

# Utjecaj mikrobioloških i tehnoloških parametara na kemijski sastav i senzorska svojstva kombuche

---

**Varjačić, Antonija**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2022**

*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:159:286272>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-04**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Antonija Varjačić  
0058217003**

**UTJECAJ MIKROBIOLOŠKIH I TEHNOLOŠKIH  
PARAMETARA NA KEMIJSKI SASTAV I  
SENZORSKA SVOJSTVA KOMBUČE**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Biotehnologija 2

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

**Zagreb, 2022.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

**Završni rad**

**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija**

**Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija**

### **Utjecaj mikrobioloških i tehnoloških parametara na kemijski sastav i senzorska svojstva kombuche**

**Antonija Varjačić, 0058217003**

**Sažetak:** Kombucha je napitak koji se dobiva fermentacijom zašećerenog čaja pomoću simbiotske kulture bakterija i kvasaca (SCOBY). Konzumacija kombuche se povezuje s nekim zdravstvenim učincima kao što su smanjenje razine kolesterola i krvnog tlaka, smanjenje širenja raka, poboljšanje funkcije jetre, imunološkog sustava i gastrointestinalnih funkcija. Cilj ovog rada je opisati proces proizvodnje kombuche te razraditi potencijalne probleme koji se mogu javiti tijekom. Opisane su dozvoljene sirovine te vrste mikroorganizama pogodnih za proizvodnju te najvažniji procesni parametri koji utječu na proces proizvodnje i fermentacije. Nadalje, u ovom su radu prikazane senzorske karakteristike kombuche koje su još uvijek slabo istražene, no zbog kojih se ovo piće može klasificirati kao kiselo, bezalkoholno i osvježavajuće. Zbog pozamašne koncentracije vitamina i antioksidacijskog i detoksikacijskog te mogućeg probiotičkog djelovanja kombuche, ovo se piće može nazvati zdravim ukoliko se konzumira u dozvoljenim količinama. Glavni problem u proizvodnji još uvijek predstavlja manjak standardizacije procesa proizvodnje kombuche.

**Ključne riječi:** kombucha, fermentacija, inokulum, senzorska svojstva

**Rad sadrži:** 28 stranica, 5 slika, 4 tablica, 41 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

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

**Datum obrane:** 19. rujna 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

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

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology

**Influence of microbiological and technological parameters on the chemical composition and sensory properties of kombucha**

**Antonija Varjačić, 0058217003**

**Abstract:** Kombucha is a beverage made by fermenting sugared tea using a symbiotic culture of bacteria and yeasts (SCOBY). Kombucha consumption has been associated with some health effects such as the reduction of cholesterol levels and blood pressure, reduction of cancer propagation, the improvement of liver, the immune system, and gastrointestinal functions. The aim of this paper is to describe the kombucha production process and to elaborate on potential problems that may arise during it. Permitted raw materials and types of microorganisms suitable for production are described, as well as the most important process parameters that affect the production and fermentation process. Furthermore, this paper presents the sensorial characteristics of kombucha, which are still poorly researched, but due to which this drink can be classified as sour, non-alcoholic and refreshing. Due to the considerable concentration of vitamins and antioxidant, detoxifying and possible probiotic effects of kombucha, this drink can be called healthy if it is consumed in permitted amounts. The main problem in production is still the lack of standardization.

**Keywords:** kombucha, fermentation, inoculum, sensory properties

**Thesis contains:** 28 pages, 5 figures, 4 tables, 41 references

**Original in:** Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** Sunčica Beluhan, PhD, Full Professor

**Thesis defended:** September 19, 2022

# Sadržaj

|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. UVOD .....                                                          | 1  |
| 2. TEORIJSKI DIO .....                                                 | 2  |
| 2.1. PROCESNI PARAMETRI KOJI UTJEČU NA SASTAV I KAKVOĆU KOMBUCHE ..... | 2  |
| 2.1.1. INOKULUM .....                                                  | 5  |
| 2.1.2. TEMPERATURA .....                                               | 7  |
| 2.1.3. IZVORI UGLJIKA .....                                            | 9  |
| 2.1.4. ČAJ .....                                                       | 9  |
| 2.1.5. KEMIJSKI SASTAV VODE .....                                      | 10 |
| 2.1.6. GEOMETRIJA REAKTORA .....                                       | 11 |
| 2.2. SENZORSKA SVOJSTVA KOMBUCHE .....                                 | 14 |
| 2.2.1. VIZUALNA SVOJSTVA .....                                         | 14 |
| 2.2.2. MIRIS .....                                                     | 15 |
| 2.2.3. OKUS .....                                                      | 16 |
| 2.2.4. ORALNA PERCEPCIJA .....                                         | 19 |
| 2.3. UTJECAJ KOMBUCHE NA ZDRAVLJE .....                                | 20 |
| 2.3.1. ANTIOKSIDACIJSKO DJELOVANJE .....                               | 20 |
| 2.3.2. DETOKSIKACIJA .....                                             | 20 |
| 2.3.3. PROBIOTIČKI POTENCIJAL .....                                    | 21 |
| 2.4. IZAZOVI I TEHNOLOŠKI ASPEKTI U PROIZVODNJI KOMBUCHE .....         | 22 |
| 3. ZAKLJUČCI .....                                                     | 23 |
| 4. POPIS LITERATURE .....                                              | 24 |

## 1. UVOD

Fermentacija, jedna od najstarijih biotehnoloških postupaka, ljudima je poznata od davnina. Cilj same fermentacije jest dati hrani ili proizvodu bolja nutritivna i senzorska svojstva. Jedan od takvih proizvoda, koji je svoju popularnost stekao u prošlom desetljeću, jest kombucha, rezultat fermentacije zaslađene infuzije *Camellia sinensis*, poznatije kao kineski čajevac. Za fermentaciju je zaslužna simbiotska zajednica kvasaca i bakterija organizirana u celulozni biofilm imena SCOBY (*engl.* Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast). Posebnosti ovog napitka jesu njegov antioksidativni i antimikrobni potencijal, mogućnost fermentacije pri različitim temperaturama i vremenu, te mogućnost korištenja drugih izvora ugljika osim saharoze. Danas se ovo piće proizvodi industrijski iako se proizvodnja tradicijski veže uz domaću izradu. Na temelju današnjih saznanja o pićima, može se zaključiti koji su kemijski spojevi odgovorni za određena senzorska svojstva kombuche. Makromolekule stvaraju zamućenje, dok mu derivati pigmenata čaja daju boju. Zaostali šećeri daju slatkoću, a organske kiseline koje proizvode bakterije octene kiseline stvaraju karakterističan kiselkasti okus. Malo je podataka poznato o mirisu kombuche. Ugljični dioksid, potencijalno polifenoli i rezidualni etanol zaslužni su za okus u ustima. Sastav vode odlučujući je čimbenik u ekstrakciji čajnih spojeva zajedno s vrstom čaja, trajanjem infuzije i temperaturom. Vrsta i količina dodanih zaslađivača igraju važnu ulogu u slatkoći pića i utječu na trajanje fermentacije, kao i količina dodanog inokuluma i njegov mikrobni sastav. Izvedba posuda za uzgoj ili reaktora i temperatura također su bitni parametri koji se mogu koristiti za prilagođavanje trajanja faze acidifikacije. Unatoč brojim provedenim istraživanjima postupka proizvodnje kombuche, potrebna su daljnja istraživanja senzorskih karakteristika gotovog napitka. Takva istraživanja mogla bi dovesti do bolje definicije kakvoće kombuche i poboljšane kontrole nad procesom proizvodnje (Jayabalan i sur., 2014). Postojanje povoljnih učinaka kombuche na ljudsko zdravlje ostaje kontroverzno zbog nedovoljne količine znanstvenih podataka i zbog višestrukih slučajeva bolesti nakon prekomjerne konzumacije ovog pića. Aktivni spojevi kombuche s potencijalnim dobrobitima za ljudsko zdravlje potječu od polifenola, posebice epigalokatehin galata, hidrolitičkih enzima, vitamina (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> i C), te organskih kiselina kao što su glukonska i glukuronska koje proizvode mikroorganizmi (Martinez-Leal i sur., 2018).

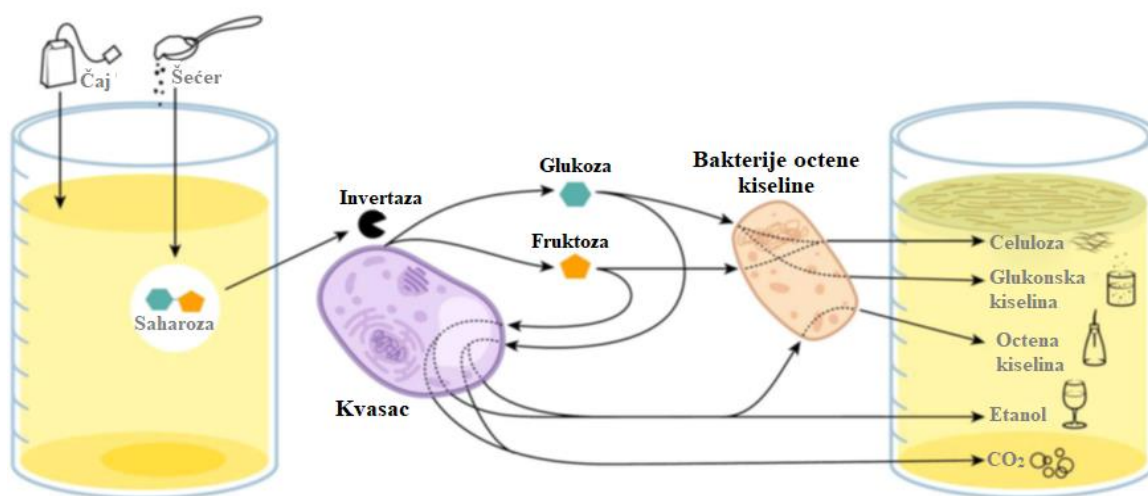
## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Procesni parametri koji utječu na sastav i kakvoću kombuche

