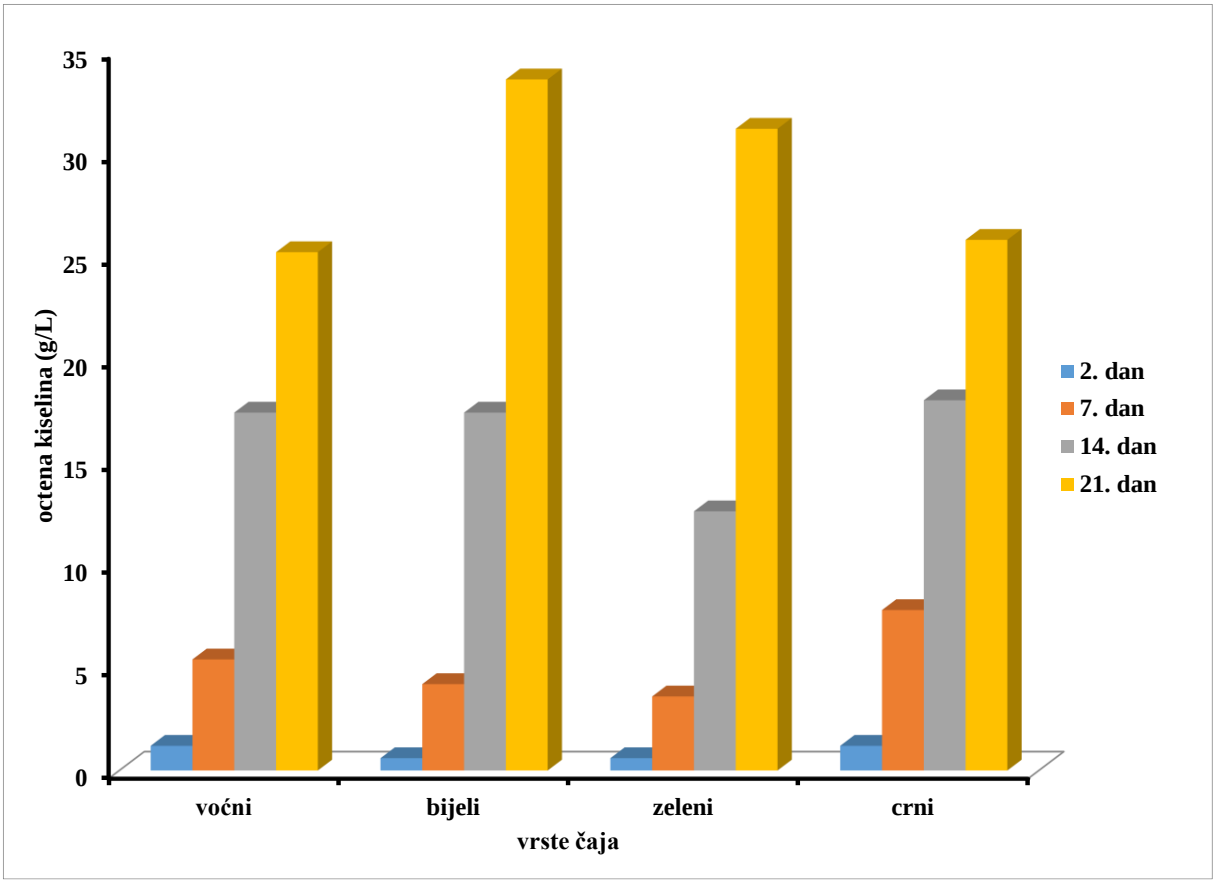
Slika 6. Promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije različitih vrsta čaja s *kombuchom*

Koncentracija etanola u *kombuchi*, prema većini autora ne prelazi koncentraciju od 10 g/L (Sievers i sur., 1995). U ovom radu su početne koncentracije etanola bile vrlo niske i u svim su se čajevima nakon 24 h fermentacije kretale od 0.66 do 0.93 g/L, da bi nakon 21-og dana uzgoja pale na 0.015 g/L (Slika 7).



Slika 7. Promjena koncentracije etanola tijekom fermentacije različitih vrsta čaja s *kombuchom*

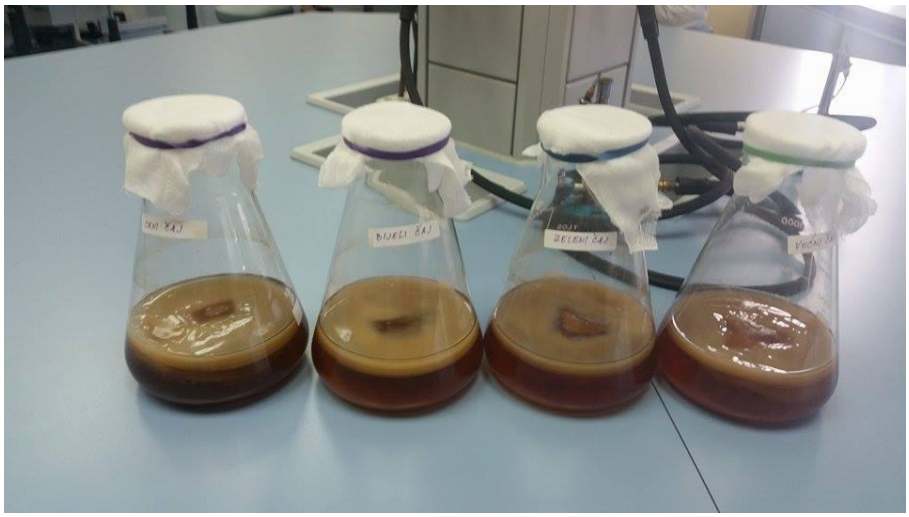
Dominantna organska kiselina u fermentiranim tekućinama je octena, čija se masena koncentracija tijekom fermentacije kontinuirano povećavala (Slika 8). Početne koncentracije octene kiseline nakon 24 sata fermentacije kretale su se od 0.6 g/L u infuzijama bijelog i zelenog čaja do 1.2 g/L u infuzijama crnog i voćnog čaja. Nakon 21-og dana fermentacije, najveća koncentracija octene kiseline izmjerena je u bijelom čaju (33.6 g/L), malo manja u zelenom (31.2 g/L), dok su u voćnom i crnom čaju izmjerene vrlo slične koncentracije (25.2 i 25.8 g/L).