Tradicionalni način pripreme kombuche sastoji se od infuzije listova crnog čaja kojem se dodaje saharoza. Početne temperature infuzije kreću se između 70 i 95 °C kako bi došlo do što uspješnije ekstrakcije čaja. Nakon što se tekućina ohladi do sobne temperature, infuzija se inokulira SCOBY kulturom koja tijekom proizvodnje tvori celuloznu opnu (biofilm) na površini tekućine (tradicionalno se naziva "čajna gljiva") i/ili bujona. Bitno je naglasiti da različiti koraci u proizvodnji kombuche nisu standardizirani. Prema dostupnoj literaturi, koncentracija saharoze i količina čaja mogu se kretati od 50 do 100 g/L, odnosno od 1,5 do 10 g/L, s vremenom infuzije između 5 i 15 minuta. Duljina svakog koraka te različite koncentracije čaja, šećera i inokuluma mogu varirati, te se prilagođavaju ovisno o osobnoj i empirijskoj procjeni. Kako bi se potakla transformacija zašećerenog čaja u kombuchu, u takvu zašećerenu hranjivu podlogu potrebno je dodati kulturu mikroorganizama koji će provesti fermentaciju. Ne postoji jedinstvena kultura mikroorganizama koja proizvodi kombuchu zbog čega se kao inokulum za proizvodnju koriste združene kulture kvasaca i bakterija octene kiseline, dok bakterije mliječne kiseline nisu uvijek prisutne. Zajednica bakterija octene kiseline uglavnom je zastupljena rodovima: *Acetobacter* (sp. *okinawensis* i *tropicalis*), *Gluconobacter oxydans*, *Gluconacetobacter* (sp. *europaeus* i *saccharivorans*), i *Komagataeibacter* (sp. *kombucha* i *xylinus*). Zajednica kvasca je promjenjivija i uključuje rodove kao što su *Zygosaccharomyces* (sp. *lentus*, *bisporus* i *bailii*), *Candida* (sp. *stellimalicola* i *tropicalis*), *Kloeckera/Hanseniaspora* (sp. *valbyensis*), *Torulaspora* (sp. *delbrueckii*), *Rhodotorulaspora* (sp. *mucilagenosa*), *Pichia* (sp. *mexicana* i *occidentalis*), *Brettanomyces/Dekkera* (sp. *bruxellensis* i *anomala*), *Saccharomyces* (sp. *cerevisiae*), *Schizosaccharomyces* (sp. *pombe*) i *Saccharomycoides*. Identificirane su i druge obitelji mikroorganizama koje uključuju bakterije mliječne kiseline i to rodove *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Oenococcus* (Chakravorty i sur., 2016). Pri sobnoj temperaturi, kvasci hidroliziraju saharozu dodanu u čaj do fruktoze i glukoze, koje se zatim alkoholnom fermentacijom pretvaraju u etanol. Ovaj je korak osnova simbioze koja javlja se u kombuchi jer bakterije octene kiseline ne mogu metabolizirati saharozu, no kvasci im svojim radom osiguravaju izvore ugljika koje bakterije mogu koristiti kao izvor hrane. Budući da je sustav aeroban, obligatne aerobne bakterije octene kiseline koriste dostupnu glukozu i etanol

kako bi proizvele organske kiseline, najviše octenu koja nastaje oksidacijom etanola, te glukonsku, dobivenu iz glukoze kao dio njenog oksidativnog metabolizma. Iako glukozu koriste bakterije octene kiseline, smatra se da dio ostaje dostupan kvascima, kao i fruktoza kao supstrati za alkoholnu fermentaciju (Jayabalan i sur., 2007).

Zakiseljavanje podloge dovodi do pada pH vrijednosti, što sprječava razvoj patogenih mikroorganizama, dok početni pH nakon inokulacije ovisi o ukupnoj kiselosti inokuluma. Biofilm koji pri tom nastane sastavljen je od celuloze koju proizvode neke bakterije octene kiseline, točnije *K. xylinus*. U kontekstu industrijske proizvodnje, biofilm se može ukloniti prije punjenja u boce, a manji komadi mogu se ukloniti filtracijom. Nakon punjenja u boce, daljnja je sinteza celuloze prekinuta zbog manjka kisika. Proces pretvorbe glukoze u octenu kiselinu može se zaustaviti u bilo kojem trenutku ako je postignut željeni okus napitka postizanjem anaerobnih uvjeta, koji inhibira bakterije octene kiseline i pogoduje alkoholnom vrenju u kojem kvasci prevode ostatke šećera u etanol i ugljični dioksid. Tako dolazi do nastanka kiselkastog, gaziranog pića s vrlo niskim udjelom etanola, do 0,5 % v/v. Proizvođač mora pripaziti da pH ne bude prenizak, jer se pri pH nižem od 3 piće smatra vrlo kiselim i opasnim za konzumaciju u većim volumenima. Na Slici 1. prikazani su produkti dobiveni iz supstrata (saharoze) djelovanjem združene kulture kvasaca i bakterija prirodno prisutnih tokom fermentacije. U Tablici 1. prikazan je kemijski sastav kombuche te koncentracije prisutnih kemijskih spojeva.



Slika 1. Interakcije kvasaca i bakterija octene kiseline pri proizvodnji kombuche (May i sur., 2019)

Tablica 1. Opći kemijski sastav kombuche (Villarreal-Soto i sur., 2018)

|                   | Spoj                                                                                                                                                              | Prosječna koncentracija            | Početna koncentracija saharoze | Vrijeme fermentacije (dani) | Literatura                                   |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------|
| Organske kiseline | Octena                                                                                                                                                            | 5,6 g/L                            | 70 g/L                         | 15                          | Blanc (1996)                                 |
|                   | Octena                                                                                                                                                            | 8,36 g/L                           | 100 g/L                        | 18                          | Jayabalan i sur. (2007)                      |
|                   | Octena                                                                                                                                                            | 11 g/L                             | 100 g/L                        | 30                          | Chen i Liu (2000)                            |
|                   | Glukonska                                                                                                                                                         | 39 g/L                             | 100 g/L                        | 60                          | Chen i Liu (2000)                            |
|                   | Glukuronska                                                                                                                                                       | 0,0160 g/L                         | 70 g/L                         | 21                          | Lončar i sur. (2006)                         |
|                   | Mliječna                                                                                                                                                          | 0,18 g/L                           | 100 g/L                        | 18                          | Jayabalan i sur. (2007)                      |
| Vitamini          | B <sub>1</sub>                                                                                                                                                    | 0,74 mg/L                          | 70 g/L                         | 15                          | Bauer-Petrovska i Petrushevskaja-Tozi (2000) |
|                   | B <sub>2</sub>                                                                                                                                                    | 8 mg/100 mL                        | 70 g/L                         | 10                          | Malbaša i sur. (2008)                        |
|                   | B <sub>6</sub>                                                                                                                                                    | 0,52 mg/L                          | 70 g/L                         | 15                          | Bauer-Petrovska i Petrushevskaja-Tozi (2000) |
|                   | B <sub>12</sub>                                                                                                                                                   | 0,84 mg/L                          | 70 g/L                         | 15                          | Bauer-Petrovska i Petrushevskaja-Tozi (2000) |
|                   | C                                                                                                                                                                 | 25 mg/L                            | 70 g/L                         | 10                          | Malbaša i sur. (2008)                        |
| Ostali spojevi    | Etanol                                                                                                                                                            | 5,5 g/L                            | 100 g/L                        | 20                          | Chen i Liu (2000)                            |
|                   | Proteini                                                                                                                                                          | 3 g/L                              | 100 g/L                        | 12                          | Jayabalan i sur. (2007)                      |
|                   | Polifenoli                                                                                                                                                        | 7,8 mM (ekvivalent galne kiseline) | 100 g/L                        | 15                          | Chu i Chen (2006)                            |
| Minerali          | Cu, Fe, Mn, Ni, Zn                                                                                                                                                | 0,1 do 0,4 µg/mL                   | 70 g/L                         | 15                          | Bauer-Petrovska i Petrushevskaja-Tozi (2000) |
| Anioni            | F <sup>-</sup> , Cl <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup> , I <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , HPO <sub>4</sub> <sup>-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>-</sup> | 0,04 do 3,20 mg/g                  | 100 g/L                        | 7                           | Kumar i Joshi (2016)                         |

### 2.1.1. Inokulum

Mikroorganizmi koji sudjeluju u procesu proizvodnje kombuche međusobno su u različitim interakcijama pri čemu dolazi do nastajanja različitih produkata tijekom procesa fermentacije. Općenito, fermentaciju iniciraju prisutni kvasci u podlozi, koji pomoću enzima invertaze cijepaju molekulu saharoze do glukoze. Ti se jednostavni ugljikohidrati koriste kao primarni izvor ugljika i energije za sve prisutne mikroorganizme u zajednici. Na početku fermentacije tekuća podloga može sadržavati i otopljeni kisik koji pogoduje respiratornoj aktivnosti kvasaca te doprinosi povećavanju njihovog ukupnog broja kao i broja stanica octenih bakterija. Inicijalna koncentracija prisutnog kisika brzo se smanjuje pa, kao odgovor na novonastale uvjete, dolazi do formiranja celuloznog biofilma. Isprva, fermentacija kombuche uključuje osmotolerantne mikroorganizme, s obzirom na visoku koncentraciju ugljikohidrata koji može doseći više od 10° Brix. S protekom vremena, mikroorganizmi troše prisutne ugljikohidrate, a dolazi do povećavanja koncentracije etanola i organskih kiselina. Vrijednosti etanola mogu se razlikovati od kulture do kulture. Daljnjom oksidacijom etanol se prevodi do octene kiseline. Konačno, na kraju fermentacije, u napitku uglavnom dominiraju mikroorganizmi koji su bolje prilagođeni niskom pH, koji se obično kreće u rasponu od 2,5 do 3,5 pH jedinice. U tablici 2. navedeni su svi rodovi i vrste bakterija (uključujući i bakterije mliječne i octene kiseline) koji sudjeluju u procesu proizvodnje kombuche.

Tablica 2. Rodovi i vrste bakterija u proizvodnji kombuche

| Mikroorganizmi                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Literatura                     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| <i>Komagataeibacter</i> , <i>Gluconobacter</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Collinsella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Weissella</i> , <i>Lactobacillus</i>                                                                                                                          | (Chakravorty i sur., 2016)     |
| <i>Komagataeibacter</i> ( <i>K. rhaeticus</i> , <i>K. xylinus</i> , <i>K. europaeus</i> , <i>K. intermedius</i> ), <i>Gluconacetobacter</i> , <i>Gluconobacter</i> ( <i>G. oxydans</i> ), <i>Acetobacter</i> ( <i>A. malorum</i> , <i>A. pasteurianus</i> , <i>A. pomorum</i> , <i>A. tropicalis</i> ) | (Villarreal-Soto i sur., 2020) |
| <i>Acetobacter</i> ( <i>A. xylinum</i> ), <i>Gluconacetobacter</i> ( <i>G. xylinus</i> ), <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Enterococcus</i>                                                                     | (Marsh i sur., 2014)           |

Kao što je već spomenuto, opažena je veća bioraznolikost prisutnih kvasaca u odnosu na bakterije. Mnoge vrste kvasaca mogu se prilagoditi okolišnim promjenama ili stresnim uvjetima zbog postojanja mehanizama tolerancije na stres. Ti mehanizmi uključuju indukciju poliplo-

dije, umnožavanje velikih fragmenata u kromosomima te varijaciju lokusa u obiteljima Ty1 retrotranspozona. Takve su evolucijske prilagodbe možda omogućile visoku raznolikost kvasaca te prilagodbu uvjetima fermentacije. U tablici 3. navedeni su svi rodovi i vrste kvasaca koji se danas koriste kao dio inokuluma za proizvodnju kombuche.

Tablica 3. Rodovi i vrste kvasaca u proizvodnji kombuche

| Mikroorganizmi                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Literatura                  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| <i>Candida</i> ( <i>C. stellimalicola</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilopsis</i> ), <i>Lachancea</i> ( <i>L. thermotolerans</i> , <i>L. fermentati</i> , <i>L. kluyveri</i> ), <i>Kluyveromyces</i> ( <i>K. marxianus</i> ), <i>Debaryomyces</i> ( <i>D. hansenii</i> ), <i>Pichia</i> ( <i>P. mexicana</i> ), <i>Waitea</i> , <i>Eremothecium</i> ( <i>E. cymbalarie</i> , <i>E. ashbyii</i> ) <i>Meyerozyma</i> ( <i>M. caribbica</i> , <i>M. guilliermondii</i> ), <i>Zygowilliopsis</i> ( <i>Z. californica</i> ) <i>Saccharomyces</i> ( <i>S. cerevisiae</i> ), <i>Saccharomycopsis</i> ( <i>S. fibuligera</i> ), <i>Hanseniaspora</i> ( <i>H. uvarum</i> , <i>H. meyeri</i> , <i>H. vineae</i> ), <i>Kazachstania</i> ( <i>K. telluris</i> , <i>K. exigua</i> ), <i>Starmera</i> , <i>Merimbla</i> , <i>Sporopachydermia</i> , <i>Sugiyamaella</i> | (Chakravorty i sur., 2016)  |
| <i>Zygosaccharomyces bailii</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , <i>Torulospora delbreuckii</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Brettanomyces bruxellensis</i> , <i>Candida stellata</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | (Teoh; Heard; Cox, 2004)    |
| <i>Dekkera</i> , <i>Zygosaccharomyces</i> , <i>Kazachstania</i> , <i>Davidiella</i> , <i>Pichia</i> , <i>Wallemia</i> , <i>Lachancea</i> , <i>Leucosporidiella</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Naumovozyma</i> , <i>Meyerozyma</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Hanseniaspora</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | (Marsh i sur., 2014)        |
| <i>Candida arabinofementans</i> , <i>Brettanomyces bruxellensis</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , <i>Zygosaccharomyces bailii</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | (Villarrealso i sur., 2020) |

Iako postoje sličnosti u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu SCOBY kultura iz dosad proučavanih kombucha, sastav SCOBY kulture ima jasno vidljiv utjecaj u proizvodnji primarnih metabolita. Proučavani su primarni metaboliti iz devet različitih uzoraka kombuche u dugom periodu fermentacije te su koncentracije etanola varirale u rasponu od 0,4 % (v/v) do 0,7 % (v/v), što se može objasniti razlikama u broju stanica kvasca i bakterija octene kiseline u svakom uzorku koji dovodi do specifične proizvodnje i potrošnje etanola.

Uobičajena praksa pri proizvodnji kombuche uključuje dodavanje SCOBY-ja i nešto fermentirane tekućine proizvedene u prethodnoj šarži u zaslađeni čaj. Kako bakterije octene kiseline proizvode celulozu, bakterije i drugi mikroorganizmi su djelomično imobilizirani u strukturi

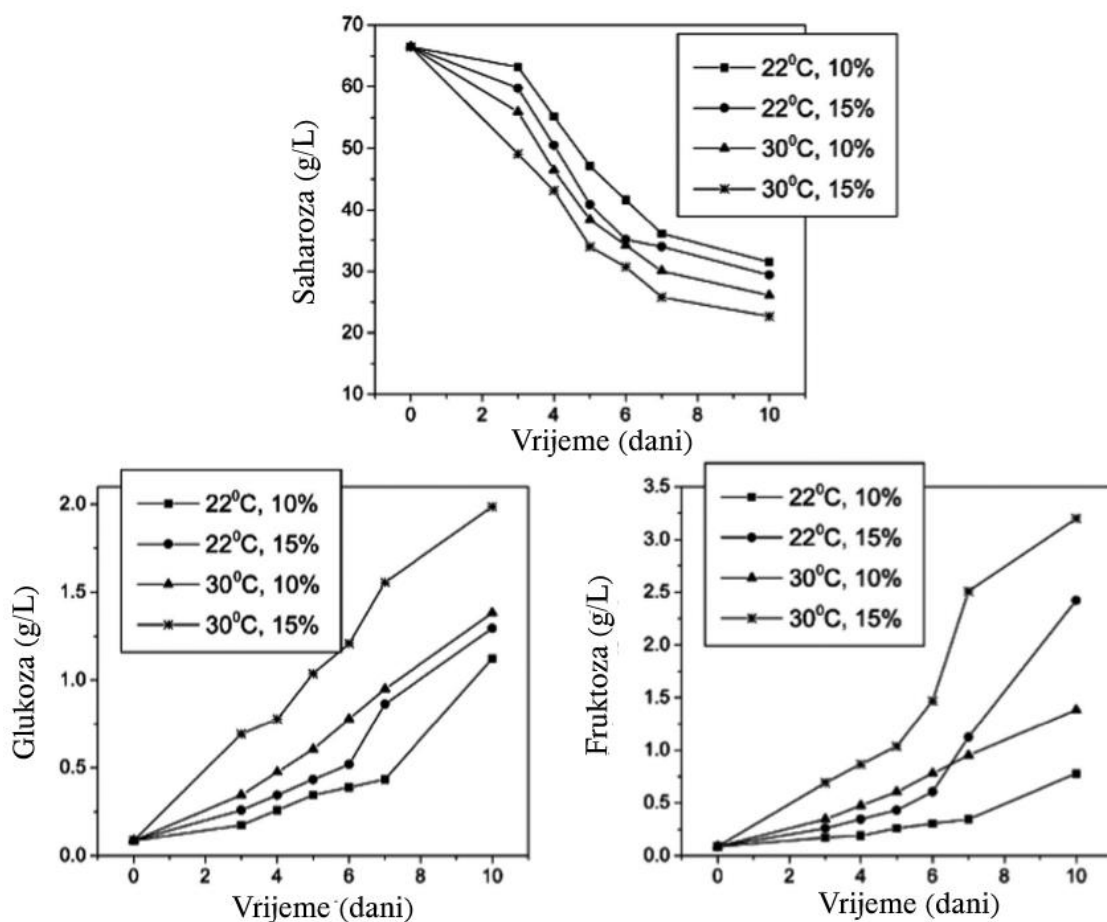
biofilma.

Postoje studije o fermentaciji bez prisutnost SCOBY-ja, uz pomoć mikroorganizama iz prethodnih fermentacija. Korištenje takvog inokuluma uzrokuje smanjuje pH ispod 4,2 te na taj način dolazi do sprječavanja proliferacije patogena. Lončar i suradnici nisu pronašli značajnu razliku između upotrebe 10 %-tnog ili 15 %-tnog inokuluma u ukupnom volumenu i njegovog utjecaja na brzinu fermentacije. Korištenje većeg udjela inokuluma na početku bioprocesa može pridonijeti pretjeranoj kiselosti u novoj šarži što šteti konačnom proizvodu, bez dobika u produktivnosti tijekom vremena. Iz tog razloga najčešće se koriste manji početni volumeni.

### 2.1.2. Temperatura

Uzimajući u obzir različit mikrobiološki sastav između kvasaca i bakterija te da svaki mikroorganizam ima poseban odgovor na promjenu temperature, provođenje fermentacije kombuche pri različitim temperaturama može dovesti do značajnih razlika u kemijskom sastavu proizvedenih napitaka. Jedan od početnih koraka u procesu fermentacije kombuche je hidroliza saharoze do glukoze i fruktoze, koje mikroorganizmi mogu dalje metabolizirati. Ova reakcija katalizirana je uglavnom enzimima prisutnim u kvascima i osjetljiva je na temperaturu hranjive podloge.