Slika 8. Promjena koncentracije octene kiseline tijekom fermentacije različitih vrsta čaja s *kombuchom*

Jedan od prvih i vidljivih produkata biotransformacije zaslađenog čaja je celulozna biomasa koja se u obliku tankog sloja oblikuje na površini tekućine (Slika 9). Celuloznu biomasu na površini održava CO_2 nastao fermentativnom aktivnošću kvasaca (Markov i sur., 2003). Mikroskopskom analizom celuloznog sloja dokazano je da se po njenoj površini nalazi veliki broj bakterija, kojima je, kao striktnim aerobima potreban atmosferski kisik. S donje strane celulozne opne je nakupina kvasaca, fakultativno anaerobnih mikroorganizama. Općenito prihvaćen termin čajna gljiva najvjerojatnije potječe od celuloznog sloja koji svojim izgledom podsjeća na *pileus* (klobuk) viših gljiva (Blanc, 1996).



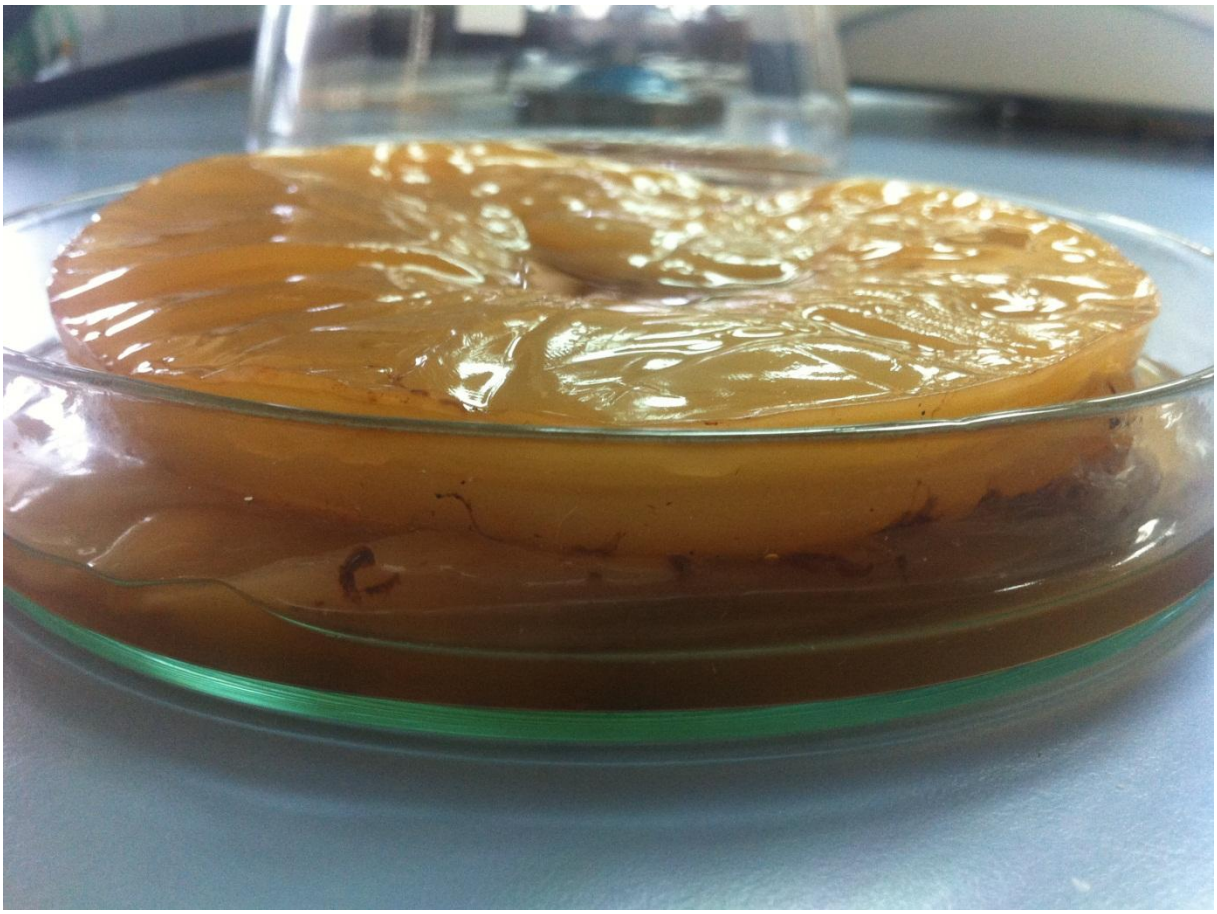


Slika 9. Izgled celulozne biomase *kombuche* nakon 21-og dana fermentacije

Tablica 2. Prinos celulozne biomase *kombuche* nakon 21 dana fermentacije različitih vrsta čaja