U provedenom istraživanju, Lončar i suradnici (2014) otkrili su da temperatura ima značajan utjecaj na kinetiku procesa proizvodnje kombuche, veći od količine dodanog inokuluma. Proizvodnja se provodila pri 22 °C te pri 30 °C. Otkriveno je da su tijekom 10 dana procesi acidifikacije i potrošnje šećera bili brži pri 30 °C. Važno je napomenuti da su u oba eksperimenta korištene iste količine inokuluma. Iz ovoga se može zaključiti da više temperature povoljno djeluju na brzinu sinteze produkata. Povećavanje temperature pozitivno djeluje i na hidrolizu saharoze, što je vidljivo na slici 2. Sličan utjecaj imala je i količina dodanog inokuluma na početku fermentacije. Na temperaturi od 30 °C, uz 15 % dodanog inokuluma, razgradnja saharoze je najbrža te je 10. dan proizvodnje koncentracija saharoze niža u usporedbi s ostalim uvjetima proizvodnje. Najviša koncentracija glukoze i fruktoze ostvarena je deseti dan, također pri temperaturi od 30 °C i 15 % inokuluma.



Slika 2. Promjene koncentracije šećera u vremenu, u ovisnosti o temperaturi i količini dodatnog inokuluma (Lončar i sur., 2006)

Ovaj je zaključak kontradiktoran rezultatima Neffe-Skocićske i suradnika (2017) koji su procijenili da je optimalna temperatura proizvodnje kombuche 25 °C jer takva temperatura pogoduje aktivnosti kvasaca čiji su metaboliti (monosaharidi i etanol) jedini dostupni supstrati za bakterije octene kiseline na početku procesa. Dakle, rast i metabolička aktivnost kvasaca u kombuchi je ograničavajući korak u procesu. Ipak, nije se mogla odrediti značajna razlika u senzornom profilu kombuche proizvedene pri 20, 25 i 30 °C.

U drugom istraživanju (De Filippis i sur., 2018) otkriveno je da je pri 30 °C u usporedbi sa temperaturom od 20 °C povećana populacija bakterija octene kiseline. *G. saccharivorans* prevladava pri 30 °C i to na štetu *G. xylinus*, koja je dominantna bakterija pri 20 °C. Pri temperaturi od 30 °C, povećanjem populacije *G. saccharivorans* također je povećana proizvodnja glukonske i glukuronske kiseline, odnosno došlo je do željene kvantitativne promjene.

### 2.1.3. Izvori ugljika

Korištenje različitih ugljikohidrata kao izvor ugljika za kvasce i bakterije istraživao je Reiss (1994). U tom istraživanju pokazano je da glukoza pogoduje proizvodnji mliječne kiseline, a fruktoza proizvodnji etanola. Maltozu mikroorganizmi slabo troše, a laktoza ne utječe na pri-nos etanola niti stimulira proizvodnju mliječne kiseline. Bakterije octene kiseline pretvaraju glukozu u glukonsku kiselinu i fruktozu u octenu kiselinu. Također je otkriveno da mliječna kiselina stimulira proizvodnju biomase.

Proučavano je iskorištenje melase s 50 %-tnim udjelom saharoze različitih volumena (35, 50 i 70 % volumno) (Malbaša i sur., 2006; Malbaša i sur., 2008). Pri koncentraciji melase od 35 i 50 g/L, kinetika potrošnje saharoze, varijacije pH i proizvodnja organskih kiselina bile su slične, dok sa 70 g/L melase, potrošnja saharoze bila je mnogo brža, a proizvodnja mliječne kiseline pojačana je, uz smanjenu proizvodnju octene kiseline, ali s identičnim vrijednostima ukupne kiselosti. Smanjenje pH vrijednosti nije bilo intenzivno, vjerojatno zbog puferskog djelovanja melase. U nekim su državama (npr. Brazil), zakonodavstvom točno propisani dopušteni izvori šećera za proizvodnju kombuche, a to su saharoza dobivena iz šećerne trske i/ili šećerne repe, melasa, smeđi šećer, zaslađivači te invertni šećer. No, proizvodnja kombuche moguća je i uz korištenje izvora ugljika kao što su sok višnje, groždani sok, sok od nara, sojino mlijeko, pa čak i ekstrakt jeruzalemske artičoke (*Helianthus tuberosus*). Povećanje početne koncentracije saharoze (90 g/L) dovodi do povećanja proizvodnje celuloze, nakon čega nakon nekog vremena dolazi do njenog smanjenja. Također, viša inicijalna koncentracija saharoze utjecala je na brže smanjenje pH vrijednosti podloge. Rast populacija kvasca i bakterija također je potaknut povećanjem početnih koncentracija saharoze (Goh i sur., 2012). Sličan je trend uočen i u radu Blanca (1996) ali u manjoj mjeri.

### 2.1.4. Čaj

Najviše istraživana infuzija za proizvodnju kombuche jest infuzija crnog čaja, no upotreba zelenog čaja sve je učestalija u komercijalnoj proizvodnji, vjerojatno zbog blagog okusa i niže cijene. Čajni listići se koriste u masenoj koncentraciji oko 5 g/L, s blagim varijacijama ovisno o specifičnim receptima za postizanje većih ili manjih intrinzičnih svojstava čaja, kao

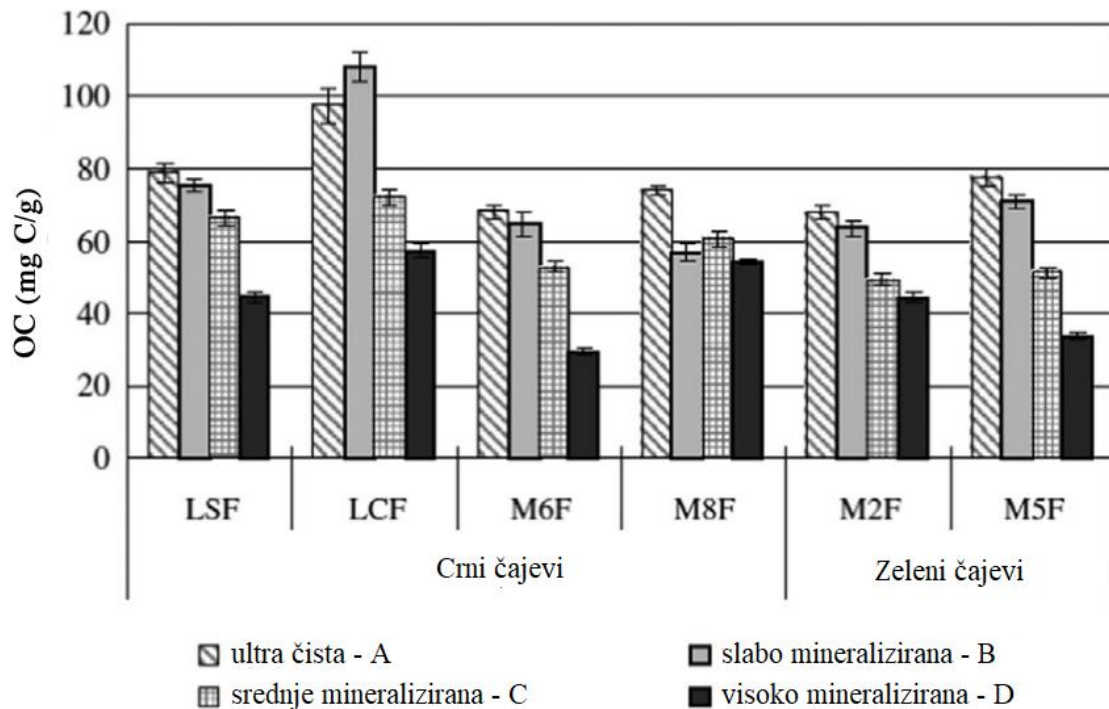
što je količina antioksidansa. Prema Kallelu i suradnicima (2012), potrošnja saharoze, glukoze, fruktoze, te proizvodnja organskih kiselina i celuloze brža je i intenzivnija u crnom čaju nego u zelenom čaju pri identičnim uvjetima proizvodnje. Otkriveno je da priroda čaja nije imala utjecaj na dinamiku rada kvasaca, ali korištenje infuzije zelenog čaja za razliku od crnog, omogućilo je razvoj bakterije *Oenococcus oeni*. U istom istraživanju, mogla se primijetiti veća bakterijska bioraznolikost u zelenom nego u crnom čaju.

Danas se kombucha definira kao rezultat fermentacije infuzije *C. sinensis*. Međutim, nema ograničenja u korištenju drugih biljnih ekstrakata kao pomoćnih sredstava ako su prethodno odobreni.

### 2.1.5. Kemijski sastav vode

Početni sastav vode igra ulogu u konačnom sastavu čajne infuzije: podlozi u kojoj mikroorganizmi kombuche rastu i provode svoje aktivnosti. Mineralni i organski sastav vode variraju od regije do regije te ovise o tvrdoći, odnosno o koncentraciji kalcija i magnezija. Dokazano je da je koncentracija kalcija u vodi važan parametar mineralnih i organskih spojeva u listovima čaja zajedno s vremenskim/temperaturnim uvjetima infuzije. Pretpostavlja se da se pektini prisutni u stjenkama stanica čaja vežu na  $\text{Ca}^{2+}$  ione te dolazi do modifikacije strukture koje inhibiraju ekstrakciju spojeva. Ekstrakcija organske tvari uspješnija je pri višim temperaturama i trajanjem infuzije između minute i jednog sata te pri nižim koncentracijama mineralnih tvari, stoga se za izradu čajne infuzije ne koristi voda visoke tvrdoće (Anderson i sur., 1971).

Na slici 3. prikazan je utjecaj koji tvrdoća vode ima na uspješnost ekstrakcije organskih spojeva. Vidljivo je da je u svim uzorcima, neovisno radi li se o crnom ili zelenom čaju, koncentracija ekstrahiranog otopljenog organskog ugljika značajno niža pri korištenju visoko mineralizirane vode. Ultra čista ili slabo mineralizirana voda zbog svojih niskih koncentracija minerala, odnosno  $\text{Ca}^{2+}$  iona omogućuju najbolju ekstrakciju organskih spojeva te se shodno tome češće koriste kako bi se proizvela što kvalitetnija čajna infuzija, a time i kombucha.