Vrsta čaja	γ inokuluma (g/L)	γ celulozne biomase (g/L)	Prinos (%)
Crni	8.49	180.17	248.29
Zeleni	6.56	132.29	182.09
Bijeli	10.39	158.36	215.10
Voćni	7.20	153.39	211.41

Iako nakon 21-og dana uzgoja *kombuche* nisu ispitivani osnovni parametri – pH vrijednost čaja, maseni udjeli etanola i octene kiseline, nastavljena su istraživanja izgleda (Slika 10) i prinosa celulozne biomase (Tablica 3).



Slika 10. Izgled celulozne biomase *kombuche* nakon 35 dana fermentacije zelenog čaja

Tablica 3. Prinos celulozne biomase *kombuche* nakon 35 dana fermentacije različitih vrsta čaja

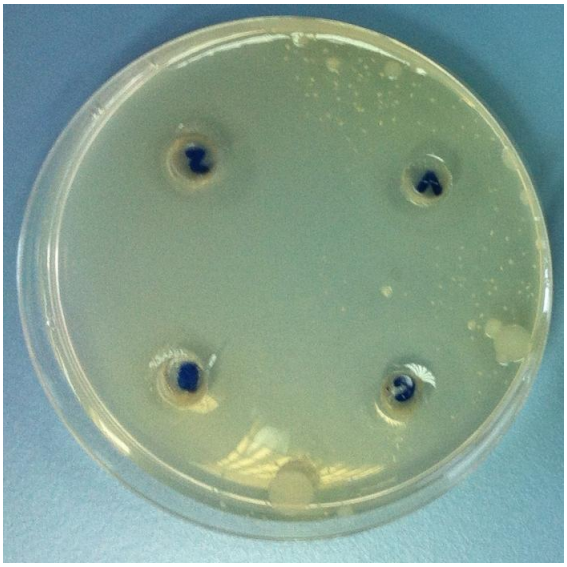
Vrsta čaja	γ inokuluma (g/L)	γ celulozne biomase (g/L)	Prinos (%)
Crni	8.49	239.88	330.56
Zeleni	6.56	315.73	441.67
Bijeli	10.39	218.99	297.99
Voćni	7.20	216.51	299.01

Na antimikrobna svojstva *kombuche* više je puta ukazivano i raznim metodama potvrđeno (Greenwalt i sur., 1998). U ovom radu je antimikrobna aktivnost fermentiranih čajeva *kombuche* ispitivana sa četiri testna mikroorganizma – bakterije vrsta *Streptococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium* i kvascem *Candida albicans* (Slika 11). Rezultati prikazani u Tablici 4 ukazuju na izvrsno antimikrobno djelovanje na bakterije *S. aureus* i *E. coli*, te vrlo dobro djelovanje na *S. typhimurium*, dok u prisutnosti *C. albicans* nisu uočene zone inhibicije, nego rast kvasca.

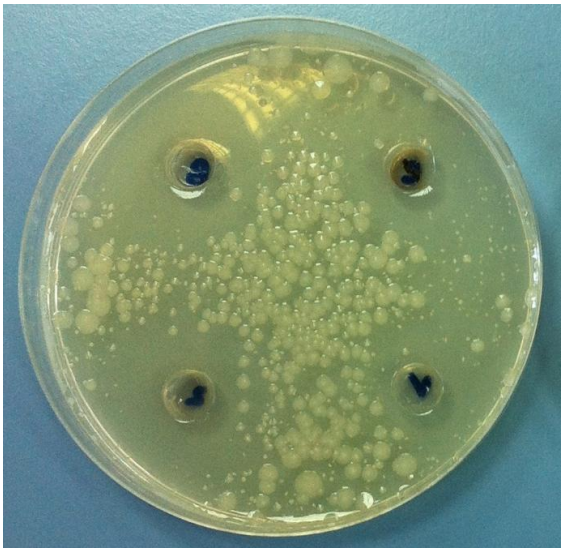
S. aureus



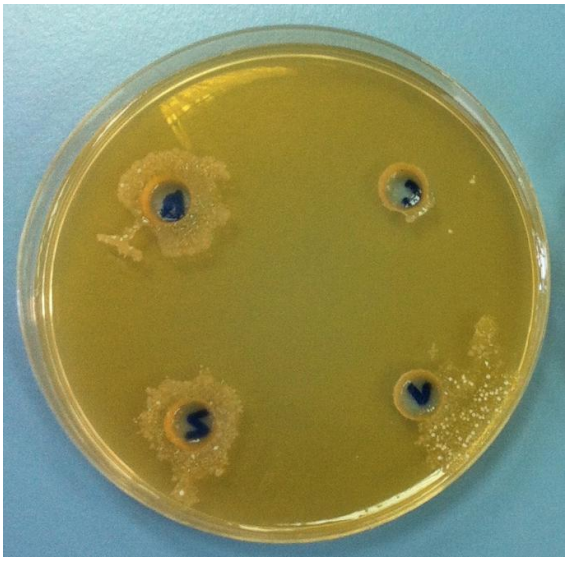
E. coli



S. typhimurium



C. albicans



Slika 11. Zone inhibicije rasta testnih mikroorganizama (razrjeđenje 10^{-3})