Slika 3. Utjecaj sastava vode na sadržaj otopljenog organskog ugljika (OC) ekstrahiranog iz lišća čaja po gramu infuziranog lišća (mg C/g) (Mossion i sur., 2008.)

### 2.1.6. Geometrija reaktora

Prema Malbaši i sur. (2006), geometrija laboratorijskog spremnika ili posude je parametar s većim utjecajem od količine dodanog inokuluma. U njihovom je istraživanju definirana i matematička formula za geometrijsku sličnost za cilindričnu posudu:

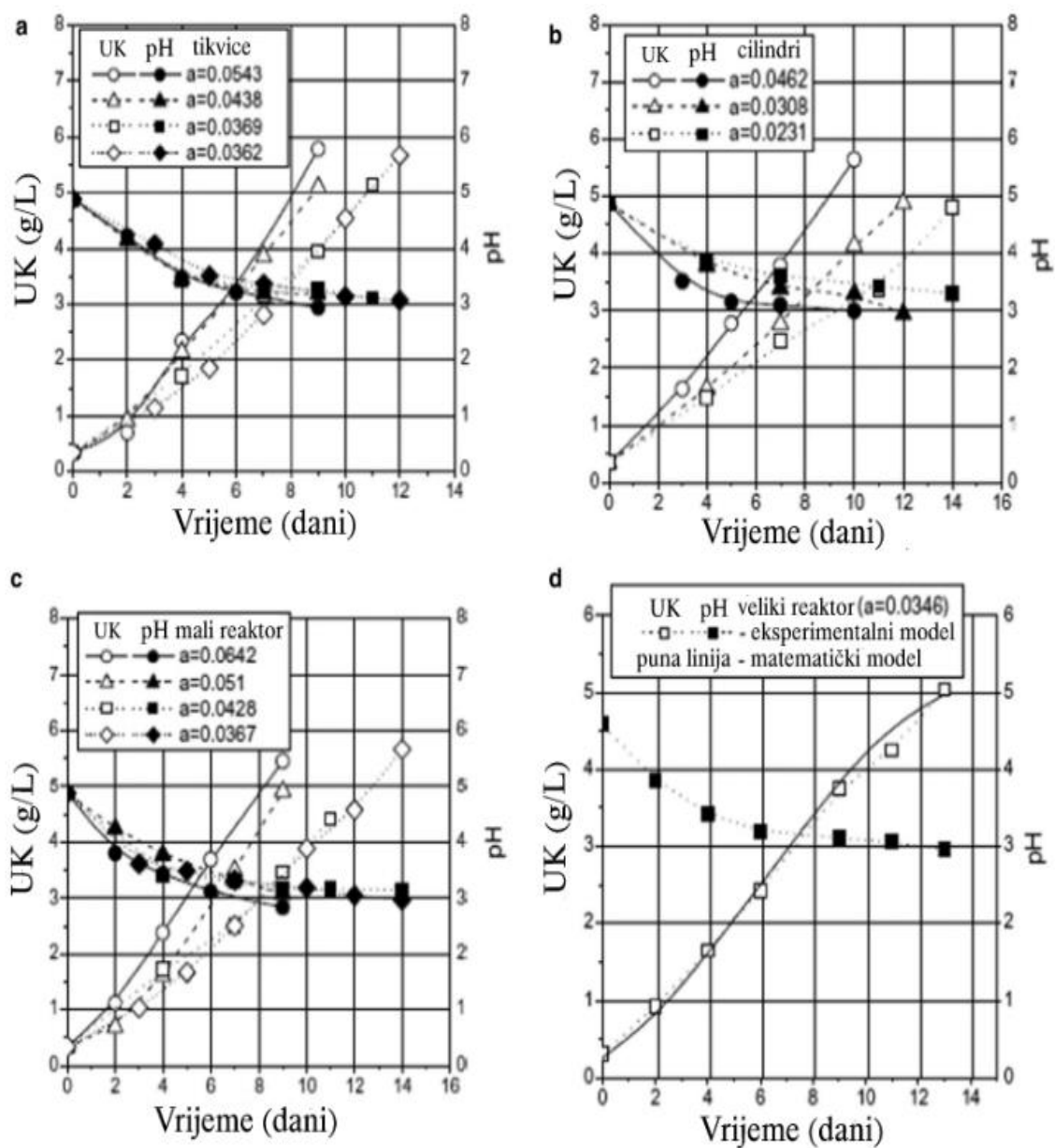
$$\frac{D_{T2}}{D_{T1}} = \left(\frac{V_{T2}}{V_{T1}}\right)^{\frac{1}{3}} \quad (1)$$

gdje  $D_{Tx}$  predstavlja promjer cilindrične posude x, a  $V_{Tx}$  volumen cilindrične posude x.

Istraživan je još jedan parametar iste vrste: specifična međufazna površina (*engl.* specific interfacial surface ili SIS) definirana kao:

$$\text{SIS (cm}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Površina tekućine (cm}^2\text{)}}{\text{Volumen tekućine (cm}^3\text{)}} \quad (2)$$

Točnost ovog modela ispitana je na reaktorima različitih izvedbi i to na 56 posuda koje su uključivale reaktore volumena 90 L do tikvica od 300 mL. Ovaj se model pokazao uspješnijim od geometrijske sličnosti jer je istraživanje pokazalo veću vjernost kinetike razrade i trajanja. Istraživanje pokazuje da bez obzira na oblik posude (tikvica, cilindar ili reaktor) i veličine, veći SIS inducirao je bržu kinetiku acidifikacije. Povećanje SIS-a može se postići povećavanjem dodirne površine zrak/tekućina i/ili smanjenjem volumena tekućine. Posljedica toga su bolji uvjeti za pristup kisiku koji je potreban bakterijama octene kiseline koje se nalaze u biofilmu ili tekućoj fazi. Pametno korištenje SIS parametra može pomoći u kontroli brzine faze acidifikacije kombuche. Zaključno, načini za povećanje brzine faze zakiseljavanja kombuche je povećanje količine inokuluma (od 10 - 15 %), povećanje temperature do otprilike 30 °C, te maksimizacija specifične međufazne površine. Slika 4. prikazuje promjene u pH i ukupnoj kiselosti kombuche te se može primijetiti kako pH najbrže pada na željenu vrijednost od 3 pri proizvodnji u tikvici te je tada i ukupna kiselost najviša. Pri proizvodnji u velikim reaktorima, pH i koncentracija ukupnih kiselina dosežu željenu vrijednost oko trinaestog dana, dok korištenjem cilindra ili manjeg reaktora proces proizvodnje i acidifikacije traje dan dulje.



Slika 4. Promjene pH vrijednosti i ukupne kiselosti kombuche (UK) proizvedene u tikvicama (a), cilindrima (b), malim reaktorima (c) i velikim reaktorima (d) (Cvetković i sur., 2008)

## 2.2. Senzorska svojstva kombuche

Percepciju sve hrane i pića prenosi pet osjetila potrošača: vid, sluh, dodir, miris i okus. Kada pije kombuchu, potrošač doživljava mješavinu vizualnih (sam proizvod), mirisnih (profil arome prije i nakon gutanja), olfaktivnih (slatkoća, kiselost) i dodirnih senzacija (na primjer, putem kemosenzacije mjehurića ugljičnog dioksida na jeziku). Postoji vrlo malo dostupnih podataka o deskriptivnoj senzorskoj analizi kombuche.

Istraživanje Neffe-Skocińske i suradnika (2017) uključuje senzorsku analizu napitaka kombuche rađenih tijekom 10 dana, napravljenih od mješavine crnog i zelenog čaja (2 odnosno 4 g/L) i 100 g/L saharoze na 20, 25 i 30 °C. Senzorsku analizu proveo je panel od 16 neobučeni ljudi te nije provedena statistička analiza dobivenih rezultata. Dakle, ove rezultate potrebno je pažljivo tumačiti. Unatoč tome, korišteni deskriptori reprezentativni su za senzorska svojstva kombuche i pomažu u definiranju njezinih glavnih značajki. Deskriptori s najvišim ocjenama su: "intenzitet boje" i "jasnoća" za vizualne atribute; "čaj" i "citrično" za mirisne atribute; te "čaj", "citrično" i "kiselina" za atribute okusa. Deskriptor "slatkoća" nije ocijenjen unatoč rezidualnim šećerima u rasponu od 27 do 70 g/L. Deskriptori "okus kvasca", "okus octene kiseline", "gorak okus", "peckajući okus" imaju niske ocjene.

Korištenje preciznijeg i standardiziranog skupa deskriptora moglo bi omogućiti dublja istraživanja olfaktivnih i gustativnih aspekata kombuche. Stoga je neophodan neizravan pristup za istraživanje senzorskih karakteristika kombuche povezujući kemijske sastojke kombuche s poznatim senzorskim svojstvima tih spojeva.

### 2.2.1. Vizualna svojstva

Napitci kombuche mogu biti prozirni, filtrirani ili zamućeni (kao nefiltrirana verzija). Mutnoća se uglavnom javlja zbog koloidnog stanja vodenog napitka koji je zapravo suspenzija čestica. Te se čestice sastoje od mikroorganizama i velikih molekula ili agregata veličine od 1 do 1000 nm. Prisutnost takvih tijela izaziva raspršenje svjetlosti. Ovaj fenomen je poznat kao Tyndallov efekt. Iako je provedeno malo istraživanja o koloidima kombuche, koji imaju veliku ulogu u kvaliteti bezalkoholnih pića, nagađa se da su oni rezultat proteinskih polimera, polifenola, i celuloznih fibrila koje proizvode bakterije octene kiseline (Lin i sur., 2013).

Nijansa boje kombuche uglavnom je posljedica prisutnosti pigmenta polifenola ekstrahiranih iz čaja. Karakteristična boja crnog čaja rezultat je enzima polifenol oksidaze, ili takozvane “fermentacije” svježeg lišća čaja. Ovaj proces omogućuje oksidaciju i polimerizaciju prirodnih polifenola koji se uglavnom sastoje od katehina (epikatehin, epigalokatehin i derivata galne kiseline) u različite vrste polimera. Dvije od tih vrsta su pigmenti: jedan od njih je teaflavin, crveno-narančasti dimer pigmenata koji crnom čaju daje karakterističnu boju. Ipak, teaflavin nije glavna komponenta boje crnog čaja. Tearubigini nastaju polimerizacijom višeg stupnja i djeluju kao glavni pigment. Molekularna struktura tih polimernih molekula još uvijek nije u potpunosti razjašnjena (Zhang i sur., 2018).

Iako se malo pažnje pridavalo boji i polifenolima kombuche, dva su istraživanja pokazala da dolazi do značajnog smanjenja intenziteta boje i povećanja ukupnog sadržaja fenola tijekom proizvodnje kombuche, pri čemu bi pad pH vrijednosti podloge mogao bi biti uzrok promjene boje. Također se pretpostavlja da biološka aktivnost mikroorganizama može promijeniti ili čak depolimerizirati pigmente ekstrahirane iz čaja. Dakle, veliki dio pigmenata koji sudjeluju u boji kombuche mogu biti derivati polifenola čaja (Chakravorty i sur., 2016).

Još jedna komponenta vizualnog identiteta kombuche kao gaziranog napitka je brojnost mjehurića koji ovise o procesu karbonizacije, a mogu se dobiti prirodnim putem nakon fermentacije u reaktoru ili umjetnim ubrizgavanjem ugljičnog dioksida (prisilna karbonizacija). Brzina nastanka i njihova veličina ovise o međufaznoj napetosti između plinovite i tekuće faze, što znači da makromolekule kao što su polisaharidi i proteini također imaju ulogu u vizualnom aspektu ovog gaziranog pića (Barker i sur., 2002).

### 2.2.2. Miris

Dostupno je malo informacija o hlapljivim spojevima kombuche, njihovom podrijetlu i njihovom odnosu s olfaktivnim svojstvima (kao i za većinu hrane i pića). Kao i kod mnogih drugih fermentiranih pića, mirisni spojevi potječu i od sirovina (čaja) i od hlapljivih metabolita koji potječu od prisutnih mikroorganizama. Iako crni čaj sadrži brojne hlapljive molekule kao što su 3-heksenol, linalol (cvjetni), geraniol (sladak, nalik na med), 2-feniletanol (nalik na med), damascenon (nalik na ružu) ili 2,5 -dimetil-4-hidroksi-3(2H)-furanon (DMHF) (nalik na karamelu), čini se da tipična aroma čaja nikad nije dio karakterističnog profila arome

kombuche Acree i van Ruth, 2003). Umjesto toga, dominiraju arome povezane sa proizvodnjom samog napitka; miris octa povezan s octenom kiselinom koju proizvode bakterije octene kiseline i miris jabukovače povezan s aktivnošću kvasaca. Enzimska oksidacija polifenola može dovesti do oslobađanja arome u crnom čaju tijekom proizvodnje kombuche. Naprotiv, prekursori su u zelenom čaju prisutni u svom glikoziliranom obliku, što znači da bi korištenje ove sirovine za proizvodnju kombuche moglo otključati potencijal arome kroz enzimsku aktivnost kvasaca (Wei i sur., 2019).

### 2.2.3. Okus

#### a) Slatkoća

Tradicionalni zaslađivač koji se koristi u kombuchi, a koji također djeluje kao supstrat za mikroorganizme, je saharoza. Korištenje saharoze čini temelj simbioze između kvasca i bakterija, pri čemu kvasci prvo hidroliziraju saharozu pomoću enzima invertaze na molekulu glukoze i fruktoze koje onda bakterije mogu lakše koristiti kao izvor ugljika (May i sur., 2019). Moguće je premostiti ovaj nužan korak hidrolize saharoze uvođenjem šećera u obliku pročišćenih ili miješanih sastojaka kao što su glukozni sirup, agavin sirup, ili melasa (Malbaša i sur., 2008). Ovi se sastojci razlikuju u dva glavna aspekta. Prvi je razlika u relativnoj slatkoći: glukoza i fruktoza imaju intenzitet slatkoće od 65 do 75 %, odnosno 120 % (w/w), u usporedbi sa saharozom (iako su te vrijednosti modulirane njihovim koncentracijama). Drugi aspekt čine drugi spojevi sadržani u tim zaslađivačima, poput onih proizvedenih Maillardovim reakcijama u agavinom sirupu ili melasi (Willems i Low, 2012). Ovi spojevi mogu biti hlapljivi i utjecati na profil arome ili nehlapljivi kao što su minerali ili pigmenti koji mogu utjecati na vizualni aspekt pića. Slatkoća konačnog proizvoda je dakle ovisna o rezidualnoj količini šećera, što je uvjetovano početnom količinom zaslađivača dodanog čaju i sposobnošću mikroorganizma da potroši taj supstrat tijekom proizvodnje.

#### b) Kiselost

Organske kiseline kombuche uglavnom proizvode bakterije octene kiseline, ali ne treba zanemariti ni doprinos kvasaca i bakterija mliječne kiseline. Glavne organske kiseline koje doprinose okusu kombuche su octena, glukonska i glukuronska kiselina, dok su sporedne

mliječna kiselina, jabučna kiselina i jantarna kiselina (Neffe-Skocinska i sur., 2017). Treba napomenuti da organske kiseline također stvaraju, na nižoj razini, gorak i opor okus. Ipak, te kemijske vrste nisu glavni izvor gorkog okusa kombuche. Senzorna svojstva ovih metabolita detaljno su prikazana u tablici 4.

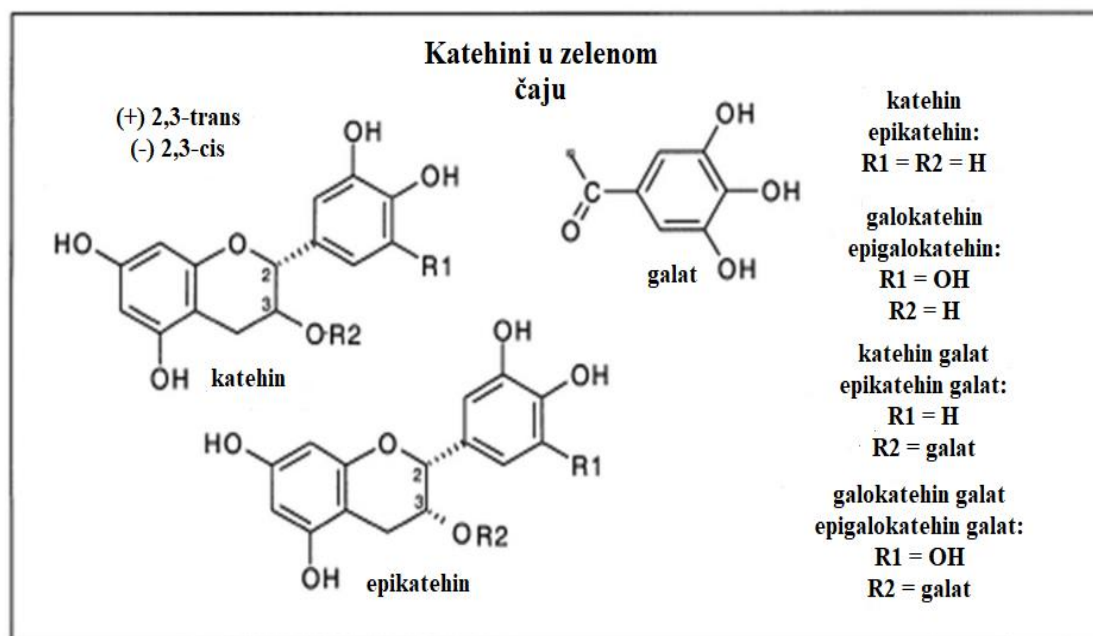
Tablica 4. Kemijska i senzorska svojstva organskih kiselina kombuche (Da Conceicao Neta i sur., 2007; Li i Liu, 2015)

| Kiselina  | Molekulska težina | pKa                  | Broj karboksilnih skupina | Prag percepcije okusa (mg/L vode) | Senzorska kakvoća                |
|-----------|-------------------|----------------------|---------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| octena    | 60                | 4,75                 | 1                         | 52,6                              | trpko i kiselo                   |
| mliječna  | 90                | 3,86                 | 1                         | 80,1                              | oštro                            |
| glukonska | 196               | 3,86                 | 1                         | neodređeno                        | blagi, osvježavajući okus        |
| jabučna   | 134               | 3,40<br>5,11         | 2                         | 7,3                               | trpko                            |
| jantarna  | 118               | 4,19<br>5,50         | 2                         | 22                                | pomalo gorko u vodenim otopinama |
| limunska  | 192               | 3,14<br>4,77<br>6,39 | 3                         | 4,3                               | vrlo kiselo                      |

### c) Gorčina

Gorčina u kombuchi, ako nije prikrivena slatkoćom, može potjecati od kofeina i polifenola prirodno prisutnih u čaju. Prosječni prag percepcije okusa kofeina iznosi 0,2 g/L, dok je u kombuchi koncentracija kofeina u rasponu iznad ove vrijednosti te varira od 0,6 do 1 g/L (Chakravorty i sur., 2016). Polifenoli su gorki i trpki sekundarni metaboliti koje proizvode biljke, uključujući čajevac (*C. sinensis*). Prije bilo kakvog tretmana, listovi čaja sastoje se od