Tablica 4. Antimikrobno djelovanje različitih vrsta *kombucha* čaja

Zone inhibicije (mm)	*Streptococcus aureus*		*Echerichia coli*		*Salmonella typhimurium*		*Candida albicans*	
Razrjeđenje	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}
Vrsta čaja								
Crni	25	25	22	20	12	20	-	-
Zeleni	32	32	18	16	-	24	-	-
Bijeli	35	36	-	-	-	27	-	-
Voćni	28	27	18	18	-	15	-	-

5. RASPRAVA

Kombucha je nutritivno vrijedni napitak dobiven fermentacijom saharozom zaslađenog čaja pomoću čajne gljive, odnosno združene kulture bakterija octene kiseline i raznih vrsta kvasaca. Napitak je slatkast, blago kiseli i blago pjenušav, te nutritivno i biološki vrlo vrijedan zbog čega se i preporučuje njegovo svakodnevno konzumiranje (Greenwalt i sur., 2000; Dufresne i Farnworth, 2000).

Koncentracija i životnost čajne gljive (bakterijska celuloza/majčinska kultura) može varirati od uzgoja do uzgoja. Bakterije octene kiseline sintetiziraju plutajuću biomasu *kombuche* na površini infuzije čaja, čime se pojačava združivanje bakterija i kvasaca (Balentine i sur., 1997), a kvasci previru saharozu u fruktozu i glukozu, proizvodeći etanol (Reiss, 1994). Udio mikroorganizama u strukturi bakterijske celuloze je vrlo kompleksan (Anken i Kappel, 1992). Zbog toga je u ovom radu provedeno mikrobiološko brojanje stanica bakterija octene kiseline i kvasaca na početku i kraju procesa fermentacije. Kao što je vidljivo iz Tablice 4, u ovoj združenoj kulturi, bez obzira na infuziju čaja u koju su nacijepljeni, koncentracija stanica kvasca bila je veća od koncentracije stanica bakterija octene kiseline.

Svaki mikroorganizam za svoj rast i metabolizam ima svoj optimalni pH interval, tako da pH vrijednost hranjive podloge ima važnu ulogu u mikrobnom rastu i sintezi bakterijske celuloze (Sinclair, 1987). Tijekom 21-og dana fermentacije, pH vrijednosti infuzija čajeva se razmjerno smanjivala bez obzira na vrstu čaja (Slika 6). Najveća promjena pH vrijednosti zabilježena je u zelenom čaju (za 2.5 pH jedinica), a najmanja u crnom čaju (1 pH jedinica). Tijekom fermentacije bijelog i voćnog čaja pH vrijednosti su se prosječno smanjile za 1.6 jedinica. Dobiveni rezultati su u suglasju s istraživanjima Hwanga i sur. (1999), koji su zaključili da pretvorba glukoze u glukonsku kiselinu rezultira značajnim padom pH vrijednosti tijekom fermentacije. Nadalje, porastom broja stanica kvasaca i bakterija octene kiseline, te nastajanjem octene kiseline, pH se dodatno smanjuje.

Prema dostupnim literaturnim podacima masena koncentracija etanola u *kombucha* pripravcima ne prelazi koncentraciju od 10 g/L (Markov i sur., 2003). Sievers i sur. (1995) su objavili da su nakon 10 dana fermentacije *kombuche* u crnom čaju izmjerili maksimalnu masenu koncentraciju etanola od 3.6 g/L. U ovom radu su se koncentracije etanola nakon 24 h fermentacije kretale između 0.66 i 0.93 g/L, a nakon 21-og dana fermentacije su u svim uzorcima smanjene na 0.015 g/l (Slika 7).

Iako tijekom fermentacije s *kombuchom* nastaju i druge organske kiseline: glukonska, glukuronska i mliječna, octena kiselina je dominantna prema svom masenom u (Dufresne i Farnworth, 2000). Rezultati dobiveni ovim istraživanjem pokazali su da je najveća koncentracija octene kiseline nakon 21-og dana fermentacije postignuta u bijelom čaju (33.6

g/L), približno jednaka u zelenom čaju (31.2 g/L), dok su 25 % manje koncentracije izmjerene u voćnom i crnom čaju (oko 25 g/L), kako prikazuje slika 8.

Tijekom fermentacije čaja pomoću *kombuche*, već nakon 24 h je vidljivo stvaranje prozirne opne na površini tekućine, koja s vremenom fermentacije postaje sve deblja i želatinoznija (Slika 9). Prema istraživanjima Goha i sur. (2012), koji su pratili prinos biomase *kombuche* ovisno o koncentraciji šećera (od 50 do 250 g/L), uočeno je da se prinos biomase povećavao do 90 g/L (66.7 %), a nakon toga se naglo smanjivao, te je pri najvećoj koncentraciji od 250 g/L bio samo 9.9 %. U ovom su radu četiri infuzije različitih vrsta čaja; crnog, zelenog, bijelog i voćnog obogaćene dodatkom 70 g/L saharoze. Ovisno o vrsti čaja postignuti su različiti prinosi celulozne biomase, pri čemu je najveći prinos postignut nakon 21-og dana uzgoja u crnom čaju (248.15 %), a najmanji u zelenom čaju (182.09 %), dok su uzgojem u bijelom i voćnom čaju postignuti približno isti prinosi (211.41 – 215.10 %) (Tablica 2). Istraživanje prinosa celulozne biomase je nastavljeno do 35-og dana fermentacije. Dobiveni rezultati su pokazali da je u naknadnih 14 dana fermentacije prinos celulozne biomase u zelenom čaju uvećan za 260 %, a kod ostalih vrsta čaja za približno 80 % (Slika 10, Tablica 3).

Inokulacija čajne gljive zajedno s prethodno fermentiranim čajem (10 % v/v), ne samo da osigurava brzi početak fermentacije (Sievers i sur., 1995), nego i preventira naseljavanje plijesni, kao i drugih neželjenih mikroorganizama (Frank, 1999). Ovo zapažanje su naknadno potvrdili Greenwalt i sur. (2000), uz objašnjenje da je smanjenje pH infuzija čaja s prethodno fermentiranim čajem, mogućnost kontaminacije drugim mikroorganizmima značajno smanjeno.

Antimikrobna aktivnost fermentiranih uzoraka čajeva kvantitativno je praćena mjerenjem prisutnosti ili odsustva zona inhibicije rasta testiranih vrsta bakterija i kvasaca (*S. aureus, S. typhimurium, E. coli* i *C. albicans*), te pojave zamućenih zona, kojima se može objasniti djelomična inhibicija rasta mikroorganizama (Tablica 4). Dobiveni rezultati su pokazali da je rast *S. aureus* bio u potpunosti inhibiran kod razrjeđenja bakterijske kulture (10^{-2} i 10^{-3}), rast *E. coli* nije inhibirao samo bijeli čaj, dok je kod *S. typhimurium* zabilježena inhibicija s crnim čajem pri oba razrjeđenja, a kod svih čajeva samo pri razrjeđenju 10^{-3} bakterijske kulture. Niti jedan fermentirani čaj nije inhibirao rast kvasca *C. albicans* (Tablica 4). Ovi se rezultati mogu djelomično usporediti s rezultatima koje su dobili Battikh i sur. (2012), koji su istraživali antimikrobne učinke fermentacije infuzija začinskog bilja s *kombuchom*. Do sada nisu objavljeni nikakvi rezultati istraživanja provedenih na fermentaciji bijelog i voćnog čaja što je istraživano u ovom radu.

6. ZAKLJUČCI

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. *Kombucha* je nutritivno vrijedni napitak dobiven fermentacijom saharozom zaslađenog čaja pomoću združene kulture bakterija octene kiseline i raznih vrsta kvasaca.

2. Istraživane su fermentacije infuzija crnog, zelenog, bijelog i voćnog čaja (21 dan) s komercijalnom kulturom *kombuche* pri 28 ^{o}C, uz dodatak 70 g/L saharoze.

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

4. Najveći prinos celulozne biomase nakon 21-og dana fermentacije izmjeren je u crnom čaju (248.15 %), a najmanji u zelenom čaju (182.09 %), dok su prinosi u bijelom (211.41 %) i voćnom čaju (215.10 %) bili približno isti.

5. Antimikrobna aktivnost ispitivana je mjerenjem zona inhibicije rasta bakterija *S. aureus, S. typhimurium* i *E. coli*, te kvasca *C. albicans*. Fermentirane vrste čaja su pokazale izvrsnu antimikrobnu aktivnost prema bakterijskim kulturama, no rast kvasca *C. albicans* nije bio inhibiran.

7. LITERATURA

Afsharmanesh, M., Sadaghi, B. (2013). Effects of dietary alternatives (probiotic, green tea powder, and kombucha tea) as antimicrobial growth promoters on growth, ileal nutrient digestibility, blood parameters, and immune response of broiler chickens. *Comp. Clin. Pathol.*, doi: 10.1007/s00580-013-1676-x.

Anken, R. H., Kappel, T. (1992). Histochemical and anatomical observations upon the tea fungus. *Europ. Arch. Biol.*, **103**, 219-222.

Balentine, D. A., Wiseman, S. A., Bouwens, L. C. (1997). Tea and Health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*., **37**, 693-704.

Battikh, H., Chaieb, K., Bakhrouf, A., Ammar, E. (2012). Antibacterial and antifungal activities of black and green kombucha teas. *J. Food. Biochem.*, **37**, 231–236.

Bauer-Petrovska, B., Petrushevska-Tozi, L. (2000). Mineral and water-soluble vitamin contents in the kombucha drink. *Int. J. Food. Sci. Technol.*, **35**, 201–205.

Belloso-Morales, G., Hernández-Sánchez, H. (2003). Manufacture of a beverage from cheese whey using a "tea fungus" fermentation. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, **45**, 5–11.

Bhattacharya, S., Manna, P., Gachhui, R., Sil, P. C. (2011a). Protective effect of Kampuchea tea against tertiary butylhydroperoxide-induced cytotoxicity and cell death in murine hepatocytes. *Indian. J. Exp. Biol*., **49**, 511–524.

Bhattacharya, S., Gachhui, R., Sil, P. C. (2011b). Hepatoprotective properties of kombucha tea against TBHP-induced oxidative stress via suppression of mitochondria-dependent apoptosis. *Pathophysiology*., **18**, 221–234.

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

Boesch, T., Trček, J., Sievers, M., Teuber, M. (1998). Acetobacter intermedius, sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, **21**, 220–229.