30 do 40 % (w/w suhe mase) polifenola. Nakon infuzije u vrućoj vodi, udio ekstrahirane suhe tvari otprilike je isti. Fenolni sastav infuzije zelenog čaja najvećim udjelom predstavljaju katehini (30 do 42 %), odnosno epikatehini, epigalokatehini i njihovi esteri galne kiseline (epikatehin galati i epigalokatehin galati). Na slici 5. vidljiva je njihova kemijska struktura. Manji broj spojeva (2 %) čine flavonoli (kemferol, kvercetin i miricetin). Pronađene su i fenolne kiseline kao što su galna kiselina i teogalin (ukupno 2 %). Često se spominju tanini u čaju, ali su količine tanina u vrlo niskim koncentracijama (katehini su pogrešno uključeni pod pojam “tanin”). Zapravo, proantocijanidini (ili kondenzirani tanini) su polimeri katehina i prisutni su u vrlo malim količinama u zelenom čaju i uglavnom su dimeri. Flavan-3-ol, uključujući katehine i proantocijanidine, također daje trpak i gorak okus kombuchi. Tijekom prvih devet dana proizvodnje može se primijetiti smanjenje epikatehina, epigalokatehina i njihovih derivata, a zatim dolazi do porasta negaliranih spojeva do 12. dana što ukazuje na hidrolizu estera. Na temelju rada Zhua i suradnika (1997), kiselinska hidroliza prilično je malo vjerojatna, zbog čega se može zaključiti da su hidrolizu zaslužni enzimi. Međutim, posljedice ovog fenomena na okus i osjećaj kombuche u ustima ostaju nepoznati. U novom je istraživanju (Cardoso i sur., 2020) otkriveno uz pomoć UPLC-MS (*engl.* Ultra-Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry) da postoji značajna razlika u profilu fenolnih spojeva u infuziji crnog čaja i kombuche koja iz nje proizlazi. Ipak, globalni profil nije se drastično promijenio, a flavonoidi su ostali glavni fenolni spojevi, uz fenolne kiseline. Novi spojevi nastali tijekom proizvodnje uglavnom su pripadali flavonoidima. U slučaju kombuche dobivene iz zelenog čaja nisu primijećene značajne promjene. Početni fenolni profil dobiven infuzijom stoga je odlučujući korak za konačni proizvod.



Slika 5. Kemijska struktura nekih sastojaka zelenog čaja (Dufresne i Farnworth, 2000)

#### 2.2.4. Oralna percepcija

Unatoč prisutnosti trpkih polifenola, kombucha se nikada ne opisuje kao takva, što se može pripisati šećerima koji smanjuju percepciju trpkosti. Percepcija etanola i njegov utjecaj na percepcije ostalih spojeva intenzivno su proučavani kako bi se razjasnio njegov utjecaj na kvalitetu alkoholnih pića. Percepcija etanola javlja se preko okusnog, olfaktornog i trigeminalnog (ili iritacijskog) sustava. Prag okusa etanola kreće se oko 1 do 2 %. To znači da etanol, čak i ako se ne može identificirati na olfaktornoj razini, može utjecati na aromatski profil kombuche. S druge strane, okus obične kombuche s udjelom alkohola ispod 1 % ne bi trebao izazvati dojam okusa alkohola. Prelazak praga koncentracije etanola mogao utjecati na percepciju kombuche za neke potrošače i potencijalno smanjiti globalnu privlačnost proizvoda (Greenwalt i sur., 2000).

Iako je provedeno malo istraživanja, rezultati ukazuju i na povećanje kiselosti kombuche karbonizacijom (Mattea i DiMeglio, 2001). Također, karbonizacija nije utjecala na osjećaj slatkoće (Otake, 2001).

## 2.3. Utjecaj kombuche na zdravlje

Iako je kombucha poznata već dugo vremena, interes za njeno istraživanje porastao je tek početkom prošlog stoljeća. Potencijalni zdravstveni učinci raznih prisutnih metabolita izazvali su povećani interes za ovo fermentirano piće. Zahvaljujući naporima mnogih znanstvenih timova, na životinjskim modelima ili *in vitro* dokazano je pozitivno djelovanje kombuche na imunološki, endokrinološki, kardiovaskularni, gastrointestinalni, urogenitalni i druge sustave u organizmu. Međutim, do sada, niti jedno kliničko ispitivanje nije primijenjeno na ljudima.

### 2.3.1. Antioksidacijsko djelovanje

Većina zdravstvenih dobrobiti kombuche pripisuje se njenom potencijalu uklanjanja slobodnih radikala. Antioksidativno djelovanje je posljedica prisutnosti polifenola čaja, askorbinske kiseline, vitamina B i D-saharinske kiseline-1,4-laktona (DSL). Fermentacija potiče strukturnu modifikaciju polifenola čaja i povećava prisutnost komponenti niske molekularne težine u kombuchi, pridonoseći značajnijoj antioksidacijskoj aktivnosti u usporedbi s nefermentiranim čajem. Razlog za ovu razliku u antioksidacijskom potencijalu povezan je s varijacijama u broju infuziranih biljaka i antioksidacijskih spojeva u crnom čaju. Iako su kombuchina svojstva uklanjanja slobodnih radikala izravno proporcionalno vremenu fermentacije, produljenje vremena fermentacije se ne preporuča zbog nakupljanja organskih kiselina koje mogu potaknuti acidozu i mogu biti štetne ako se konzumiraju u većim količinama. Također, identificiranje izvanstaničnih enzima koji djeluju na strukturnu modifikaciju komponenata tijekom fermentacije i metabolita kombuche je neophodno kako bi se razjasnili aktivni metabolički putevi povezani s antioksidacijim učincima kombuche (Martinez Leal i sur., 2018).

### 2.3.2. Detoksikacija

Neki metaboliti u kombuchi mogu pridonijeti detoksikaciji organizma. Konzumacija glukuronske kiseline, jabučne kiseline i određenih enzima proizvedenih tijekom procesa fermentacije kombuche, uz interakciju između čaja i šećera s kulturom bakterija i kvasaca koja se jav-

lja tijekom pripreme kombuche, može se povećati eliminacija nepoželjnih spojeva u organizmu. Ovaj proces detoksikacije naziva se glukuronidacija.

Difosfat uridin glukuronske kiseline (UDP-GlucUA), bioaktivni oblik glukuronske kiseline, može imati detoksikacijska svojstva koja ublažavaju simptome gihta, reumatizma, artritisa i bubrežnih kamenaca. Posljednjih godina postoji veliki interes za glukuronsku kiselinu zbog njezinih vrijednih svojstava, uključujući njezinu ulogu prekursora u biosintezi vitamina C, sposobnost pretvaranja u glukozamin i kondroitin sulfat, koji su također povezani s proizvodnjom kolagena (Ivanišova i sur., 2020).

Bioapsorbirajući učinak SCOBY-ja tijekom fermentacije također može doprinijeti proizvodnji zdravije kombuche, s obzirom na to da su teški metali iz okoliša, kao što su arsen, krom i bakar, prisutni u vrlo niskim koncentracijama. Ovi rezultati ukazuju da konzumiranje kombuche ne predstavlja potencijalni zdravstveni rizik u smislu sadržaja toksičnih spojeva.

### 2.3.3. Probiotički potencijal

Popularnost kombuche kao probiotika znatno je porasla s obzirom na njezin mogući probiotički potencijal. Probiotici se definiraju kao “živi mikroorganizmi koji, kada se daju u odgovarajućim količinama, pružaju zdravstvenu korist domaćinu”, a ti učinci moraju biti znanstveno dokazani. Većina probiotičkih bakterija pripada rodu *Lactobacillus* ili *Bifidobacterium*. Poznato je da bakterije mliječne kiseline mogu djelovati imunostimulirajuće na domaćina. Međutim, nije poznato mogu li mikroorganizmi prisutni u kombuchi uspješno nastaniti ljudska crijeva. Ljudi su dom složene mikrobiote koja se sastoji od fakultativnih i strogih anaeroba, uključujući više od 5000 vrsta. Nekoliko izvješća je pokazalo da mikrobnim zajednicama u debelom crijevu dominira pet identificiranih rodova bakterija: *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* i *Proteobacteria*. Još uvijek nije riješeno pitanje kako se simbiotski odnosi između domaćina i bakterije održavaju bez izazivanja potencijalno štetnih imunoloških odgovora (Yang i sur., 2022).

## 2.4. Izazovi i tehnološki aspekti u proizvodnji kombuche

Mnogi se slažu kako je potrebna standardizacija proizvodnje kombuche i njenih fizikalno-kemijskih karakteristika. Standardizacija fizikalno-kemijskih svojstava nužna je jer upravo ona utječu na iskustvo potrošača. Budući da se radi o fermentiranom napitku, u njegovoj proizvodnji moraju se uzeti u obzir neke varijable, kao što su kinetika fermentacije i definirana fizikalna i mikrobiološka svojstva koja se daju početnoj kulturi i konačnom proizvodu. Vrsta šećera koja se koristi kao izvor ugljika izravno utječe na kinetiku fermentacije kombuche.

Upotreba čiste saharoze osigurava niži pH i veći sadržaj octene kiseline u usporedbi s melasom, dok veća potrošnja šećera sadržanog u melasi uzrokuje veći sadržaj mliječne kiseline. Ovisno o izvoru ugljika koji sudjeluje u procesu, potrebno je prilagoditi vrijeme i temperaturu fermentacije, kako bi se spriječilo prekomjerno nakupljanje octene kiseline i gubitak organskih svojstava. U slučaju melase, unatoč tome što je znatno bogatija nutrijentima od čiste saharoze, njeni metaboliti povećavaju pH vrijednost te posljedično daju krajnji proizvod slabije kvalitete. Složeni zadatak balansiranja prikladnog izvora ugljika s najboljom učinkovitosti njegovog metabolizma ometa ne samo senzorski aspekt proizvoda, već i njegovu sigurnost, budući da prisutnost ostatka šećera u pakiranju gotovog proizvoda omogućuje kontinuiranu fermentaciju ako je napitak nepasteriziran, čime se povećava proizvodnja plinova i alkohola tijekom skladištenja ili distribucije proizvoda, što utječe na kvalitetu konačnog pića. Čini se da su sastav inokuluma, temperatura i vrijeme fermentacije najvažniji parametri u dizajniranju napitka kemijskog sastava primjerenog tržištu. Konačno, zbog velikih poteškoća koje se javljaju u standardizaciji fermentacije različitih kombucha i s obzirom na široku raznolikost čimbenika i vrsta koji utječu na fermentaciju te nedostatak znanstvenog konsenzusa, možda će biti potrebno promatrati kombuchu ne kao jedan proizvod, već kao kategoriju fermentiranih pića.