Cetojević-Simin, D. D., Bogdanovic, G. M., Cvetkovic, D. D., Velicanski, A. S. (2008). Antiproliferative and antimicrobial activity of traditional kombucha and *Satureja montana* L. Kombucha. *J. BUON*., **133**, 395–401.

Cetojević-Simin, D. D., Velićanski, A. S., Cvetković, D. D., Markov, S. L., Mrdanović, J. Ž., Bogdanović, V. V., Šolajić, S. V. (2012). Bioactivity of lemon balm kombucha. *Food. Bioprocess. Technol.*, **5**, 1756–1765.

Chawla, P. R., Bajaj, I. B., Survase, S. A., Singhal, R. S. (2009). Microbial cellulose: Fermentative production and apllications. *Food Technol. Biotechnol*., **47**, 107-124.

Chen, C., Liu, B. Y. (2000). Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *J. Appl. Microbiol.*, **89**, 834–839.

Chu, S. C., Chen, C. (2006). Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food. Chem.*, **98**, 502–507.

Conney, A. H., Lu, Y. P., Lou, Y. R., Huang, M. T. (2002). Inhibitory effects of tea and caffeine on UV-induced carcinogenesis: relationship to enhanced apoptosis and decreased tissue fat. *Eur. J. Cancer. Prev.,* **2**, 28–36.

Czaja, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S., Brown, M. (2006). Microbial cellulose–the natural power to heal wounds. *Biomateria.,* **27**, 145–151.

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

Dutta, D., Gachhui, R. (2006). Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrogenifigens* sp. nov., isolated from kombucha tea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.,* **56**, 1899–1903.

Dutta, D., Gachhui, R. (2007). Nitrogen-fixing and cellulose-producing Gluconacetobacter kombuchae sp. nov., isolated from kombucha tea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.,* **57**, 353–357.

El-Taher, E. M. (2011). Kombucha: a new microbial phenomenon and industrial benefits. *African. J. Biol. Sci.,* **7**, 41–60.

Ernst, E. (2003). Kombucha: a systematic review of the clinical evidence. *Forsch. Komplementarmed. Klass. Naturheilkd.,* **10**, 85–87.

Food and Drug Administration. 1995. FDA cautions consumers on "Kombucha Mushroom Tea" (News release). Washington, DC: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration.

Franco, V. G., Perín, J. C., Mantovani, V. E., Goicoechea, H. C. (2006). Monitoring substrate and products in a bioprocess with FTIR spectroscopy coupled to artificial neural networks enhanced with a genetic-algorithm-based method for wavelength selection. *Talanta.,* **68**, 1005–1012.

Frank, G. W. (1995). Kombucha – Healthy beverage and natural remedy from the Far East. 9th Ed. Wilhelm Ennsthaler, Austria, str. 150.

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

Goh, W. N., Rosma, A., Kaur, B., Fazilah, A., Karim, A. A., Bhat, R. (2012b). Microstructure and physical properties of microbial cellulose produced during fermentation of black tea broth (Kmbucha). II. *Int. Food. Res. J.,* **19**, 153–158.

Greenwalt, C. J., Ledford, R. A., Steinkraus, K. H. (1998). Determination and characterization

of the antimicrobial activity of the fermented tea kombucha. *LWT. Food. Sci. Technol.,*
31, 291–296.

Hartmann, A. M., Burleson, L. E., Holmes, A. K., Geist, C. R. (2000). Effects of chronic kombucha ingestion on open-field behaviors, longevity, appetitive behaviors, and organs in C57-BL/6 mice: a pilot study. *Nutrition.,* **16**, 755–761.

Hauser, S. P. (1990). Dr. Sklenar's Kombucha mushroom infusion – a biological cancer therapy. Documentation No. 18. *Schweiz Rundsch Med. Prax.*, **79**, 243-246.

Herrera, T., Calderon-Villagomez, A. (1989). Species of yeasts isolated in Mexico from the tea fungus. *Rev. Mex. Micol.,* **5**, 205–210.

Ibrahim, N. K. (2011). Possible protective effect of kombucha tea ferment on cadmium chloride-induced liver and kidney damage in irradiated rats. *World. Acad. Sci. Eng. Technol.,* **55**, 1097–1102.

Jarrell, J., Cal, T., Bennett, J. W. (2000). The kombucha consortia of yeasts and bacteria. *Mycologist.,* **14**, 166–170.

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

Jayabalan, R., Subathradevi, P., Marimuthu, S., Sathishkumar, M., Swaminathan, K. (2008a). Changes in free radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food. Chem.,* **109**, 227–234.

Jayabalan, R., Marimuthu, S., Thangaraj, P., Sathishkumar, M., Binupriya, A. R., Swaminathan, K., Sei, E. Y. (2008b). Preservation of kombucha tea effect of temperature on tea components and free radical scavenging properties. *J. Agri. Food. Chem.*, **56**, 9064–9071.

Jayabalan, R., Baskaran, S., Marimuthu, S., Swaminathan, K., Yun, S. E. (2010a). Effect of kombucha tea on aflatoxin B1-induced acute hepatotoxicity in albino rats—prophylactic and curative studies. *J. Appl. Biol. Chem.,* **53**, 407–416.

Jayabalan, R., Malini, K., Sathishkumar, M., Swaminathan, K., Yun, S. E. (2010b.) Biochemical characteristics of tea fungus produced during kombucha fermentation. *Food. Sci. Biotechnol.,* **19**, 843–847.

Jayabalan, R., Chen, P. N., Hsieh, Y. S., Prabhakaran, K., Pitchai, P., Marimuthu, S., Thangaraj, P., Swaminathan, K., Yun, S. E. (2011). Effect of solvent fractions of kombucha tea on viability and invasiveness of cancer cells—characterization of dimethyl 2-(2-hydroxy-2-methoxypropylidine) malonate and vitexin. *Indian. J.*

Biotechnol., **10**, 75–82.

Kent, R. A., Stephens, R. S., Westland, J. A. (1991). Bacterial cellulose fiber provides an alternative for thickening and coating. *Food Technol*., **45**, 108-114.

Kozaki, M., Koizumi, A., Kitahara, K. (1972). Microorganisms of zoogloeal mats formed in tea decoction. *J. Food. Hyg. Soc. (Jpn).,* **13**, 89–96.

Kumar, S. D., Narayan, G., Hassarajani, S. (2008). Determination of anionic minerals in black and kombucha tea using ion chromatography. *Food. Chem.,* **111**, 784–788.

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

Lončar, E. S., Petrović, S. E., Malbaša, R. V., Verac, R. M. (2000). Biosynthesis of glucuronic acid by means of tea fungus. *Nahrung.,* **44**, 138–139.

Lončar, E. S., Malbaša, R. V., Kolarov, Lj. A. (2001). Metabolic activity of tea fungus on molasses as a source of carbon. *Acta. Period. Technol.,* **32**, 21–26.

Lončar, E. S., Malbaša, R. V., Kolarov, L. A. (2007). Kombucha fermentation on raw extracts of different cultivars of Jerusalem artichoke. *Acta. Period. Technol.,* **38**, 37–44.

Maghsoudi, H., Mohammadi, H. B. (2009). The effect of kombucha on post-operative intra-abdominal adhesion formation in rats. *Indian. J. Surg.*, **71**, 73–77.

Malbaša, R. V. (2004). Investigation of antioxidant activity of beverage from tea fungus fermentation [Ph.D. Thesis], University of Novi Sad, Faculty of Technology, Novi Sad, Serbia.

Malbaša, R.V., Lončar, E. S., Kolarov, LJ. A. (2002a). Sucrose and inulin balance during tea fungus fermentation. *Roum. Biotechnol. Lett.,* **7**, 573–576.

Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Kolarov, LJ. A. (2002b). L-lactic, L-ascorbic, total and volatile acids contents in dietetic kombucha beverage. *Roum. Biotechnol. Lett.,* **7**, 891–896.

Malbaša, R., Lončar, E., Djurić, M. (2008a). Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. *Food. Chem.* **106**, 1039–1045.

Malbaša, R., Lončar, E., Djurić, M., Došenović, I. (2008b). Effect of sucrose concentration on the products of kombucha fermentation on molasses. *Food. Chem.,* **108**, 926–932.

Malbaša, R., Milanović, S., Lončar, E., Đurić, M., Carić, M., Iličić, M., Kolarov, Lj. (2009). Milk-based beverages obtained by kombucha application. *Food. Chem.,* **12**, 178–184.

Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., Čanadanović-Brunet, J. M. (2011). Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food. Chem.*, **127**, 1727–1731.

Markov, S. L., Malbaša, R. V., Hauk, M. J., Cvetković, D. D. (2001). Investigation of tea fungus microbe associations. The yeasts. *Acta. Period. Technol.,* **32**, 133–138.

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

Mayser, P., Fromme, S., Leitzmann, C., Gründer, K. (1995). The yeast spectrum of "tea fungus Kombucha". *Mycodes.,* **38**, 289–295.

Murugesan, G. S., Sathishkumar, M., Swaminathan, K. (2005). Supplementation of waste tea fungal biomass as a dietary ingredient for broiler chicks. *Biores. Technol.,* **96**, 1743–1748.

Murugesan, G. S., Sathishkumar, M., Jayabalan, R., Binupriya, A. R., Swaminathan, K., Yun, S. E. (2009). Hepatoprotective and curative properties of kombucha tea against carbon tetrachloride-induced toxicity. *J. Microbiol. Biotechnol.,* **19**, 397–402.

Okiyama, A., Motoki, M., Yamanka, S. M. (1993). Bacterial cellulose III. Two-stage fermentation process for cellulose production by *Acetobacter aceti. Food Hydrocol.,* **6**, 493-501.

Pauline, T., Dipti, P., Anju, B., Kavimani, S., Sharma, S. K., Kain, A. K., Sarada, S. K., Sairam, M., Ilavazhagan, G., Devendra, K., Selvamurthy, W. (2001). Studies on toxicity, anti-stress and hepato-protective properties of kombucha tea. *Biomed. Environ. Sci.,* **14**, 207–213.

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

Ramadani, A. S., Abulreesh, H. H. (2010). Isolation and identification of yeast flora in local kombucha sample: AL NABTAH. *Umm. Al. Qura. Univ. J. App. Sci.,* **2**, 42–51.

Razmovski, R., Šćiban, M. (2008). Biosorption of Cr(VI) and Cu(II) by waste tea fungal biomass. *Ecol. Eng.*, **34**, 179–186.