### 3. ZAKLJUČCI

Na temelju ovog rada može se zaključiti sljedeće:

1. Glavnu ulogu u proizvodnji kombuche ima združena kultura mikroorganizama (SCOBY kultura), koja svojim djelovanjem kombuchi daje karakterističan okus i miris.
2. Za pripremu infuzije najčešće se koriste listovi zelenog ili crnog čaja i voda. Vode ne smije biti pretvrda kako bi se osigurala što uspješnija ekstrakcija organskih spojeva, te u konačnici i kvalitetniji proizvod.
3. Polifenoli iz čaja daju boju kombuchi, a za zamućenost su zaslužni proteinski polimeri. Miris kombuche potječe od hlapljivih spojeva, slatkoća od neprevrelog šećera, a kiselost od nastalih organskih kiselina. Gorčina pak potječe od polifenola prirodno prisutnih u čaju, kofeina te katehina i njegovih derivata.
4. Kombucha ima antioksidacijsko i detoksikacijsko djelovanje te značajan probiotički potencijal.
5. Iako se proizvodi i u većem industrijskom mjerilu, proizvodnja ovog napitka još uvijek nije u potpunosti standardizirana.

#### 4. POPIS LITERATURE

Acree TE, van Ruth S (2003) Gas chromatography/olfactometry. *Curr Prot Food Anal Chem* 10(1), G1.8.1–G1.8.12. <https://doi.org/10.1002/0471142913.fag0108s10>

Anderson W, Hollins JG, Bond PS (1971) The composition of tea infusions examined in relation to the association between mortality and water hardness. *J Hyg* 69(1), 1–15. <https://doi.org/10.1017/S0022172400021197>

Barker GS, Jefferson B, Judd S J (2002) The control of bubble size in carbonated beverages. *Chem Eng Sci* 57(4), 565–573. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(01\)00391-8](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(01)00391-8)

Bauer-Petrovska B, Petrushevska-Tozi L (2000) Mineral and water soluble vitamin content in the Kombucha drink. *Int J Food Sci Tech* 35(2), 201–205.

Blanc PJ (1996) Characterization of the tea fungus metabolites. *Biotechnol Lett* 18(2), 139–142. <https://doi.org/10.1007/BF00128667>

Cardoso RR, Neto RO, dos Santos D’Almeida CT, do Nascimento TP, Pressete CG, Azevedo L i sur. (2020) Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food Res Int* 128, 108782. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108782>

Chakravorty S, Bhattacharya S, Chatzinotas A, Chakraborty W, Bhattacharya D, Gachhui R (2016) Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *Int J Food Microbiol* 220, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015>

Chen C, Liu BY (2000) Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *J. Appl. Microbiol* 89(5), 834–839. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01188.x>

Chu SC, Chen C (2006) Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of Kombucha. *Food Chem* 98(3), 502–507. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.080>

Cvetković D, Markov S, Djurić M, Savić D, Velićanski A (2008) Specific interfacial area as a key variable in scaling-up kombucha fermentation. *J Food Eng* 85(3), 387– 392. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.07.021>

Da Conceicao Neta ER, Johanningsmeier SD, McFeeters RF (2007) The chemistry and physiology of sour taste: A review. *J Food Sci* 72(2), R33–R38. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00282.x>

De Filippis F, Troise AD, Vitaglione P, Ercolini D (2018) Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. *Food Microbiol* 73, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.008>

Dufresne C, Farnworth E (2000) Tea, kombucha, and health : A review. *Food Res Int* 33(6), 409–421. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00067-3](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00067-3)

Goh WN, Rosma A, Kaur B, Fazilah A, Karim AA, Bhat R (2012) Fermentation of black tea broth (Kombucha) : I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose. *Int Food Res J* 19(1), 109– 117

Greenwalt CJ, Steinkraus KH, Ledford RA (2000) Kombucha, the fermented tea: Microbiology, composition, and claimed health effects. *J Food Protect* 63(7), 976–981.

Ivanišová E, Meňhartová K, Terentjeva M, Harangozo L, Kántor A, Kačániová M (2019) The evaluation of chemical, antioxidant, antimicrobial and sensory properties of kombucha tea beverage. *J Food Sci Tech* 57, 1840-1846. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04217-3>

Jayabalan R, Marimuthu S, Swaminathan K (2007) Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chem* 102(1), 392–398. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.032>

Jayabalan R, Malbaša RV, Lončar ES, Vitas JS, Sathishkumar M (2014) A review on kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Compr Rev Food Sci F* 13(4), 538–550. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>

Jayabalan R, Malini K, Sathishkumar M, Swaminathan K, Yun SE (2010) Biochemical characteristics of tea fungus produced during kombucha fermentation. *Food Sci Biotechnol* 19(3), 843–847. <https://doi.org/10.1007/s10068-010-0119-6>

Kallel L, Desseaux V, Hamdi M, Stocker P, Ajandouz EH (2012) Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. *Food Res Int* 49(1), 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.018>

Kumar V, Joshi VK (2016) Kombucha: Technology, microbiology, production, composition and therapeutic value. *Int J Food Ferment Technol* 6(1), 13–24. <https://doi.org/10.5958/2277-9396.2016.00022.2>

Li H, Liu F (2015) The chemistry of sour taste and the strategy to reduce the sour taste of beer. *Food Chem* 185, 200–204. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.135>

Lin SP, Loira Calvar I, Catchmark JM, Liu JR, Demirci A, Cheng, KC (2013) Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. *Cellulose* 20(5), 2191–2219. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-9994-3>

Lončar E, Djurić M, Malbaša R, Kolarov LJ, Klačnja M (2006) Influence of working conditions upon kombucha conducted fermentation of black tea. *Food Bioprod Process* 84(3), 186–192. <https://doi.org/10.1205/fbp.04306>

Loncar E, Kanuric K, Malbasa R, Djuric M, Milanovic S (2014) Kinetics of saccharose fermentation by Kombucha. *Chem Ind Chem Eng Q* 20(3), 345–352. <https://doi.org/10.2298/CICEQ121113016L>

Malbaša R, Lončar E, Djurić M (2008) Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. *Food Chem* 106(3), 1039–1045. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.020>

Malbaša R, Lončar E, Djurić M, Klačnja M, Kolarov LJ, Markov S (2006) Scale-up of black tea batch fermentation by kombucha. *Food Bioprod Process* 84(3), 193–199. <https://doi.org/10.1205/fbp.05061>

Marsh AJ, O'Sullivan O, Hill C, Ross RP, Cotter PD (2014) Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiol* 38, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.003>

Martinez Leal J, Valencuela Suarez L, Jayabalan R, Huerta Oros J, Escalante-Aburto A (2018) A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CYTA- J Food* 16(1), 390-399. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1410499>

Mattes RD, DiMeglio D (2001) Ethanol perception and ingestion. *Physiol Behav* 72(1–2), 217–229.

May A, Narayanan S, Alcock J, Varsani A, Maley C, Aktipis A (2019) Kombucha : A novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem. *PeerJ* 7, e7565. <https://doi.org/10.7717/peerj.7565>

Mossion A, Potin-Gautier M, Delerue S, Le Hécho I, Behra P (2008) Effect of water composition on aluminium, calcium and organic carbon extraction in tea infusions. *Food Chem* 106(4), 1467–1475. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.098>

Neffe-Skocińska K, Sionek B, Ścibisz I, Kołożyn-Krajewska D (2017) Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. *CyTA-J Food* 15(4), 601–607. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1321588>

Odake S (2001) Sweetness intensity in low-carbonated beverages. *Biomolecul Eng* 17(4–5), 151–156. [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(01\)00074-0](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(01)00074-0)

Villarreal-Soto SA, Beaufort S, Bouajila J, Souchart JP, Taillandier P (2018) Understanding kombucha tea fermentation: A review. *J Food Sci* 83(3), 580–588. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>

Villarreal-Soto SA, Bouajila J, Pace M, Leech J, Cotter PD, Souchart JP, Taillandier P, Beaufort S (2020) Metabolome-microbiome signatures in the fermented beverage, Kombucha. *Int J Food Microbiol* 333, 108778. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108778>

Teoh AL, Heard G, Cox J (2004) Yeast ecology of Kombucha fermentation. *Int J Food Microbiol* 95(2), 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.020>

Wei J, Wang S, Zhang Y, Yuan Y, Yue T (2019) Characterization and screening of non-*Saccharomyces* yeasts used to produce fragrant cider. *LWT*, 107, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.028>

Willems JL, Low NH (2012) Major carbohydrate, polyol, and oligosaccharide profiles of agave syrup. application of this data to authenticity analysis. *J Agric Food Chem* 60(35), 8745–8754. <https://doi.org/10.1021/jf3027342>

Zhang W, Wang X, Qi X, Ren L, Qiang T (2018) Isolation and identification of a bacterial cellulose synthesizing strain from kombucha in different conditions : *Gluconacetobacter xylinus* ZHCJ618. *Food Sci Biotechnol* 27(3), 705–713. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0303-7>

Zhu, QY, Zhang A, Tsang D, Huang Y, Chen ZY (1997) Stability of green tea catechins. *J Agr Food Chem* 45(12), 4624–4628. <https://doi.org/10.1021/jf9706080>

## Izjava o izvornosti

Ja Antonija Varjačić izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Antonija Varjačić  
Vlastoručni potpis