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

Sabouraud, S., Coppéré, B., Rousseau, C., Testud, F., Pulce, C., Tholly, F., Blanc, M., Culoma, F., Facchin, A., Ninet, J., Chambon, P., Medina, B., Descotes, J. (2009). Environmental lead poisoning from lead-glazed earthenware used for storing drinks. *Rev. Med. Interne.,* **30**, 1038–1043.

Safak, S., Mercan, N., Aslim, B., Beyatli, Y. (2002). A study on the production of poly-beta-hydroxybutyrate by some eukaryotic microorganisms. *Turk. Electron. J. Biotechnol.*

Special. Issue., 11–117.

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

Sinclair, C. G. (1987). Microbial process kinetics. U: Basic Biotechnology. Bulock, J., Kristiansen, B. (Ured.). Academic Press, London, str. 75-127.

Sreeramulu, G., Zhu, Y., Knol, W. (2000). Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *J. Agri. Food. Chem.*, **48**, 2589–2594.

Sreeramulu, G., Zhu, Y., Knol, W. (2001). Characterization of antimicrobial activity in kombucha fermentation. *Acta. Biotechnol.*, **21**, 49–56.

Srihari, T., Arunkumar, R., Arunakaran, J., Satyanarayana, U. (2013a). Downregulation of signalling molecules involved in angiogenesis of prostate cancer cell line (PC-3) by kombucha (lyophilized). *Biomed. Prev. Nutrit.*, **3**, 53–58.

Srihari, T., Karthikesan, K., Ashokkumar, N., Satyanarayana, U. (2013b). Antihyperglycaemic efficacy of kombucha in streptozotocin-induced rats. *J. Funct. Foods.*, **3**, 1794–1802.

Srinivasan, R., Smolinske, S., Greenbaum, D. (1997). Probable gastrointestinal toxicity of kombucha tea: is this beverage healthy or harmful?. *J. Gen. Intern. Med.*, **12**, 643–644.

Steinkraus, K. H., Shapiro, K. B., Hotchkiss, J. H., Mortlock, R. P. (1996). Investigations into the antibiotic activity of tea fungus/kombucha beverage. *Acta. Biotechnol.* **16**, 199–205.

Talawat, S., Ahantharik, P., Laohwiwattanakul, S., Premsuk, A., Ratanano, S. (2006). Efficacy of fermented teas in antibacterial activity. *Kasetsart. J. (Nat. Sci.).*, **40**, 925–933.

Tan, L., Ren, L., Cao, Y., Chen, X., Tang, X. (2012). Bacterial cellulose synthesis in kombucha by *Gluconacetobacter* sp. and *Saccharomyces* sp. *Adv. Mater. Res.*, **554–556**, 1000–1003.

Teoh, A. L., Heard, G., Cox, J. (2004). Yeast ecology of kombucha fermentation. *Int. J. Food. Microbiol.*, **95**, 119–126.

Velićanski, A. S., Cvetković, D. D., Markov, S. L., Tumbas, V. T., Savatović, S. M. (2007). Antimicrobial and antioxidant activity of lemon balm kombucha. *Acta. Period. Technol.*, **38**, 165–172.

Velićanski, A. S., Cvetković, D. D., Markov, S. L. (2013). Characteristics of kombucha fermentation on medicinal herbs from Lamiaceae family. *Roum. Biotechnol. Lett.*, **18**,

8034–8042.

Vijayaraghavan, R., Singh, M., Rao, P. V. L., Bhattacharya, R., Kumar, P., Sugendran, K., Kumar, O., Pant, S. C., Singh, R. (2000). Subacute (90 days) oral toxicity studies of kombucha tea. *Biomed. Environ. Sci.*, **13**, 293–299.

Wang, K., Gan, X., Tang, X., Wang, S., Tan, H. (2010). Determination of D-saccharic acid-1,4-lactone from brewed kombucha broth by high-performance capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B.: Anal. Technol. Biomed. Life. Sci.*, **878**, 371–374.

Wang, Y., Ji, B., Wu, W., Wang, R., Yang, Z., Zhang, D., Tian, W. (2014). Hepatoprotective effects of kombucha tea: identification of functional strains and quantification of functional components. *J. Sci. Food. Agric.*, **94**, 265–272.

Yang, Z., Zhou, F., Ji, B., Li, B., Luo, Y., Yang, L., Li, T. (2010). Symbiosis between microorganisms from kombucha and kefir: potential significance to the enhancement of kombucha function. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **160**, 446–455.

Yavari, N., Mazaheri Assadi, M., Larijani, K., Moghadam, M. B. (2010). Response surface methodology for optimization of glucuronic acid production using kombucha layer on sour cherry juice. *Aust. J. Basic. Appl. Sci.*, **4(8)**, 3250–3256.

Yavari, N., Assadi, M. M., Moghadam, M. B., Larijani, K. (2011). Optimizing glucuronic acid production using tea fungus on grape juice by response surface methodology. *Aust. J. Basic. Appl. Sci.*, **5**, 1788–1794.

Yurkevich, D. I., Kutyshenko, V. P. (2002). Medusomyces (tea fungus): a scientific history, composition, features of physiology and metabolism. *Biofizika*, **47**, 1127–1129.

Zhu, C., Li, F., Zhou, X., Lin, L., Zhang, T. (2013). Kombucha-synthesized bacterial cellulose: preparation, characterization, and biocompatibility evaluation. *J. Biomed. Mater. Res. Part. A.*, **102**, 1548–1557.